

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



Molekulargenetische Untersuchung des Kandidatengens *PABPC1* bei hereditären Gliedergürtelmuskeldystrophien

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Melanie Kramer

aus

München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maggie Walter, M.A.

Mitberichterstatter: PD Dr. Joachim Scheßl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1	GRUNDLAGEN	1
1.1	Hereditäre Gliedergürtelmuskeldystrophien	1
1.2	Gliedergürtelmuskeldystrophie mit Herzbeteiligung	5
1.3	Molekulargenetik bei dilatativer Kardiomyopathie	7
1.4	Die Rolle des Kandidatengens <i>PABPC1</i> in der Translation	11
1.5	Oligogenetische Erkrankungen	16
2	PROBLEMSTELLUNG	17
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut	18
3.2	Polymerase-Kettenreaktion	19
3.2.1	Primersequenzen	20
3.2.2	Reaktionsbedingungen	21
3.3	Agarose-Gelelektrophorese	22
3.4	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	23
3.5	Sequenzanalyse und Auswertung	23
3.6	Bewertung der Pathogenität einer Sequenzvariante	25
4	ERGEBNISSE	26
4.1	Familienuntersuchung mit unklaren Sequenzvarianten im <i>PABPC1</i> -Gen	26
4.2	Klinische Daten der untersuchten Patientenkohorte mit neuromuskulären Erkrankungen	29
4.3	Optimierung der PCR Amplifikation des <i>PABPC1</i> -Gens	31
4.4	Sequenzierung der <i>PABPC1</i> -PCR-Fragmente	34
5	DISKUSSION	36
5.1	PCR Amplifikation der <i>PABPC1</i> -Exons	36
5.2	Auswahl der Sequenzierungsmethode zur Analyse des <i>PABPC1</i> -Gens	36

5.3	Identifizierung von Genvarianten	37
5.4	Einschränkende Aspekte der Analysen.....	37
5.5	Ausblick	39
6	ZUSAMMENFASSUNG	41
7	LITERATUR.....	42
8	ANHANG	49
8.1	PABPC1 Exon-Exon-Grenzen	49
8.2	PrimerMap-Darstellung der Primer-Positionen im <i>PABPC1</i> -Gen	52
	DANKSAGUNG	60
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	61

Abstrakt

Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD) können mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) einhergehen. Beide Krankheiten haben unter Anderem genetische Ursachen. Daher ist die Analyse potentieller Kandidatengene, die für beide Krankheitsentitäten verantwortlich sein könnten, essentiell.

Patienten mit hereditärer Gliedergürtelmuskeldystrophie weisen häufig Kardiomyopathien auf. Diese stehen im Zusammenhang mit einem massiven Anstieg der Proteinexpression in den Herzmuskelzellen. Studien haben gezeigt, dass *PABPC1* eine kritische Rolle bei der Regulation der Proteinexpression in Kardiomyozyten spielt. Daher wurde *PABPC1* als potentielles Kandidatengen für die Entstehung von DCM und LGMD untersucht.

In dieser Studie wurde genomische DNA aus peripherem Blut von 11 Patienten auf Mutationen im *PABPC1*-Gen getestet, um eine mögliche Assoziation dieses Gens mit der Entstehung von dilatativen Kardiomyopathien oder Gliedergürtelmuskeldystrophien zu untersuchen. Um das *PABPC1*-Gen molekulargenetisch zu analysieren, wurden zunächst die kodierenden Abschnitte des Gens mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und im Anschluss über Sanger-Sequenzierung analysiert. Bei einigen der 11 Patienten konnten bekannte Polymorphismen verifiziert werden. Jedoch wurden keine krankheitsrelevanten Varianten des *PABPC1*-Gens festgestellt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein Zusammenhang von *PABPC1*-Genvarianten mit der Entstehung von Gliedergürtelmuskeldystrophien nicht belegt werden konnte.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
BMD	Muskeldystrophie Becker-Kiener
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMD	Dystrophin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
gDNA	Genomische DNA
LGMD	Gliedergürtelmuskeldystrophie (limb girdle muscular dystrophy)
LMNA	Lamin A/C
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
MYBPC3	Myosin binding protein C
MYH7	Myosin heavy chain 7
MYPN	Myopalladin
NGS	Next generation sequencing
n. u.	nicht untersucht
PABPC1	Poly-adenylate binding protein (cytoplasmic) 1
PIC	Präinitiationskomplex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLN	Phospholamban
SCN5A	Natriumkanal α -Untereinheit
sec	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAZ/G4.5	Tafazzin
TNNT2	Troponin T2
TTN	Titin
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)

1 GRUNDLAGEN

1.1 Hereditäre Gliedergürtelmuskeldystrophien

Die Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD, engl. *limb girdle muscular dystrophy*) gehören einer Gruppe von seltenen, erblich bedingten Muskelerkrankungen an, die sich meist durch Schwäche und Atrophie der Becken- und Schultergürtelmuskulatur manifestieren (Mathews and Moore 2003).

Oft beginnt die Krankheit im mittleren Erwachsenenalter mit fortschreitendem Muskelschwund, der sich in erster Linie in der Hüfte und im Schulterbereich bemerkbar macht. Patienten mit LGMD zeigen häufig Schwierigkeiten beim Treppensteigen, Laufen oder beim Aufstehen. Selektive Hypertrophien und Atrophien bestimmter Muskelgruppen kommen oft vor. Die Erkrankungen sind insgesamt sehr selten und werden, soweit gegenwärtig bekannt, ausschließlich autosomal vererbt. Die Prävalenz der Erkrankung variiert zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen, so erstrecken sich die Prävalenzwerte von 1:14.500 bis zu 2,27:100.000 Patienten (Domingos, Sarkozy et al. 2017).

Ursprünglich wurden die Gliedergürtelmuskeldystrophien im Jahre 1954 von Walton und Nattrass in dominante (LGMD1A-F) und rezessive Formen (LGMD2A-J) unterteilt (Walton and Nattrass 1954). Molekulargenetische Untersuchungen konnten einen kausalen Zusammenhang zwischen diversen Proteinen, die in der Muskelzelle eine wichtige Rolle spielen, und einer Reihe von Gliedergürtelmuskeldystrophien herstellen (Laval and Bushby 2004). Momentan gibt es mehr als 31 etablierte genetische Formen der LGMD, jedoch kann eine beachtliche Anzahl von Patienten nicht genetisch klassifiziert werden (Nigro and Savarese 2014).

Beim Krankheitsbeginn, dem Voranschreiten und der klinischen Ausprägung von LGMD gibt es eine sehr hohe Variation. Manche Gliedergürteldystrophien haben einen relativ milden Verlauf, wohin gegen andere eine deutliche Progredienz zeigen. Bei denjenigen Formen, bei denen es zu einer schnellen Progression kommt, ist die Lebenserwartung aufgrund von Lungen- und Herzbeteiligung reduziert. Die klinischen Symptome können sehr unterschiedlich zwischen den einzelnen Formen der neuromuskulären Erkrankungen sein. So besteht besonders bei LGMD2I ein hohes

Risiko von dilatativer oder hypertropher Kardiomyopathie. Hingegen kann bei der LGMD2L-Form vor Krankheitsbeginn eine durchschnittlich höhere sportliche Leistungsfähigkeit beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen physischer Aktivität in der Kindheit und Ausbruch oder Voranschreiten der Krankheit konnte nur bei einigen Formen nachgewiesen werden, wie beispielsweise bei LGMD2I (Guglieri, Straub et al. 2008).

Die große Diversität, die bei LGMD-Patienten zu finden ist, beruht auf den vielfältigen Mutationen, welche die unterschiedlichen Funktionen der Myofibrillen beeinflussen. Mutationen, die für die Entstehung von LGMD relevant sind, wirken sich auf die kontraktilen Einheiten, die Lamina, das Sarkolemm oder das Zytoplasma aus (Campbell 1995, Cohn and Campbell 2000). Die verschiedenen Formen der Gliedergürtelmuskeldystrophie unterscheiden sich zum Teil deutlich voneinander. Unter anderem im betroffenen Gen und den damit verbundenen unterschiedlichen Proteinopathien, dem Voranschreiten der Krankheit, dem typischen Manifestationsalter, den Komplikationen oder der Lebenserwartung (Domingos, Sarkozy et al. 2017).

Dies soll auch die nachstehende Tabelle (Tab. 1) verdeutlichen, in der wesentliche Grundzüge des klinischen Phänotyps aufgelistet sind.

Form	Alte Nomenklatur	Gen	Protein	Kardiomyopathie
Dominant				
LGMD1D	LGMD1D	<i>DNAJB6</i>	HSP-40	Möglich
LGMD1F	LGMD1F	<i>TNPO3</i>	Transportin 3	Nicht beobachtet
LGMD1G	LGMD1G	<i>HNRPDL</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Nicht beobachtet
LGMD1I	LGMD1I	<i>CAPN3</i>	Calpain-3	Selten
Bethlem myopathy	-	<i>COL6A1</i> <i>COL6A2</i> <i>COL6A3</i>	Collagen Typ VI, Untereinheit alpha 1, 2, 3	Herz-Rhythmusstörungen (10%)
Rezessiv				
LGMD2A	LGMD2A	<i>CAPN3</i>	Calpain 3	Selten
LGMD2B	LGMD2B	<i>DYSF</i>	Dysferlin	Möglich
LGMD2C	LGMD2C	<i>SGCG</i>	gamma-Sarcoglycan	Selten
LGMD2D	LGMD2D	<i>SGCA</i>	alpha-Sarcoglycan	Selten

LGMDR5	LGMD2E	<i>SGCB</i>	beta-Sarcoglycan	Selten
LGMDR6	LGMD2F	<i>SGCD</i>	delta-Sarcoglycan	Selten
LGMDR7	LGMD2G	<i>TCAP</i>	Telethonin	Selten
LGMDR8	LGMD2H	<i>TRIM32</i>	Tripartite motif- containing 32	Nicht beobachtet
LGMDR9	LGMD2I	<i>FKRP</i>	Fukutin-related protein	Möglich
LGMDR10	LGMD2J	<i>TTN</i>	Titin	Nicht beobachtet
LGMDR11	LGMD2K	<i>POMT1</i>	Protein- <i>O</i> -mannosyl transferase 1	Nicht beobachtet
LGMDR12	LGMD2L	<i>ANO5</i>	Anoctamin 5	Nicht beobachtet
LGMDR13	LGMD2M	<i>FKTN</i>	Fukutin	Möglich
LGMDR14	LGMD2N	<i>POMT2</i>	Protein- <i>O</i> -mannosyl transferase 1	Selten
LGMDR15	LGMD2O	<i>POMGNT1</i>	<i>O</i> -linked Mannose beta 1,2 <i>N</i> -acetylglucosaminyl-Transferase	Nicht beobachtet
LGMDR16	LGMD2P	<i>DAG1</i>	Dystroglycan 1	Nicht beobachtet
LGMDR17	LGMD2Q	<i>PLEC</i>	Plectin	Nicht beobachtet
LGMDR18	LGMD2S	<i>TRAPPC11</i>	Trafficking protein particle complex 11	Nicht beobachtet
LGMDR19	LGMD2T	<i>GMPPB</i>	GDP-Mannose Pyrophosphorylase B	Möglich
LGMDR20	LGMD2U	<i>ISPD</i>	Isoprenoid Synthase Domain Containing	Möglich
LGMDR21	LGMD2Z	<i>POGLUT</i>	Protein <i>O</i> -Glucosyltransferase 1	Nicht beobachtet
LGMDR22	-	<i>COL6A2</i>	Collagen Typ VI, Untereinheit alpha 2	Nicht beobachtet
LGMDR23	-	<i>LAMA2</i>	Laminin alpha2	Häufig
LGMDR24	-	<i>POMGNT2</i>	Protein <i>O</i> -mannose beta-1,4- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase 2	Nicht beobachtet
LGMDR25	-	<i>POPDC1</i>	Popeye domain containing 1	Herz-Rhythmusstörungen
LGMDR26	-	<i>POPDC3</i>	Popeye domain containing 3	Nicht beobachtet

Tab. 1: Grundzüge der Gliedergürteldystrophien. LGMDD bezeichnet die autosomal-dominant vererbten Formen, LGMDR die rezessiven Formen (Bönnemann, Passos-Bueno et al. 1996, Mathews and Moore 2003, Hicks, Sarkozy et al. 2010, Reilich, Krause et al. 2011, Nigro and Savarese 2014, Domingos, Sarkozy et al. 2017). Eine mögliche Herzbeteiligung und die neue Nomenklatur der Gliedergürteldystrophien sind aufgeführt (Straub, Murphy et al. 2018).

In Anbetracht der klinischen und genetischen Variabilität und Heterogenität bei Patienten ist die Diagnose LGMD oft komplex zu stellen (Guglieri, Straub et al. 2008). Eine weitere Schwierigkeit stellt dar, dass es zu den verschiedenen klinischen Ausprägungen auch noch Ähnlichkeiten in der Symptomatik und Diagnostik zu

anderen Erkrankungen wie kongenitaler Muskeldystrophie, Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie oder Myofibrillärer Myopathie gibt. Spezifische klinische Ausprägungen können zu einer Diagnose hinführen, jedoch sind diese in den allermeisten Fällen nicht pathognomonisch. So kann sich der CK-Wert im Normbereich befinden, beispielsweise bei LGMD1A oder auch außerordentlich hoch sein, wie bei den rezessiven Varianten (z. B. LGMD2B), aber auch Ausnahmen sind bekannt. Das Elektromyogramm ist normalerweise myopathisch.

Auch die Magnetresonanztomographie (MRT) des Muskels kann Hinweise zur Diagnose geben. Es werden zunehmend spezifische Muster der Muskelbeteiligung für die jeweiligen Unterformen der Erkrankung identifiziert (Carlier, Mercuri et al. 2012). Ergänzend zeigt die Muskelbiopsie bei den meisten LGMDs dystrophe Veränderungen mit degenerierten und regenerierenden Muskelfasern. Dabei kann die Immunfluoreszenzanalyse von Strukturproteinen im Muskelbiopsiegewebe auf die richtige Diagnose hinweisen und hat eine bestätigte Genauigkeit von ca. 66% der LGMDs mit gesicherten genetischen Diagnosen.

Allerdings ist die genetische Ursache bei vielen Formen der Gliedergürtelmuskeldystrophien noch unbekannt, was zu Verzögerungen der Diagnostik führt. Durch geeignete genetische Analysen kann eine molekulargenetische Ursache bei bis zu 75% der Gliedergürtelmuskeldystrophie-Patienten gesichert werden. Die Einführung der Next-Generation-Sequencing (NGS)-Methode revolutioniert die Diagnostik, da immer mehr gezielte Gen-Panels getestet werden.

NGS-Ansätze sind besonders hilfreich für atypische Patienten aber auch für verbreitete klinische Phänotypen (Domingos, Sarkozy et al. 2017). Da in der heutigen Zeit die Liste der zu untersuchenden Gene zu umfangreich für die Einzelgen-Analyse wäre, sollten durch das zielgerichtete NGS jegliche Gene, die momentan mit dem klinischen Erscheinungsbild der Gliedergürtelmuskeldystrophie assoziiert sind, eingeschlossen werden (Nigro and Savarese 2014, Benarroch, Bonne et al. 2020).

1.2 Gliedergürtelmuskeldystrophie mit Herzbeteiligung

Innerhalb der Gruppe von Muskeldystrophien ist bekannt, dass Begleit-Kardiomyopathien auftreten können. Insbesondere bei der Becker-, Duchenne-, Emery-Dreifuss- und myotonen Muskeldystrophie wurden bereits Fälle mit Herzbeteiligung beschrieben. Dabei variieren die Ausprägung und die Charakteristika der Kardiomyopathie bei den verschiedenen Muskeldystrophien (Perloff, De Leon et al. 1966, Perloff, Roberts et al. 1967, Yamamoto, Matsushima et al. 1988, Emery 1989, Emery 1989, Berlitz and Stegaru-Hellring 1991, de Visser, de Voogt et al. 1992, Melacini, Fanin et al. 1993, Monségu, Duboc et al. 1993).

Der Zusammenhang zwischen Kardiomyopathien und Muskeldystrophien wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. Jedoch hat man dieser Beziehung bei Erstbeschreibung noch keine große klinische Bedeutung zugeschrieben. Dies liegt vor Allem daran, dass die Diagnose ‚progressive Muskeldystrophie‘ sehr weitläufig für Patienten mit auftretenden Myopathien verwendet wurde, ohne weitere systematische, genetische, oder phänotypische Klassifizierungen vorzunehmen (Zatuchni, Aegerter et al. 1951, Rubin and Buchberg 1952, Weisenfeld and Messinger 1952, Moore 1954, Jackson and O'Donnell 1960, Lowenstein, Arbeit et al. 1962, Shapiro, Ribeilima et al. 1964).

Innerhalb der Gliedergürtelmuskeldystrophien findet man Kardiomyopathien bei den Typen LGMD2C-F (Van der Kooij, De Voogt et al. 1998, Bushby 1999, Politano, Nigro et al. 2001). Diese werden durch Mutationen der Sarkoglykane hervorgerufen, welche in Herzmuskeln und Skelettmuskeln vorkommen. Es gibt fünf Typen von Sarkoglykanen (α , β , γ , δ und ϵ), wovon jede Mutation eine andere Art von Gliedergürtelmuskeldystrophie hervorrufen kann.

Eine Ausnahme bildet das ϵ -Sarkoglykan, bei dem bis heute noch keine Mutation mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte. Die Mutationen, welche die jeweilige Art von LGMD hervorrufen, werden in Tab. 2 dargestellt. Sarkoglykane sind Proteine, die einen Tetramerkomplex bilden und für die Stabilität der Muskelzellmembran eine wichtige Rolle spielen (Politano, Nigro et al. 2001).

Typ	Protein	Locus
LGMD2C	γ -Sarkoglycan	13q12
LGMD2D	α -Sarkoglycan	17q21.1
LGMD2E	β -Sarkoglycan	4q12
LGMD2F	δ -Sarkoglycan	5q33

Tab. 3: Gliedergürtelmuskeldystrophien mit Sarkoglykanopathien (Farah, Evans et al. 1980, Bäckman and Nylander 1992, Melacini, Fanin et al. 1993, Takenaka, Yokota et al. 1993, de Kermadec, Becane et al. 1994, Nigro, Comi et al. 1995, Boland, Silbert et al. 1996, Melacini, Vianello et al. 1996, Saito, Kawai et al. 1996, Hoogerwaard, de Voogt et al. 1997, Corrado, Lissoni et al. 2002, Koyama, Ray-Sequin et al. 2002).

Bei den Formen LGMD2H, LGMD2G, und LGMD2J wurden bislang noch keine Fälle mit Herzbeteiligung beschrieben (Bushby 1999).

1.3 Molekulargenetik bei dilatativer Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) beschreibt eine Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, welche sich durch Dilatation und Kontraktionsminderung des linken oder beider Ventrikel mit zusätzlicher systolischer Dysfunktion auszeichnen (Elliott, Andersson et al. 2007, Pinto, Elliott et al. 2016).

Dilatative Kardiomyopathie ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für Herzinsuffizienz und ist daher die häufigste Indikation für eine Herztransplantation (Elliott, Andersson et al. 2007). Die Prävalenz für dilatative Kardiomyopathie liegt bei 1:2.500 mit einer jährlichen Inzidenz von 7:100.000 (Manolio, Baughman et al. 1992, Taylor, Carniel et al. 2006, Elliott, Andersson et al. 2007).

Infektionen (Myokarditis)	Toxine und Drogen
Viral (einschließlich Parvovirus B19, HPV6, HIV) Bakteriell (einschließlich Lyme Borreliose) Pilzinfektionen Parasitische Infektionen	Eisenüberschuss, Alkohol Kokain, Amphetamine, Ecstasy Arsen, Kobalt anabole oder androgene Steroide Psychopharmaka Chemotherapie
Autoimmunerkrankungen	Nahrungsmangel
Riesenzellmyokarditis Polymyositis/Dermatomyositis Churg-Strauss Syndrom Granulomatose mit Polyangiitis Lupus erythematoses Sarkoidose	Selen-Mangel Thiamin-Mangel Zink- und Kupfer-Mangel
Angeborene Stoffwechselerkrankungen	Endokrinologische Erkrankungen
Carnitin-Mangel Glykogen-Speicherkrankheiten Mukopolysaccharidose Krankheiten der oxidativen Phosphorylierung Organoazidopathie	Schilddrüsenunterfunktion Schilddrüsenüberfunktion Nebennierenrindeninsuffizienz Cushing Syndrom Phäochromozytom Stress-Kardiomyopathie Akromegalie Diabetes mellitus

Tab. 3: Nicht-genetische Ursachen für die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie (nach Pinto, Elliott et al. 2016).

Die Hintergründe für die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie sind vielseitig und können in genetische und nicht-genetische Ursachen unterteilt werden. Zu den nicht-genetischen Ursachen zählen Toxine, Drogen, infektiöse Myokarditis, Autoimmunerkrankungen, Nahrungsmangel, endokrinologische Erkrankungen, angeborene Stoffwechselerkrankungen oder Störungen des Elektrolythaushalts. Eine Auswahl der zu Grunde liegenden Ursachen mit Beispielen wird in Tab. 3 dargestellt.

Dilatative Kardiomyopathie (DCM) wurde lange Zeit als Krankheit angesehen, die sporadisch auftritt und in keinem genetischen Zusammenhang steht. Nach der Definition spricht man von idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie, wenn die Krankheitsursache nicht bekannt ist (Mestroni, Maisch et al. 1999, Maron, Towbin et al. 2006). Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass dilatative Kardiomyopathien zu einem großen Teil genetisch bedingt sind. Bei etwa 35% der Fälle von DCM-Patienten konnte bei Familienangehörigen ebenfalls diese Krankheit festgestellt werden. Hier spricht man von familiärer dilatativer Kardiomyopathie (Michels, Moll et al. 1992, Grünig, Tasman et al. 1998).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass es über 50 Genmutationen gibt, welche mit dilatativer Kardiomyopathie in Verbindung stehen, darunter Deletionen, Insertionen, Missense-Mutationen oder alternative Spleißvarianten (McNally, Golbus et al. 2013). Die Symptome der dilatativen Kardiomyopathie können je nach Form langsam oder schnell auftreten und fallen je nach Stadium der Krankheit unterschiedlich schwerwiegend aus. Erste Symptome einer Herzinsuffizienz zeigen sich bei 80% der DCM-Patienten (Dec and Fuster 1994). Zu diesen Symptomen gehören Kurzatmigkeit, Erschöpfung bei leichter körperlicher Tätigkeit, Knöchel- und Unterschenkelödeme und übermäßiges Schwitzen. In fortgeschrittenen Stadien können auch gastrointestinale Beschwerden, Übelkeit, Ohnmacht, Synkopen und Herzrhythmusstörungen auftreten (Dec and Fuster 1994).

Eine erblich bedingte dilatative Kardiomyopathie wird als monogenetische Erbkrankheit nach Mendelscher Vererbungslehre entweder autosomal-rezessiv, autosomal-dominant, X-chromosomal, oder matrilinear vererbt. Matrilineare Vererbung von dilatativer Kardiomyopathie lässt auf einen mitochondrialen Gendefekt

schließen, da in der Regel die mitochondriale DNA lediglich von der Mutter vererbt werden kann. Sind bei der dilatativen Kardiomyopathie nur männliche Nachkommen betroffen, wird der Gendefekt durch den X-chromosomalen Erbgang weitergegeben. Erben beide Geschlechter die Mutation, ist die Vererbung autosomal (Manolio, Baughman et al. 1992, Towbin, Lowe et al. 2006, Elliott, Andersson et al. 2007, McNally, Golbus et al. 2013). In den meisten Fällen wird die Krankheit autosomal-dominant vererbt. Ist dies der Fall, haben die Nachkommen ein 50%iges Risiko, eine pathologische Genmutation zu tragen (Morales and Hershberger 2013). In Tab. 4 wird eine Zusammenfassung der wichtigsten Gene für genetische Ursachen dilatativer Kardiomyopathien dargestellt.

Assoziierte Gene	Vorkommen und Eigenschaften
Überwiegend kardialer Phänotyp	
<i>TTN</i> (Titin)	20 – 25% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>LMNA</i> (Lamin A/C)	5% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>MYH7</i> (Myosin heavy chain 7)	4% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>TMNT2</i> (Troponin T)	2% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>MYBPC3</i> (Myosin-binding protein C)	2% der familiären DCM, autosomal-dominant
<i>MYPN</i> (Myopalladin)	2% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>SCN5A</i> (Natriumkanal α -Untereinheit)	2% der familiären DCM; autosomal-dominant
<i>PLN</i> (Phospholamban)	1% der familiären DCM; autosomal-dominant
Neuromuskuläre Erkrankungen	
<i>DMD</i> (Duchenne Muskeldystrophie)	X-chromosomale Vererbung; Anstieg des Serum-Kreatinkinase-Spiegels
<i>BMD</i> (Muskeldystrophie Becker-Kiener)	X-chromosomale Vererbung; Anstieg des Serum-Kreatinkinase-Spiegels
Syndromatische Krankheiten	
Mitochondriale Krankheiten	Mitochondriale Vererbung; syndromische Expression und Myopathie der Skelettmuskulatur
TAZ/G4.5 (Tafazzin)	X-chromosomale Vererbung; Barth-Syndrom

Tab. 4: Genetische Ursachen von dilatativer Kardiomyopathie (DCM) (Pinto, Elliott et al. 2016).

Die Effekte der Genmutationen, welche mit dilatativer Kardiomyopathie in Verbindung stehen, sind vielfältig und betreffen zahlreiche Gene, die den mechanischen Ablauf der Herzmuskelkontraktion auf molekularer Ebene beeinträchtigen. Bisher wurden in Zusammenhang mit dilatativer Kardiomyopathie Mutationen identifiziert, welche

Bestandteile des Sarkomers, der Kernhülle, des Zytoskeletts und der Mitochondrien betreffen. Des Weiteren konnten auch Mutationen identifiziert werden, die die Transkription essentieller Proteine verändern (Weintraub, Semsarian et al. 2017).

Der häufigste Phänotyp genetisch bedingter dilatativer Kardiomyopathie wird klinisch durch eine neuromuskuläre Krankheit mit begleitender Herzbeteiligung klassifiziert. Diejenigen Gene, die am häufigsten mit diesem Phänotyp in Verbindung stehen, sind Titin und Lamin A/C, welche 25% bzw. 5% aller Fälle von autosomal-dominanter dilatativer Kardiomyopathie ausmachen (Fatkin, MacRae et al. 1999, Gerull, Gramlich et al. 2002, Parks, Kushner et al. 2008). Lamin A und C gehören zu der Klasse der Intermediärfilamente und spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilität der Kernhülle. Titin ist ein Baustein des Sarkomers, der pathogene Auswirkungen hat, wenn eine verkürzte Version des Gens vorhanden ist (Herman, Lam et al. 2012).

Die Vielfalt der beteiligten Gene und die einhergehenden mechanistischen Beeinträchtigungen verdeutlichen die Komplexität dieser Krankheit. Bis heute wurden zahlreiche Mechanismen identifiziert, welche die Entstehung von dilatativer Kardiomyopathie erklären können. Es ist denkbar, dass nicht nur eine monogenetische Ursache, sondern auch ein oligogenetischer Ursprung der Erkrankung zugrunde liegen kann. Jedoch konnte bis heute keine Untersuchung einen ausreichenden Einblick in die komplette genetische Komplexität der dilatativen Kardiomyopathie geben (Weintraub, Semsarian et al. 2017).

Obwohl ein Viertel aller diagnostizierten DCM-Patienten eine hereditäre Form der Krankheit haben, wird der familiären Form immer noch wenig Beachtung in der Klinik geschenkt, obwohl durch eine frühe Entdeckung der Krankheit der Krankheitsverlauf präventiv positiv beeinflusst werden könnte. In klinischen Screening- und echokardiographischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die kardiale Erkrankung bei 20-35% der Nachkommen weitervererbt wurde (Michels, Moll et al. 1992, Grünig, Tasman et al. 1998, Taylor, Carniel et al. 2006).

Bisher wurden 16 Gene identifiziert, die mit dilatativer Kardiomyopathie in Verbindung stehen (McNally, Golbus et al. 2013, Morales and Hershberger 2013). Das in dieser Studie untersuchte Gen, *PABPC1*, könnte auch mit dilatativer Kardiomyopathie assoziiert sein und wurde deswegen als potentieller Kandidatengen untersucht.

1.4 Die Rolle des Kandidatengens *PABPC1* in der Translation

Die Funktion, Form und das Wachstum jeder Zelle hängt maßgeblich von ihrer Proteinbiosynthese ab. Je nach Zelltyp werden diverse Proteine unterschiedlich stark exprimiert und definieren dabei die Funktion und Art der Zelle. Die Proteinexpression variiert sehr stark zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Organismus (Allfrey, Daly et al. 1953, Garlick, McNurlan et al. 1980, Garlick, Wernerman et al. 1991). Die globalen Expressionslevel sind sehr dynamisch und unterliegen stark regulierten Mechanismen (Buszczak, Signer et al. 2014).

Die Proteinexpression von adulten Herzzellen gehört zu den niedrigsten innerhalb der somatischen Zelltypen. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Proteinexpression zunimmt, wenn der Organismus Stress oder hypertrophen Stimuli ausgesetzt wird (Garlick, McNurlan et al. 1980, Lewis, Kelly et al. 1984).

Der zu Grunde liegende Mechanismus der Proteinexpression ist die Transkription der DNA in mRNA und anschließend die Translation der mRNA in ein Protein. Die eukaryontische Translation kann in vier grundlegende Schritte unterteilt werden, die Initiation, die Elongation, die Termination und das Recycling der Ribosomen (Abb. 1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Proteinbiosynthese ist die Initiation der Translation (Aitken and Lorsch 2012).

Die Initiation der Translation beginnt in Eukaryonten meist mit der Erkennung des Startcodons durch den 43S Präinitiationskomplex (PIC), welcher aus der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit, den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 und eIF5, GTP und der Initiator-tRNA (Methionyl-tRNA) besteht. Der PIC bindet an 5'-Ende der zuvor zyklisierten und aktivierten mRNA und scannt den untranslatierten Bereich (UTR) am 5' Ende nach dem Startcodon AUG ab.

Die Aktivierung der mRNA erfolgt durch die Bindung des eIF4F Komplex an die 5'-Kappe. Der eIF4F Komplex besteht aus den drei Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4A und eIF4G. Die Funktion von eIF4E ist die Bindung der 5' m⁷G-Kappe der mRNA. Das eIF4A Protein ist eine Helikase und entwindet vorhandene Sekundärstrukturen der mRNA. Das eIF4G Protein ist ein Adaptermolekül, welches den Multiproteinkomplex eIF3 bindet, um den PIC zu rekrutieren. Zudem bindet eIF4G das „polyadenylate-binding protein“ (PABP), um die die mRNA zu zyklisieren.

Nachdem der 43S PIC die mRNA in 5'- nach 3'-Richtung nach dem Startcodon AUG

abgesucht hat, erfolgt die Erkennung des Startcodons AUG durch die Initiator-tRNA. Die Interaktion zwischen dem 5' untranslatierten Bereich, dem eIF4F Komplex und dem 43S PIC, nennt man 48S Präinitiationskomplex.

Die Bildung des 48S PICs hat die Hydrolyse des GTP gebundenen eIF2 zur Folge. Die Hydrolyse von eIF2-GTP führt zum partiellen Verlust von eIF2-GDP, zur vollständigen Dissoziation der Initiationsfaktoren eIF1, eIF3 und eIF5 vom 48S PIC und zur Rekrutierung der 60S Untereinheit des Ribosoms.

Der fertige 80S Initiationskomplex kann nun die passende Aminoacyl-tRNA in die Aminoacyl (A)-Stelle des Ribosoms aufnehmen und mit der Bildung eines Peptids beginnen (Jackson, Hellen et al. 2010). Nach der Initiation der Translation folgt die Elongation. Dabei werden Peptidbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren ausgebildet.

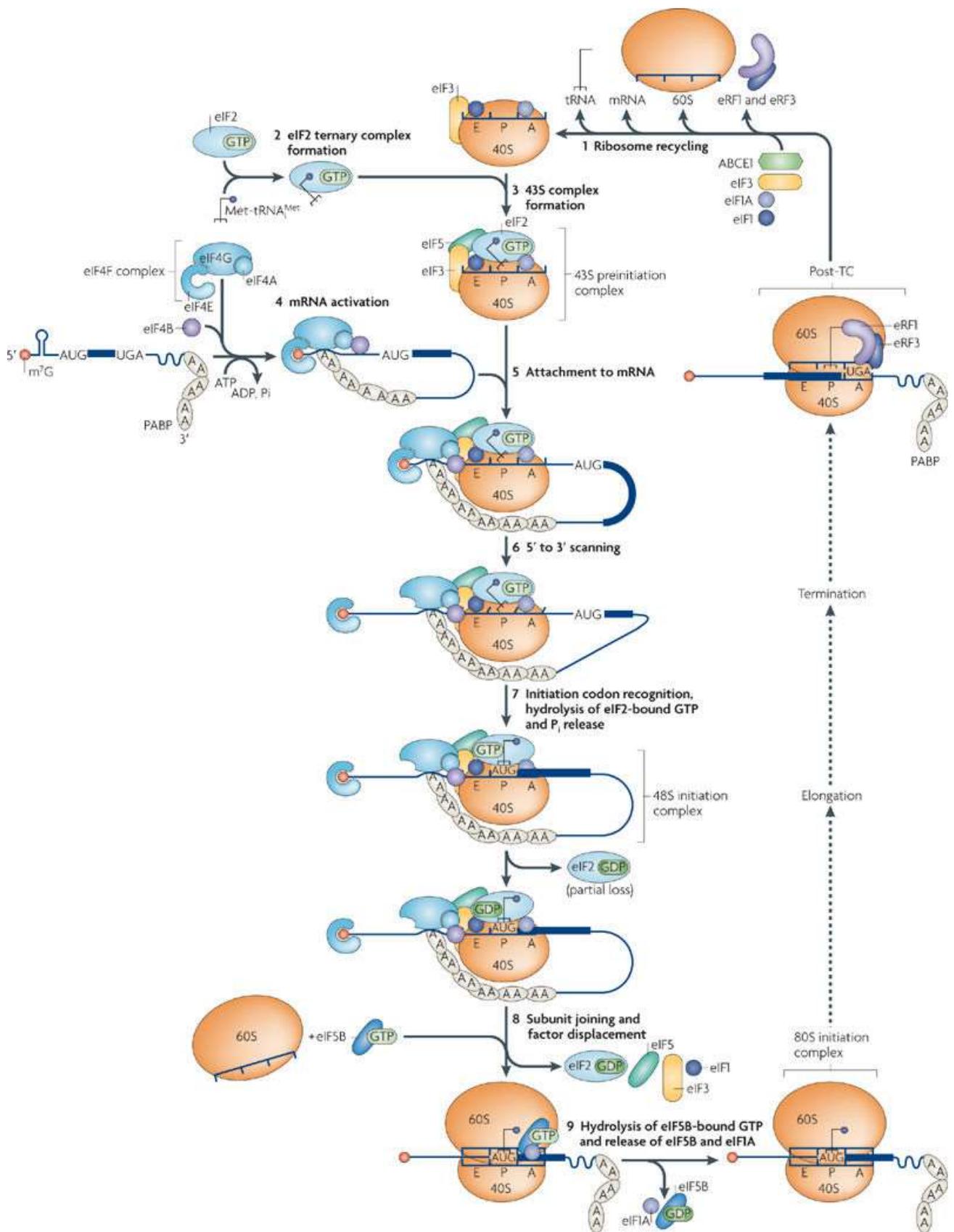
Die Elongation verläuft grundsätzlich in drei Schritten: Zunächst bindet die zum Codon passende Aminoacyl-tRNA A-Stelle des Ribosoms. Im nächsten Schritt wird eine Peptidbindung in der Peptidyl (P)-Stelle des Ribosoms ausgebildet. Letztlich wird die Anfangssituation wiederhergestellt und so häufig wiederholt bis ein Stoppcodon die Termination der Translation einleitet (Lippmann, Lindschau et al. 1993).

Abb. 1 (s. folgende Seite): Die Initiation der Translation in Eukaryonten (Jackson, Hellen et al. 2010).

Die Translation ist ein zyklischer Prozess, welcher mit dem Recycling der 80S Ribosomen in die 40S – und 60S Untereinheiten, durch die Bindung von Releasefaktoren (eRF1, eRF3), beginnt (1). Anschließend wird der „ternäre Komplex“ gebildet, welcher aus der Met-tRNA und eIF2 besteht (2). Dieser Komplex bindet assoziiert mit der 40S Untereinheit, eIF3 und eIF5, woraufhin der 43S Präinitiationskomplex (PIC) gebildet wird (3).

Die mRNA wird durch die Bindung des eIF4F Komplexes an die 5'-Kappe und PABP aktiviert und zyklisiert (4). Im Anschluss bindet der PIC an die mRNA (5) und scannt den 5' UTR in 5'-3'-Richtung nach dem Startcodon AUG (6).

Die Erkennung des Startcodons hat die Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTPs zur Folge (7). Nach der Erkennung des Startcodons wird die 60S Untereinheit rekrutiert (8) und eIF2-GDP, eIF5, eIF3 und eIF1 werden freigesetzt (9). Nun kann die Elongation erfolgen, welche durch die Erkennung des Stoppcodons terminiert wird und das Recycling der Ribosomen (1) zur Folge hat.



Die Proteinexpression im adulten Herzen gehört zu den niedrigsten im Vergleich zu anderen Gewebearten (Abb. 2). Jedoch erhöht sich die Proteinexpression im adulten Herzen stark als Reaktion auf Stress und humorale Faktoren (Lewis, Kelly et al. 1984, Garlick, Wernerman et al. 1991, Buszczak, Signer et al. 2014). Obwohl es bekannt ist, dass die Proteinsyntheserate im Herzen unter Stress oder bei Krankheiten ansteigt, hat man bisher noch keine wegweisende zellbiologische Erklärung für diese Ursache gefunden. Die Erforschung dieser Fragestellung könnte dazu führen, ein grundlegendes Verständnis dafür zu bekommen, weshalb und auf welche Art Zellen ihre Proteinsynthese regulieren, um letztendlich neue Therapieansätze für Patienten mit Herzkrankheiten zu entwickeln (Chorghade, Seimetz et al. 2017).

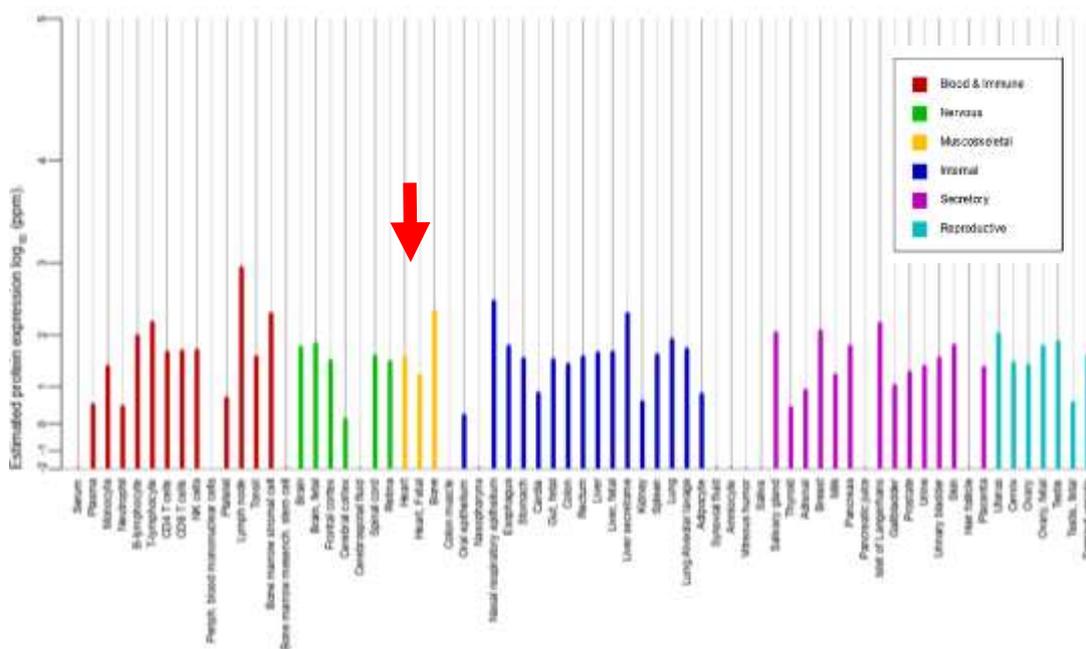


Abb. 2: Die PABPC1-Proteinexpression verschiedenen humanen Geweben. Die Proteinexpression im Herzmuskel findet sich im Vergleich zu anderen Gewebearten im mittleren bis niedrigeren Bereich (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PABPC1>, aufgerufen am 16.02.2021).

Das Kandidatengen *PABPC1* spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinexpression. Zu Beginn der Translation interagiert *PABPC1* mit dem eIF4F Komplex und der 5'-Cap-Struktur der Messenger RNA (mRNA). Der resultierende Messenger-Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplex ist essentiell für die Rekrutierung der Ribosomen, schützt die mRNA vor Exonukleasen und ermöglicht die Initiation der Translation (Gallie 1991, Tarun and Sachs 1996, Amrani, Ghosh et al. 2008, Park, Walker et al.

2011, Safaee, Kozlov et al. 2012). Aus diesem Grund wird angenommen, dass das PABPC1-Protein die Proteinexpression regulieren kann.

Die Forschungsarbeiten von Chorghade, Seimetz et al. haben bereits gezeigt, dass PABPC1 in den Herzen von Mäusen vor ihrer Geburt reichlich vorkommt. Im Gegensatz dazu kann PABPC1 in adulten Mäuseherzen nicht detektiert werden (Chorghade, Seimetz et al. 2017). Allerdings sind die mRNA-Spiegel für das PABPC1-Protein im pränatalen und adulten Herzen von Mäusen gleich. Das ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Translation der PABPC1-mRNA im adulten Herzen ineffizient ist.

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Unterschied zwischen der pränatalen und adulten PABPC1-mRNA an der unterschiedlichen Länge des Poly(A)-Strangs liegt. Generell gilt, dass mRNAs mit einem langen Poly(A)-Strang effizienter translatiert werden als jene mit kurzen. Da die pränatale PABPC1-mRNA einen viel längeren Poly(A)-Strang besitzt als die adulte, wird angenommen, dass das der Grund für die unterschiedlich hohe Proteinbiosyntheserate von PABPC1 ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Poly(A)-Strang in hypertrophen Herzmuskelzellen verlängert ist (Chorghade, Seimetz et al. 2017).

Bei der hereditären Myotonen Dystrophie Typ 2 (PROMM, proximale myotone Muskeldystrophie) zeigte sich eine pathologisch verminderte Expression von PABPC1 verursacht durch eine bekannte Fehlregulation von RNA-bindenden Proteinen bei dieser Muskelerkrankung (Wei, Stock et al. 2018). Dieser Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von PABPC1 für die Aufrechterhaltung eines intakten Skelettmuskelgewebes und die Funktion der Gliedergürtelmuskulatur.

1.5 Oligogenetische Erkrankungen

Nur etwa 2% aller genetisch bedingten Krankheiten haben eine monogenetische Ursache. Das bedeutet, dass nur ein einziges mutiertes Gen ausreichend ist, um den Phänotyp einer Krankheit zu verursachen. Die meisten Erkrankungen haben jedoch oligogenetische Ursachen. Die Kombination aus vielen Mutationen sorgt im Zusammenspiel für die Entstehung der Krankheit.

Gliedergürtelmuskeldystrophien stellen eine heterogene Gruppe neuromuskulärer Krankheiten dar, die ein breites Ursachenspektrum haben. Seit 1994 das erste Gen identifiziert wurde, welches mit Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD) in Verbindung steht, hat man bis heute zahlreiche genetische Defekte identifiziert, die für die über 30 LGMD-Untertypen verantwortlich sind (Straub, Murphy et al. 2018).

Da die Gliedergürteldystrophien ein breites phänotypisches und molekulargenetisches Spektrum haben, besteht hier insbesondere die Notwendigkeit ein besseres Verständnis der Erkrankungen auf molekularer und systemischer Ebene zu finden, um die einzelnen Muskelkrankheiten besser zu diagnostizieren und zu behandeln. Neue Sequenzierungstechniken können es ermöglichen, oligogenetisch vererbte Gendefekte auffindig zu machen, um schwer diagnostizierbare Formen von LGMD zu detektieren (Thompson and Straub 2016). Es wurde aufgrund der Datenlage von bereits durchgeführten Sequenzierungen des Exoms sogar empfohlen, LGMD ganz als oligogenetische Krankheit zu betrachten. Dabei sollten die variablen klinischen Symptome als Konsequenz von einer Kombination aus Mutationen angesehen werden, die zu einem breiten phänotypischen Spektrum führen (Fichna, Macias et al. 2018).

Dilatative Kardiomyopathien (DCM) werden als monogenetische Erkrankungen betrachtet. Bei DCM sind jedoch einige Gene beteiligt, die über unterschiedliche Genvarianten/Spleißvarianten verfügen. Daher kann es sinnvoll sein, die Ursache der Entstehung nicht als monogenetisch zu vereinfachen, sondern ein breiteres Spektrum von molekularen Ursachen in Betracht zu ziehen

2 PROBLEMSTELLUNG

Bei Patienten mit neu auftretenden degenerativen Muskeldystrophien stellt es im modernen klinischen Alltag bis heute eine große Herausforderung dar, eine umfassende Diagnostik durchzuführen. Diese sollte klinische Untersuchungen, Familienanamnese, Histologie der Skelettmuskulatur und insbesondere molekulargenetische Analysen einschließen. Da genetisch bedingte neuromuskuläre Erkrankungen selten vorkommen, ist es wichtig, eine genauere Klassifizierung der Symptomatik im Hinblick auf den Genotyp vorzunehmen, um die Behandlung und Prognose der Patienten zu verbessern. Eine präzise Diagnostik könnte auch künftig vielversprechende Therapieformen im Bereich der personalisierten Medizin ermöglichen.

Da das Krankheitsbild der Gliedergürtelmuskeldystrophien ein breites phänotypisches Spektrum aufweist, ist die Diagnose häufig schwierig zu stellen. Die Diagnostik kann zusätzlich erschwert sein, wenn mehrere genetische Ursachen innerhalb einer Familie segregieren und unterschiedlichen Phänotypen sowie klinischen Ausprägungen zugeordnet werden können. Um die Diagnose von LGMD zu verbessern und zu beschleunigen, ist es notwendig eine vollständige Liste von potentiellen Gendefekten, die mit den mehr als 30 Subtypen von LGMD in Verbindung stehen, aufzustellen. Ein potentielles Gen, welches bei Patienten mit LGMD und Herzbeteiligung eine Rolle spielen könnte, ist das Kandidatengen *PABPC1*. Da *PABPC1* schon mit Hypertrophien in Muskelzellen in Verbindung gebracht wurde, wurde in dieser Studie getestet, ob es Anhaltspunkte gibt, dass *PABPC1*-Genvarianten eine Rolle bei der Entstehung von LGMD mit Herzbeteiligung spielen können. Da eine kardiale Beteiligung bei neuromuskulären Krankheiten eine häufige Nebendiagnose darstellt, wurde diesem klinisch bedeutenden Aspekt in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut

Um die genomische DNA (gDNA) aus dem peripher entnommenen Vollblut zu extrahieren, wurde der Wizard Genomic DNA Purification Kit (A1125, Promega, Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Dieses Kit ist unter anderem zur Isolation von genomischer DNA aus peripheren Leukozyten gut geeignet. Für eine 10 ml EDTA-Vollblutprobe wurden 30 ml Zell-Lysepuffer in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Zur gründlichen Durchmischung wurde das Blutröhrchen schonend geschwenkt. Das Lysat wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (hypotone Lyse der roten Blutkörperchen). Anschließend wurde das Lysat bei 2000 xg für 10 min zentrifugiert und die Leukozyten pelletiert. Die flüssige Phase wurde verworfen. Das weiße Pellet wurde in der verbliebenen Restflüssigkeit stark gevortext, um die Leukozyten komplett zu resuspendieren. Um die Leukozyten zu lysieren, wurden 10 ml Nuclei Lysis Solution zugegeben und die visköse Lösung 5-6 Mal auf- und abpipettiert. Sollte es zur Klümpchen-Bildung kommen, musste eine Inkubation bei 37°C erfolgen, bis sich diese Klumpen wieder gelöst haben. Nach einer Stunde wurde überprüft, ob noch Klümpchen sichtbar sind. Falls Restklümpchen vorhanden waren wurden erneut 3 ml der Nuclei Lysis Solution hinzugefügt und die Inkubation wiederholt.

War die Lösung homogen, wurden 3,3 ml der Protein Precipitation Solution zum Zell- und Zellkernlysat zugegeben und für 10 - 20 sec stark gevortext. Hierbei können sich optional kleine Protein-Aggregationen bilden. Nach der Zentrifugation bei 2000 xg für 10 min war ein dunkelbrauner Bodensatz sichtbar.

Der flüssige DNA-haltige Überstand wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Isopropanol überführt. Um die genomische DNA zu fällen, wurde das Röhrchen vorsichtig umgeschwenkt.

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2000 xg für 1 min bei Raumtemperatur wurde die DNA als weißes Pellet sichtbar.

Durch Dekantieren des flüssigen Überstandes und Hinzufügen von 10 ml 70% Ethanol wurde die DNA gewaschen und überschüssiges Salz aus der Fällung entfernt. Erneut wurde mit 2000 xg für 1 min zentrifugiert, um die gereinigte genomische DNA zu pelletieren. Mit höchster Vorsicht wurde der Überstand nun abgesaugt, mit dem Ziel

das instabile DNA-Pellet im Röhrchen zu belassen. Anschließend wurde die verbliebene DNA an der Luft für 10 - 15 min getrocknet.

Um die DNA zu rehydrieren und zu lösen, wurde sie in 800 µl einer DNA-Rehydratationslösung aufgenommen und für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Alternativ konnte eine Rehydrierung der DNA durch eine Inkubation über Nacht erfolgen. Die Lagerung der extrahierten genomischen DNA erfolgte bei 2 - 8°C.

3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine äußerst wichtige Methode in der modernen Molekularbiologie. Diese wurde von Kary Banks Mullis entwickelt (Mullis, Faloona et al. 1986). Die PCR-Methode ermöglicht es, extrem geringe Mengen DNA höchst spezifisch zu vervielfältigen, um diese weiter zu analysieren.

Die exponentielle Amplifizierung eines zuvor ausgewählten DNA-Abschnittes wird mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotidprimern ermöglicht. Jeder Zyklus, des sich immer wieder wiederholenden Vorgangs unterteilt sich in drei Phasen: Zuerst wird die DNA bei einer Temperatur von 95°C denaturiert, sodass die Matrizen-DNA in zwei Einzelstränge aufgespalten wird. Danach folgt die Phase des Annealings, also die Anlagerung des Primerpaars an ihre zuvor spezifisch ausgewählte komplementäre Sequenz. In dieser Phase wird die Temperatur zwischen ca. 55-63°C variiert, um die optimale Schmelztemperatur des Primerpaares zu erreichen. Anschließend erfolgt der letzte Schritt des Zyklus, die Elongation bei 72°C. Bei dieser Temperatur hat die hitzestabile DNA-Polymerase optimale Synthesebedingungen, da dieses Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* („Taq-Polymerase“) stammt. Die Taq-Polymerase verlängert die Primer, beginnend mit dem freien 3`OH-Ende mit den dNTPs im Reaktionsansatz, die komplementär angeknüpft werden. So wird der Oligonukleotidprimer verlängert und ein neuer Doppelstrang synthetisiert.

3.2.1 Primersequenzen

In dieser Studie wurden die kodierenden Exons des *PABPC1*-Gens aus einer Kohorte von 11 Patienten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente wurden mit der Sanger-Methode sequenziert und im Anschluss auf relevante Mutationen untersucht.

Die endgültigen verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tab. 5 dargestellt.

Exon	Primer	Sequenz	Exon-Länge (bp)	PCR Produkt Länge	Tm (°C)
1	PABPC1_1F_long	5'-GGCGCGGGGTATAAGTAGAG-3'	193	977	60
	PABPC1_1R_long	5'-TGAGGCCGAGAAAATGGTCG-3'			60
1	PABPC1_1F_short	5'-TGCGGCCGTTGAGTAGTTTT-3'	193	645	61
	PABPC1_1R_short	5'-AACCGAATCTCACCCACCCT-3'			61
2-3	PABPC1_2-3F	5'-CTTAAAGAGGAAGCGTTCAACTG-3'	508	744	53
	PABPC1_2-3R	5'-TCTTATGTGCATCTAACTTCTCCC-3'			54
4	PABPC1_4F	5'-AAATTATGGCCCTATTCTATTTTG-3'	140	547	59
	PABPC1_4R	5'-TAGTGTAATAGATGGCCAGCAGC-3'			60
5-6	PABPC1_5-6 F	5'-TGGAAAAGTATACCTACCTGGGG-3'	530	791	55
	PABPC1_5-6R	5'-CTATTCCCCTCTCAAACCCTC-3'			54
7	PABPC1_7 F	5'-GGGGTAAATAATAGACCCGATG-3'	96	395	53
	PABPC1_7R	5'-ATCATGTGAGGATATCAGCCTTC-3'			53
8-9	PABPC1_8-9F	5'-TGTAGTTTGCCCTTAATAATTGG-3'	599	865	50
	PABPC1_8-9R	5'-TTGACATAGAAGAGCTGATTTACCC-3'			54
10-11	PABPC1_10-11 F	5'-CTGGGAAAATGGCAAGTGTTAAG-3'	347	888	61
	PABPC1_10-11R	5'-AAACTCCTGGTCTCAAGCAATC-3'			60
12	PABPC1_12F	5'-ATGGAAGTCTACCACTTCAGCAG-3'	85	340	55
	PABPC1_12R	5'-TGGTTTTAATTAGGCAGACCAAC-3'			52
13	PABPC1_13F	5'-GAAGTATGGTTCTTAAACCCAG-3'	131	373	53
	PABPC1_13R	5'-AAATAGCGCCACAGGTTATTATG-3'			52
14	PABPC1_14F	5'-AAACTTATCTTTGTTGGGAATTGG-3'	93	380	51
	PABPC1_14R	5'-CCAACAGTTAACGGGTAAAATTC-3'			52

Tab. 5: Primersequenzen für Exon 1-14 im *PABPC1*-Gen. Primer-Sequenzen, PCR-Fragmentlängen und Annealing-Temperaturen für „reverse“- und „forward“-Primer der Exons 1-14 des *PABPC1*-Gens.

Das Primerdesign für intronische Primer zur Amplifikation einzelner Exons oder kombinierter Exons und flankierender intronischer Bereiche erfolgte zunächst mit Hilfe der verlinkten ExonPrimer-Anwendung auf der Webseite des UCSC Genome Browser (Kent, Sugnet et al. 2002).

Die ExonPrimer Anwendung lieferte auch bei mehrfacher Anpassung der Suchparameter (u. a. Annealing Temperatur, Primerlängen, Abstand der

Primerposition zum kodierenden Exon) keine Primervorschläge für Exon 1. Daher wurden die beiden verwendeten Primerpaare für Exon 1 über die Primer-BLAST-Design-Anwendung generiert (Ye, Coulouris et al. 2012). Die Kartierung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer wurde mit Hilfe der PrimerMap-Web-Anwendung aus der Sequence Manipulation Suite generiert (Stothard 2000) und findet sich im Anhang 8.2.

3.2.2 Reaktionsbedingungen

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf), in welchen die Reaktionsansätze gestellt wurden. Deren Zusammensetzung wird in Tab. 6

Tab. 1

Komponente	Volumen	Endkonzentration
2x Maxima Hot-Start-Green PCR Mastermix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	25 µl	1x
Sense/forward Primer	1 µl	50 pmol
dH ₂ O	22	-
Antisense/reverse primer	1 µl	50 pmol
gDNA	1 µl	100-500 ng

Tab. 6: 50 µl PCR Mix Ansatz. Standard PCR-Protokoll

Das verwendete Standard-PCR-Programm zur Vervielfältigung der kodierenden Sequenzen und angrenzender intronischer Bereiche des Kandidatengens *PABPC1* ist in Tab. 7 angegeben

Variation des PCR-Programms:

Bei verschiedenen Primern wurde die Annealing-Temperatur je nach G:C-Gehalt optimiert. Bei längeren PCR-Fragmenten wurde die Elongationszeit versuchsweise auf 1-2 Minuten erhöht.

Außerdem wurde versucht, durch den Zusatz von 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) die Bildung der Sekundärstrukturen bei der Template-DNA zu verringern (Hung, Mak et

al. 1990). DMSO wirkt denaturierend auf DNA und kann die Stringenz und Effizienz der PCR erhöhen. Des Weiteren wurde auch die Zugabe von 7-deaza-dGTP getestet, um die Spezifität der PCR-Reaktion bei GC-reichen Sequenzen zu optimieren.

Temperatur	Zeit	
95°C	30 sec	40x
59°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Tab. 7: Standard PCR Programm. Zyklen und Temperaturangaben, die standardmäßig verwendet wurden.

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Stränge nach der Größe aufgetrennt. DNA ist durch ihre Phosphatreste (PO_4^{3-}) negativ geladen und wandert im elektrischen Feld vom negativ geladenem Pol (Kathode) zum positiv geladenem Pol (Anode). Hierbei bewegten sich kleinere Moleküle schneller durch das Agarose-Netz voran als größere Moleküle.

Durch den ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenmarker (100 bp-Marker) wurde die Bandengröße bestimmt. Um diese Auftrennung durchzuführen, benötigte man ein einprozentiges Agarosegel mit TAE-Puffer und Ethidium-Bromid (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{l/ml}$, Stammlösung 10 mg/ml). Zur Herstellung eines mittelgroßen Gels (ca. 10 x 16 cm^2) wurden 1,6 g Agarose abgewogen und mit 160 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Dieser setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 0,4 M Tris-HCl
- 10 mM Na_2 EDTA
- 0,2 M Essigsäure

Nach dem Lösen und Abkühlen auf eine handwarme Temperatur wurden 8 μl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die flüssige Gellösung in einen Gelschlitten mit einem Kamm gegossen. Nach dem Festwerden wurde das Gel

nach einer halben Stunde in eine Elektrophoresewanne eingesetzt. Der Kamm wurde entfernt, so dass kleine Taschen entstanden. Die Gelelektrophoresewanne wurde ebenfalls mit TAE-Puffer gefüllt. In die erste Tasche wurde der Marker (10 µl Gene Ruler 100 bp DNA-Leiter, 0,1 µg/µl, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert, der die Größenzuordnung der PCR-Fragment ermöglichte. In die weiteren Taschen wurden die PCR-Reaktionen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 125 V über 1 h durchgeführt. Danach wurden die PCR-Fragmente unter UV-Licht betrachtet, fotografisch dokumentiert, spezifische Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus den Gelblöckchen extrahiert.

3.4 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte durch Gelextraktion. Bei der Gelextraktion wurden die unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Banden mit Hilfe des Nucleic Acid Purification Kits (Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers aufbereitet und die eluierten DNA-Fragmente bei 4°C aufbewahrt.

3.5 Sequenzanalyse und Auswertung

Die Sanger-Sequenzierung wurde erstmals 1977 von dem britischen Biochemiker Frederik Sanger und seinem Kollegen Coulson der Weltöffentlichkeit vorgestellt, als sie das komplett sequenzierte Genom eines Bakteriophagen publizierten (Sanger, Nicklen et al. 1977). Dafür erhielt Sanger 1980 den Nobelpreis für Chemie.

Bei der Sanger-Sequenzierung werden DNA-Fragmente durch eine DNA-Polymerase mit Abbruch-Nukleotiden erstellt und nachfolgend über Gelelektrophorese die Sequenz bestimmt. Die Sanger-Sequenzierung basiert auf einer Abfolge von Reaktionen, bei der die zu sequenzierende DNA-Matrize zunächst denaturiert wird. Im Anschluss findet das Primer-Annealing statt und die Verlängerung des DNA-Fragments (Sanger, Nicklen et al. 1977). Bei der Sanger Sequenzierung werden neben den üblichen 2-Desoxyribonucleotidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) zusätzlich Didesoxynucleotidtriphosphate (ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP)

verwendet. Diese sogenannten Abbruch-Nukleotide verursachen aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe beim Einbau den Abbruch der DNA-Strangsynthese. Dadurch erhält man eine Mischung mit unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, welche statistisch betrachtet nach jedem vorkommenden Nukleotid aufhören. Die DNA-Fragmente werden über Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Abbruch-Nukleotiden sichtbar gemacht.

Die direkte Sequenzierung der PCR-Fragmente erfolgte über Eurofins Genomics, Ebersberg. Hierzu wurden pro Reaktionsansatz 9 µl des gelextrahierten DNA-Fragments und 1 µl Primer (0,5 µMol) in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Die Sequenzierung wurde über die Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt. Anschließend wurden die Elektropherogramme visuell auf Doppelpeaks als möglichen Hinweis auf heterozygote Sequenzvarianten überprüft. Des Weiteren erfolgte der Vergleich mit der Wildtypsequenz des humanen *PABPC1* (NG_027520, Gene-ID: 26986) auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (Altschul, Gish et al. 1990), um Hinweise auf einen homozygoten Basenaustausch zu finden.

3.6 Bewertung der Pathogenität einer Sequenzvariante

Zur Bewertung der Pathogenität von Sequenzvarianten wurden Internet-basierte Algorithmen eingesetzt, wie z. B. die Webanwendung Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) oder die PROVEAN Homepage (http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php?species=human), beide aufgerufen am 16.02.2021, die die Nutzung der Vorhersage-Algorithmen SIFT, PolyPhen-2 und PROVEAN ermöglichte (Kumar, Henikoff et al. 2009, Adzhubei, Schmidt et al. 2010, Choi, Sims et al. 2012)

Die Anwendungen sind auch separat über folgende Web-Adressen zugänglich:

http://provean.jcvi.org	(Choi, Sims et al. 2012)
http://sift.jcvi.org	(Kumar, Henikoff et al. 2009)
http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	(Adzhubei, Schmidt et al. 2010)

4 ERGEBNISSE

4.1 Familienuntersuchung mit unklaren Sequenzvarianten im *PABPC1*-Gen

Im Rahmen einer Familienuntersuchung bei einer bislang noch nicht identifizierten hereditären Gliedergürtelmyopathie mit fraglicher Herzbeteiligung hatten sich im Vorfeld der Arbeit im Rahmen von Exom-Analysen verschiedene unklare Sequenzvarianten im *PABPC1*-Gen gezeigt, die mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert werden sollten.

In Abb. 3 ist eine Übersicht der Sequenzdaten des *PABPC1*-Gens aller vier untersuchten Familienmitglieder dargestellt. Unstimmigkeiten mit der Referenzsequenz sind farblich markiert. Die Referenzsequenz und ihre Exon/Intronstruktur sind unten am Rand der Bildschirmdarstellung zu finden. Exons sind als blaue Kästchen, Introns und untranslatierte Bereiche als blaue Linien markiert.



Abb. 3: Sequenzabschnitte der Next-Generation-Sequencing-Daten in der Darstellung der IGV (Integrative Genome Viewer)-Anwendung (Robinson, Thorvaldsdottir et al. 2011, Thorvaldsdottir, Robinson et al. 2013). Bildschirmdarstellung mit simultaner Übersicht über das *PABPC1*-Gen aller vier untersuchten Familienmitglieder.

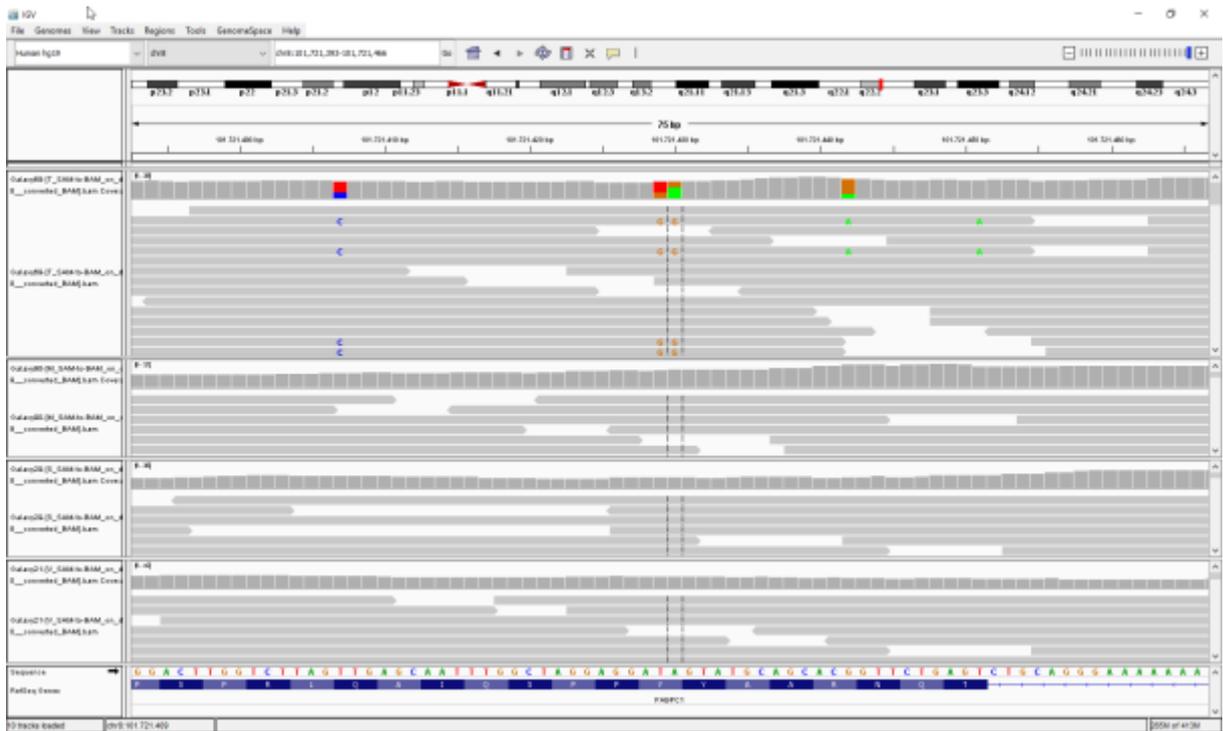


Abb. 4: Sequenzabschnitt des *PABPC1*-Gens mit der Y423H-Variante in Exon 9

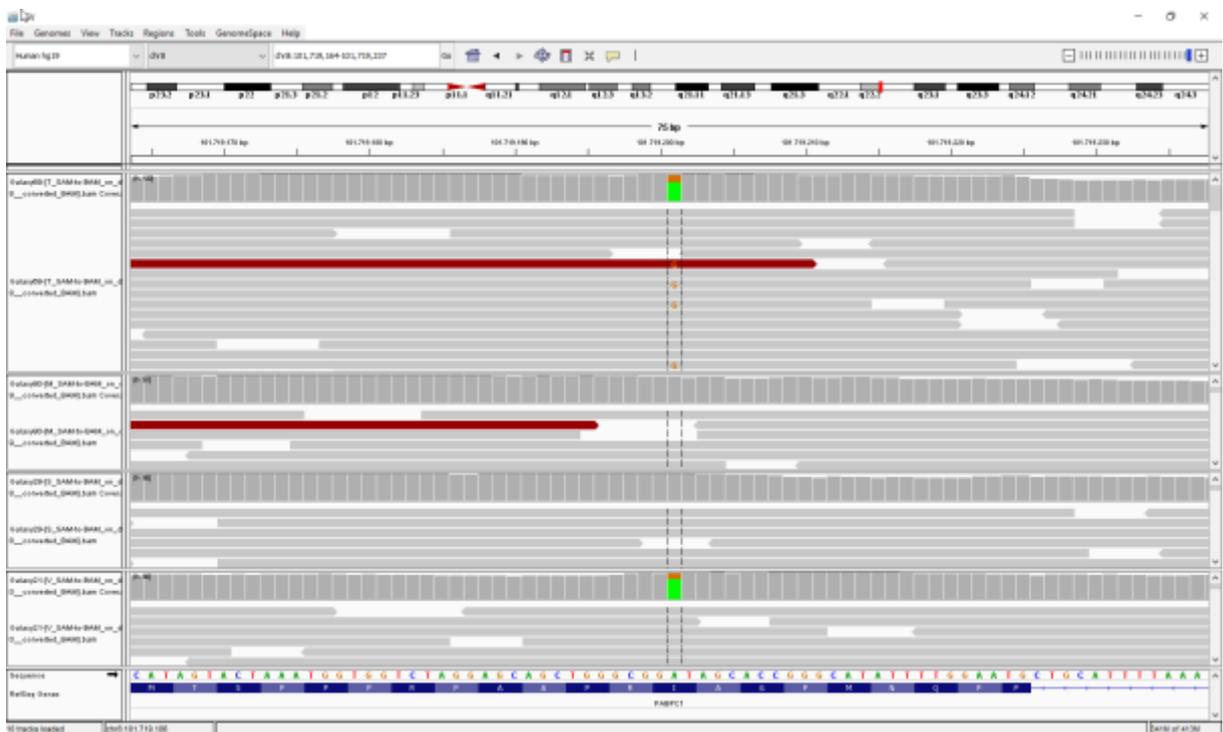


Abb. 5: Sequenzabschnitt des *PABPC1*-Gens mit der I454T-Variante in Exon 10

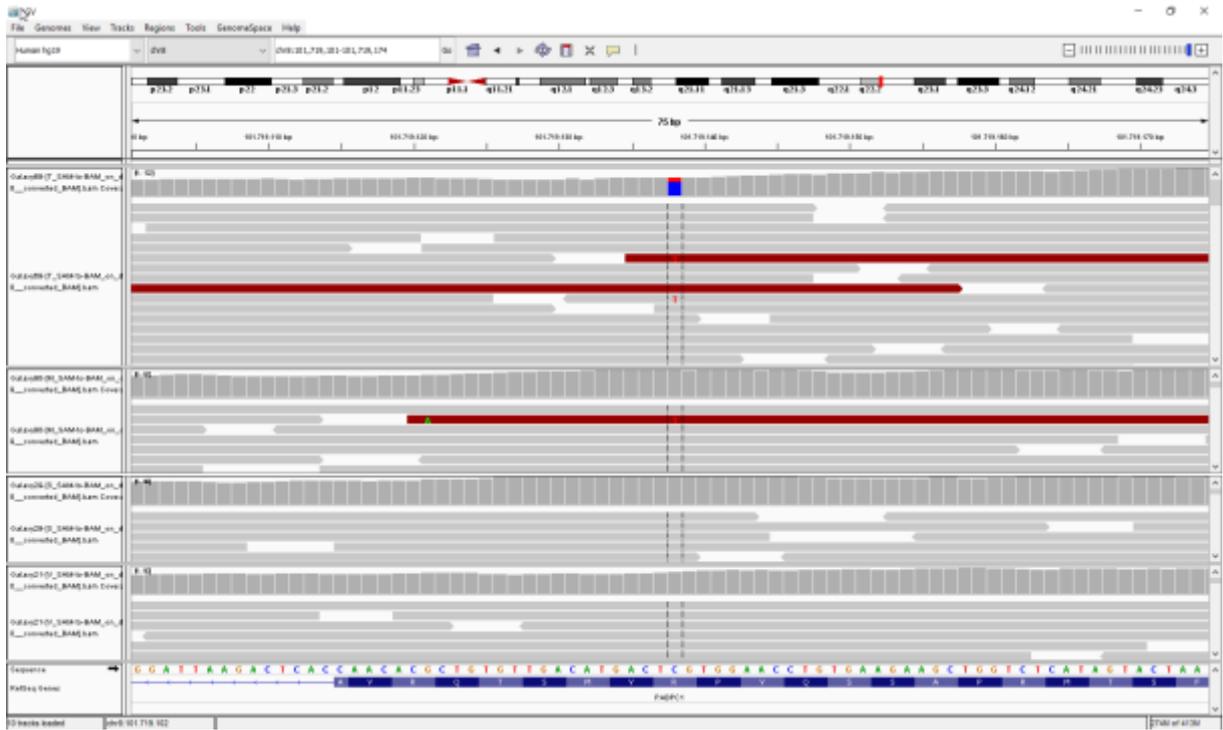


Abb. 6: Sequenzabschnitt des *PABPC1*-Gens mit der R475Q-Variante in Exon 10



Abb. 7: Sequenzabschnitt des *PABPC1*-Gens mit der Y423S-Variante in Exon 10

4.2 Klinische Daten der untersuchten Patientenkohorte mit neuromuskulären Erkrankungen

In einer Kohorte von 11 Patienten mit bislang ungeklärten Gliedergürteldystrophien wurde das Kandidatengen *PABPC1* auf Veränderungen als mögliche Ursache der neuromuskulären Erkrankung untersucht. Die Patienten des Friedrich-Baur-Instituts, München, wurden nach klinischen Kriterien zur molekulargenetischen Untersuchung ausgewählt.

Insbesondere wurden die *PABPC1*-Genvarianten, die in Abb. 4-7 dargestellt sind, überprüft. Hierbei waren diejenigen Varianten von speziellem Interesse, die sich bei den betroffenen Familienmitgliedern fanden.

Zudem erfolgte die molekulargenetische Untersuchung einer gesunden Person ohne Hinweis auf eine neuromuskuläre Erkrankung zur Etablierung und Kontrolle der PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse.

Zur Durchführung der genetischen Untersuchungen und der Aufbewahrung der DNA-Proben lag die gesetzlich vorgeschriebene, schriftliche Einwilligungserklärung aller Probanden vor (Gendiagnostikgesetz §§8,9).

Tab. 8 (nächste Seite): Klinische Daten der untersuchten Patienten. Übersicht über Alter, Geschlecht, Laborwerte, Begleiterkrankungen, Manifestationsalter, Erstsymptomatik, klinische Ausprägung der Paresen, elektrophysiologische Untersuchungen und bisher durchgeführte Molekulargenetik. Abkürzungen: Elektromyographie (EMG), Elektroneurographie (ENG), pathologische Spontanaktivität (PSA), positive sharp waves (psw, eine Form der PSA), nicht untersucht (n. u.).

Pat.	Alter/ Geschl.	Diagnosen	CK- Erhöhung	Weitere auffällige Laborwerte	Begleit- erkrankungen	Mani- festation (J.)	Erst- Symptomatik	Scapula alata	Treppen- steigen	Laufen	Aufstehen aus der Hocke	Arme	Muskelatrophie	EM G	ENG	Unauffällige Genetik
1	61 J/W	Polymyositis	3-fach	GPT, GOT, iPTH, Thrombozyten, pro-BNP erhöht	Art. Hypertonie, Hyperurikämie, Z.n. Mamma-Ca	35 J.	Schwäche beim Treppensteigen	Gering, beidseits	Nicht möglich	200 m am Rollator	Nicht möglich	Elevation maximal bis zur Horizontalen	Deutliche axiale Atrophie, auch Bauchmuskulatur, Facies myopathica	-	unauffällig	A nocamin, Calpain, FKRP, Dystferlin, TCAP, LMNA, SGC8, SGCA, SGCD, SGGC, FLNC
2	62 J/W	Degenerative Myopathie	3-fach	GOT, GPT, gGT erhöht, CRP erhöht	Art. Hypertonie, Hashimoto-Thyreoiditis	47 J.	Kraftlosigkeit Extremitätenmuskulatur	Links betont	Beeinträchtigt	Kaum noch möglich	Nicht möglich	Armelevation bis zur Horizontalen	Neurogene Muskelatrophie	distalbetont chronisch neurogen	Kein H. a. auf periphere Neuropathie	FSHD
3	51 J/M	Hereditäre degenerative Myopathie, Variante im Dyselektin	25-fach	Ferritin, Glucose, HbA1c, gGT, GPT, GOT erhöht	Diabetes mellitus Typ 2	49 J.	Progradiente Kraftminderung in Armen und Beinen	Nein	Wenige Stufen im Vierfüßlergang	Max. 200 m mit Gehstöcken	n. u.	n. u.	Gliedergürtel, Pektoralis muskulatur bds., Wade II, Unterarmbeuger bds., deutliche Facies myopathica	myopathisch	Degenerative Neuropathie	FHL1, Lamin A/C, ANOS1, Calpain, Cavolin-3, COL6A1, COL6A3, SMCHD1, Emrin
4	75 J/M	Degenerative Myopathie	Normbereich	Cholesterin und Triglyceride erhöht, geringgradige monoklonale IgG-Lambda Gammopathie	Motorische Neuropathie, art. Hypertonie, Discusprolaps C5/6	60 J.	Radialisparesie i. l. mit Atrophie der Unterarmmuskulatur	Nein	Möglich	Möglich	Möglich	Armelevation leicht eingeschränkt	Unterarm- und Oberarmmuskeln	neurogen	Sensomotorische Neuropathie	VCP, PMP22
5	52 J/W	Spastische Tetraparese unklarer Ätiologie	Grenzwertig	Eisen, Harnsäure, Lymphozyten erniedrigt	Degeneratives HWS-Syndrom	40 J.	Kraftverlust Arme, Treppensteigen eingeschränkt (v. a. re. Bein)	Bds., re. betont	Erschwert möglich	Etwas unsicher, gehäuft Crampi	Möglich	Armelevation deutlich eingeschränkt	Schulter- und Schulterblatt	vorzeitige Rekrutierung, vermehrt kleine polyphasische Potentiale	Kein H. a. auf periphere Neuropathie	FSHD, PROMM (ZNF9)
6	75 J/M	Myopathie	3-fach	Geringgradige Monoklonale IgG-Lambda Gammopathie	Art. Hypertonie, Hypertrophie	62 J.	Schwäche Oberschenkelmuskulatur re.	Leicht	Uneingeschränkt	Uneingeschränkt	Etwas erschwert	Aufsteigen der Schulterblätter bei der Elevation	Oberschenkel rechts betont, Pektoralis-Muskulatur	Unterarm neurogen, Unterschenkel PSA (psw)	Distale, motorische Neuropathie	FSHD
7	72 J/W	Proximale beidseitige Muskeldystrophie	8-fach	Eisen erniedrigt	Art. Hypertonie, Hyperlipidämie, Hashimoto-Thyreoiditis, Hypothyreose	42 J.	Progradiente proximale und beidseitige schlaffe Tetraparese	Nein	Nicht möglich	Mit Rollator	Nicht möglich	Armelevation leicht eingeschränkt	Keine Muskelatrophie	myopathisch	Kein H. a. auf periphere Neuropathie	FSHD
8	45 J/M	Hypertrophe Kardiomyopathie, ICD	Grenzwertig	-	Art. Hypertonie	44 J.	Hypertrophe Kardiomyopathie	Nein	Uneingeschränkt	Uneingeschränkt	Uneingeschränkt	Keine Muskelatrophie	Keine Muskelatrophie	unauffällig	unauffällig	-
9	69 J/W	Hypertrophe Kardiomyopathie, ICD	n. u.	n. u.	Art. Hypertonie	68 J.	Hypertrophe Kardiomyopathie	Nein	Uneingeschränkt	Leichtes Trendelenburg-Hinken	Uneingeschränkt	Armelevation leicht eingeschränkt	Schwächliche Muskulatur an der unt. Extremität	n. u.	n. u.	-
10	63 J/W	Chronische Polymyositis	2-fach	Anämie, Hodgkin Lymphom	Autoimmunhämolytische Anämie mit Wärmeautoantikörpern	39 J.	Kraftminderung in den Beinen	Nein	Erschwert möglich	Trendelenburg-hyperlordotisches Steppergangbild	Nicht möglich	Uneingeschränkt	Facies myopathica, axiale Muskelatrophie	myopathisch	n. u.	FSHD, DES, GNE, MYO1, ZASP
11	72 J/W	Chronische Polymyositis	2-fach	Hypokaliämie	Schluckstörung, art. Hypertonie	44 J.	Kraftlosigkeit Beckenregionmuskulatur	Nein	Erschwert möglich	Erschwert möglich	Nicht möglich	Fingerbeuger eingeschränkt	Oberschenkel- und Unterarm-Muskulatur	myopathisch	Distale, motorische Neuropathie	FSHD, DES, DMD, FLNC, TTN, CNTN1

4.3 Optimierung der PCR Amplifikation des *PABPC1*-Gens

Für die Sequenzierung des *PABPC1*-Gens wurden die Exons 1-14 über PCR amplifiziert. Die erfolgreiche Amplifikation wurde im Anschluss durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert.

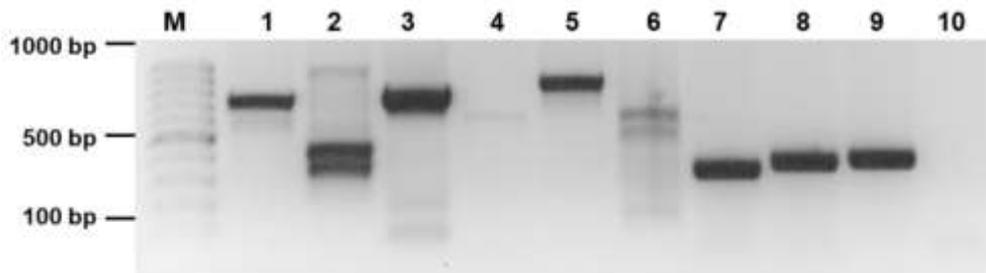


Abb. 8: Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikation der Exons 2-14 des *PABPC1*-Gens. In Spur 2 und 6 ergab sich bei der Amplifikation der Exons 4 bzw. der Exons 10-11 eine Doppelbande - am ehesten durch unspezifische Primerbindung -, die eine weitere Optimierung der Primer und der Amplifikationsbedingungen erforderte. Amplifikate s. Tab. 9.

Bei der PCR der Fragmente für Exon 2 und Exons 10-11 zeigten sich zunächst unspezifische Doppelbanden, die die weitere Analyse erschwerten (Abb. 8) und bei der direkten Sequenzanalyse kein auswertbares Resultat ergaben. Exon 1 war mit dem zuerst entworfenen Primerpaar nicht amplifizierbar und ist nicht gezeigt. Die Kontroll-PCR in Spur 10 bestätigt, dass ohne Zugabe von genomischer DNA keine PCR-Amplifikation stattfindet (NTC, non template control).

Gelspur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Exon	2-3	4	5-6	7	8-9	10-11	12	13	14
Fragment-Größe (bp)	744	547	791	395	865	888	340	373	380

Tab. 9 Rechnerische Größe (in bp) der amplifizierten Exons einschließlich angrenzender intronischer Bereiche in Abb. 8.

Das Ergebnis einer weiteren typischen Gelelektrophorese ist in Abb. 9 gezeigt. In Spur 13 wurde wiederum eine Kontroll-Reaktion aufgetragen, die keine genomische DNA enthielt (NTC: non template control). In dieser Reaktion bestätigte sich stets, dass die Reagenzien allein kein unspezifisches PCR-Produkt ergaben.

Eine Erhöhung der Annealing-Temperatur und neue Primerpaare für Exon 2, Exon 4 und 9-10 zeigten eine verbesserte Spezifität (Abb. 9).

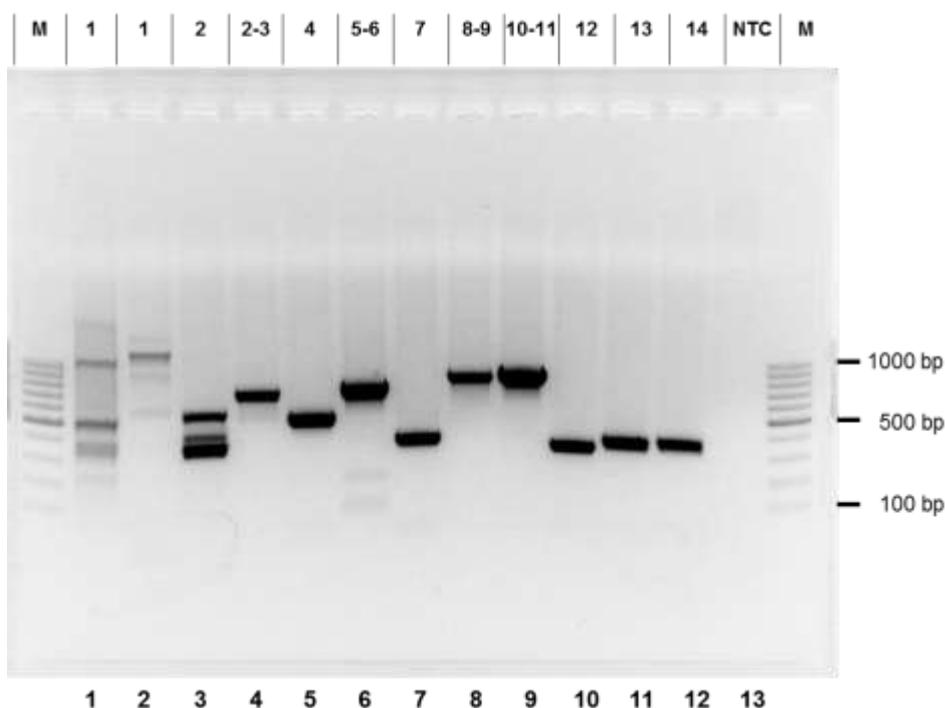


Abb. 9: Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikation der Exons 1-14 des *PABPC1*-Gens: Die PCR-Fragmente der Exons 1-14 einschließlich angrenzender intronischer Bereiche wurden mittels eines 1%igen Agarose-Gels in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Optimierung der Annealing-Temperatur führte zur Verbesserung der Spezifität der PCR-Amplifikation bei Exon 4 und Exons 10-11.

Allerdings konnte bei Exon 2 keine wesentliche Verbesserung erreicht werden (Abb. 9). Deshalb wurden nachfolgend Exon 2 und 3 nur noch kombiniert erfolgreich amplifiziert.

Für das Exon 1 zeigte sich weder für ein längeres Fragment (rechnerisch 977 bp, Spur 1, Abb. 9) noch für ein kürzeres PCR-Produkt (rechnerisch 645 bp, Spur 2, Abb. 9) eine ausreichend spezifische Amplifikation.

In einem nächsten Schritt wurden zwei neue Primerpaare für Exon 1 entworfen, die allerdings ähnliche Resultate wie in Abb. 9 ergaben, die kein spezifisches Fragment der errechneten Länge erkennen lässt (s. Tab. 10).

Gelspur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Exon	1 long	1 short	2	2-3	4	5-6	7	8-9	10-11	12	13	14
Fragment-Größe (bp)	977	645	365	744	547	791	395	865	888	340	373	380

Tab. 10 Größe der amplifizierten Exons einschließlich angrenzender intronischer Bereiche mit neuen Primern (s. a. Abb. 9).

Unter der Annahme, dass GC-reiche Sequenzen im Bereich von Exon 1 die Effizienz der PCR beeinträchtigen (s. genomische Sequenz im Anhang 8.1), wurden verschiedene weitere Optimierungsstrategien angewandt.

1. Die Zugabe von 5% DMSO (Dimethylsulfoxid) kann die Schmelztemperatur der Primer beeinflussen.

2. Bei Zugabe von 7-Deaza-deoxyGTP zur PCR-Reaktion wird dieses modifizierte Nukleotid-Analogon neben dGTP in die PCR-Fragmente eingebaut und kann eine übergeordnete Sekundärstrukturbildung in GC-reichen Sequenzen verhindern, die die DNA-Denaturierung beeinträchtigt und die prozessive Amplifikation durch die DNA-Polymerase blockiert.

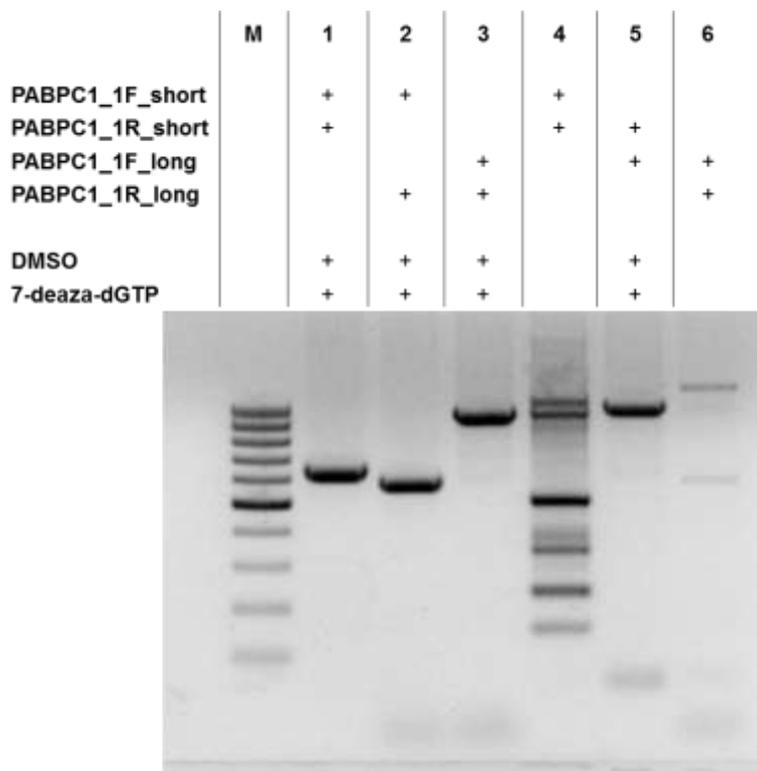


Abb. 10 Agarose-Gelelektrophorese verschiedener PCR-Fragmente um Exon 1 des *PABPC1*-Gens: Exon 1 wurde erfolgreich mit verschiedenen Primer-Kombinationen und mit den Zusätzen DMSO und 7-deaza-dGTP amplifiziert (Reaktion 1, 2, 3 und 5), die rechnerisch korrekte Fragmentlängen ergaben. Zum Vergleich wurde eine Reaktion unter den vormaligen Reaktionsbedingungen aufgetragen (Reaktion 4 und 6), die im Wesentlichen nur unspezifische Banden ergab.

4.4 Sequenzierung der *PABPC1*-PCR-Fragmente

Nach Gelextraktion wurde die Sanger-Sequenzanalyse mit vorgegebenen Primer über Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Um die Lesbarkeit der analysierten Sequenzen zu verbessern, wurden schrittweise eine Reihe von Änderungen in der Sequenzierstrategie vorgenommen:

Bei Exon 5 zeigten sich wegen eines Oligo(dT)-Strangs direkt nach dem Sequenzierprimer Artefakte im Elektropherogramm im Sinne von „Schultern“, die teilweise Doppelpeaks darstellten. Deshalb wurde zur Sequenzierung der reverse Primer verwendet. Diese Vorgehensweise wurde ebenfalls wegen eines Oligo(dT)-Strangs vor Exon 9 bei der Sequenzanalyse von Exon 8-9 gewählt.

Bei der Sequenzierung des Fragments, das Exon 6 und 7 enthält, wurden beide Primer (forward und reverse) zur Sequenzierung verwendet, da unmittelbar vor Exon 7 ein Oligo(dT)-Strang lag, der ebenfalls zu ausgedehnten Sequenzartefakten mit Doppelpeaks führte. Durch Sequenzauswertung in beiden Orientierungen (forward und reverse) ließen sich die Peaks der Elektropherogramme eindeutig zuordnen.

Patienten	Id	(Prä-)mRNA	Genomlokalisierung	Vorliegen	Mutation Taster	Häufigkeit	Klin. Bedeutung
1	rs3133575	intron (IVS5)	chr8:101725251G>C	homozygot	Polymorphismus	C=0.18599 (23354/125568, TOPMED) C=0.1805 (5661/31358, GnomAD) C=0.202 (1012/5008, 1000G) [...]	Kein Eintrag in ClinVar
3	rs1693552	intron (IVS12)	chr8:101717689A>G	heterozygot	Polymorphismus	G=0.27667 (34741/125568, TOPMED) G=0.2951 (9255/31364, GnomAD) G=0.272 (1362/5008, 1000G) [...]	Kein Eintrag in ClinVar
1	rs1693555	intron (IVS12)	chr8:10718768A>G	heterozygot	Polymorphismus	A=0.482655 (60606/125568, TOPMED) A=0.47082 (14715/31254, GnomAD) A=0.4637 (2322/5008, 1000G) (- 13 less) [...]	Kein Eintrag in ClinVar
1	rs35477078	5'UTR	chr8:100704280G>A	heterozygot	Polymorphismus	T=0.00380 (952/250746, GnomAD_exome) T=0.00421 (529/125568, TOPMED) T=0.00403 (489/121362, ExAC) T=0.0021 (167/78702, PAGE_STUDY) T=0.0036 (113/31360, GnomAD) T=0.0050 (65/13006, GO-ESP) T=0.002 (9/5008, 1000G) [...]	Kein Eintrag in ClinVar

Tab. 11 Häufigkeit identifizierter Polymorphismen im *PABP1*-Gen ohne Krankheitswert.

Die im Rahmen der Sequenzierungen festgestellten Genvarianten sind in Tabelle 11 aufgelistet. Es handelt sich um Varianten einzelner Nukleotidpositionen, die sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphisms“)

darstellen, die mit unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Populationen vorkommen. In der Regel sind diese Varianten, die in heterozygoter Form identifiziert wurden, ohne Krankheitswert.

Ein Eintrag in der Datenbank ClinVar fand sich nicht (Landrum, Lee et al. 2018). ClinVar ist ein öffentliches Dokumentationsarchiv für humangenetische Varianten und Interpretationen ihrer klinischen Bedeutung für genetisch bedingte Erkrankungen, das bei den National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) geführt wird.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurden die kodierenden Exons des *PABPC1*-Gens bei 11 Patienten sequenziert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Veränderungen im *PABPC1*-Gen und neuromuskulären Krankheiten zu untersuchen, insbesondere auch im Hinblick auf eine assoziierte Kardiomyopathie.

5.1 PCR Amplifikation der *PABPC1*-Exons

Bei 11 Patienten wurden die Exons 1-14 des *PABPC1*-Gens über eine Polymerase Kettenreaktion vervielfältigt. Dazu wurden unterschiedliche Primer entworfen und experimentell getestet. Zudem wurden auch unterschiedliche PCR-Bedingungen evaluiert, um die Effizienz und Spezifität der PCR zu optimieren.

Dies gelang erst schrittweise nach systematischer Anpassung der Reaktionsbedingungen. Mögliche Ursachen können GC-reiche Sequenzabschnitte sein, die durch eine übergeordnete Sekundärstrukturbildung die PCR-Amplifikation erschweren. Eine weitere Ursache kann in einer unspezifischen Bindung der verwendeten Primer liegen.

5.2 Auswahl der Sequenzierungsmethode zur Analyse des *PABPC1*-Gens

Für die direkte Sequenzierung des *PABPC1*-PCR-Fragmente wurde die Sanger-Sequenzierung verwendet. Die Analyse der Sequenzdaten ergab, dass keine relevanten Mutationen des *PABPC1*-Gens gefunden wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass im untersuchten Patientenkollektiv kein Zusammenhang des *PABPC1*-Gens mit neuromuskulären Krankheiten nachgewiesen werden konnte.

Es zeigte sich auch, dass die möglichen Sequenzvarianten, die sich initial in der NGS-Analyse fanden, nicht durch Sanger-Sequenzierung zu bestätigen waren. Eine Ursache hierfür könnte in der geringen DNA-Menge oder der DNA-Qualität liegen, die für die Analyse eingesetzt wurde.

5.3 Identifizierung von Genvarianten

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der frei verfügbaren DNA-Sequenzsoftware Chromas ausgewertet (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). Die sequenzierten Exons des *PABPC1*-Gens wurden mit dem Wildtyp verglichen, um potentielle Mutationen zu detektieren.

Es fanden sich einige Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. *single nucleotide polymorphism*), die auch in der gesunden Population sehr häufig vorkommen und in den meisten Fällen keine Pathogenität besitzen. Unter SNPs versteht man die Variation eines einzelnen Basenpaares in einer spezifischen Stelle des Genoms. Diese SNPs können in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen der DNA vorkommen und können folglich unterschiedlich relevante Auswirkungen haben (Zhao, Fu et al. 2003, Consortium 2005). Viele SNPs sind ‚still‘ und verändern die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins nicht; man nennt diese auch synonyme SNPs (Zhao, Fu et al. 2003). Im Gegensatz dazu gibt es auch nicht-synonyme SNPs, die für eine andere Aminosäure kodieren als das ursprüngliche Codon. SNPs können daher eine Rolle bei der Entstehung von verschiedenen Krankheiten spielen (Suh and Vijg 2005). Es konnten SNPs gefunden werden, die eine Verbindung mit der Entstehung von Alzheimer (Brookes and Prince 2005), Typ 2 Diabetes (Saxena, Voight et al. 2007), Prionkrankheiten (Mead 2006) und unterschiedlichen Krebsarten (Wang and Armstrong 2007) besitzen. Wenn SNPs in nicht-kodierenden regulatorischen Bereichen der DNA vorkommen, wie z. B. in Promotoren, Silencern oder Enhancern, kann die Genregulation beeinflusst werden. In diesem Falle spricht man von regulatorischen SNPs (Zhao, Fu et al. 2003).

5.4 Einschränkende Aspekte der Analysen

Obwohl in der untersuchten Kohorte von Patienten kein Zusammenhang zwischen *PABPC1*-Genveränderungen und neuromuskulären Krankheiten gefunden werden konnte, muss darauf hingewiesen werden, dass die statistische Signifikanz dieses Ergebnisses aufgrund der niedrigen Anzahl von getesteten Patienten gering ist. Ein weitreichendes Screening mit einer ausreichend hohen Anzahl von Patienten könnte die statistische Signifikanz des Ergebnisses erhöhen. Zudem könnte man als

Sequenzierungsmethode Next-Generation Sequencing auswählen, da dies bei Fortschritten in der Technik seit Beginn der Analysen mittlerweile die Sensitivität erhöht, potentielle Mutationen zu detektieren.

Die Auswahl der Sanger Sequenzierung für diese Studie könnte ein Grund dafür sein, dass keine pathogenen Varianten entdeckt wurden. Die Methode ist nicht geeignet, weitreichende Deletionen und Duplikationen sowie Veränderungen in nicht kodierenden Bereichen (5'- und 3'-UTR oder Introns) zu detektieren.

Beide Methoden, die Sanger-Sequenzierung und Next-Generation-Sequencing haben Vor- und Nachteile. Bei Forschungsprojekten, welche die Sequenzierung von DNA als Methode benutzen, sollte daher bei der Planung abgewogen werden, welche der beiden Sequenzierungsmethoden den Bedürfnissen des Projekts besser entspricht. Next-Generation Sequencing hat sehr viele Vorteile und wird daher immer häufiger als Standardsequenzierungsmethode verwendet. Durch Next-Generation Sequencing ist es möglich, sehr viele Zielgene parallel zu sequenzieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Next-Generation-Sequencing sehr sensitiv ist und dadurch auch die Identifizierung von Mutationen höher ist. Next-Generation-Sequencing kann für Hochdurchsatzverfahren (*High-Throughput*-Methoden) verwendet werden, jedoch ist es wenig kosteneffektiv, wenn man Next-Generation-Sequencing nur bei einer geringen Anzahl an Zielgenen verwendet. Generell kann man sagen, dass die Sanger-Sequenzierung sehr schnell und kosteneffektiv ist, für eine ausgewählte, geringe Anzahl an Zielgenen geeignet ist und der Bestätigung von Veränderungen durch eine unabhängige Methode dient, die durch NGS identifiziert wurden. Ein Nachteil der Sanger-Sequenzierung ist die geringere Kapazität und der hohe Zeitaufwand.

Im Klartext bedeutet das, dass die Sanger-Sequenzierung im Vergleich zum Next-Generation-Sequencing weniger neue Genvarianten entdeckt und daher einen limitierenden Aspekt dieser Studie darstellt (Schuster 2007, Shendure and Ji 2008).

5.5 Ausblick

Gentherapie stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar, um genetisch bedingte Krankheiten zu heilen, die nur auf der Mutation eines einzigen Gens basieren. Ein Beispiel ist die häufigste Form der erblichen Muskeldystrophie, die Duchenne-Krankheit, bei der das Dystrophin (*DMD*)-Gen mutiert ist, welches für die Stabilität der Muskelfaser eine wichtige Rolle spielt (Boland, Silbert et al. 1996, Mendell and Lloyd-Puryear 2013). Bei der Duchenne-Erkrankung wurden bereits extrem viele Versuche unternommen, um die defekte Kopie des *DMD*-Gens mit Hilfe von Gentherapie durch eine funktionierende Version auszutauschen. Man versuchte den Gentransfer mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV) durchzuführen.

Jedoch erwies sich die Gentherapie der Duchenne-Krankheit aus unterschiedlichen Gründen als schwierig. Zunächst stellte sich heraus, dass das Dystrophin-Gen so groß ist, dass es die Kapazität des AAV-Vektors überschreitet (Duan 2018), der dazu dient das therapeutische Gen in Körperzellen einzuschleusen. Da Muskelzellen im gesamten Körper vorkommen, ist es aufwendig, die Therapie so zu gestalten, dass jede Muskelzelle im gesamten Körper davon profitiert. Das vollständige Dystrophin-Gen ist 2,6 Mb groß. Um das Problem der Größe des Dystrophin-Gens zu umgehen, wurden synthetische Dystrophin-Gene hergestellt, die kleiner als 4 kb sind. Diese kleinen Formen des Dystrophin nennt man Mikrogen (Duan 2018).

Bis heute wurden mehr als 30 unterschiedliche Dystrophin-Mikrogene publiziert, welche teilweise ein großes therapeutisches Potential aufweisen (Jørgensen, Larochelle et al. 2009). Die Entwicklung der Gentherapie für die Behandlung der Duchenne-Krankheit weist bisher im Tiermodell sehr vielversprechende Ergebnisse auf. Die Therapie der Duchenne-Dystrophie mit Adeno-assoziierten Viren in Kombination mit Mikro-Dystrophin könnte die Muskelpathologie erheblich verbessern, die Muskelkraft erhöhen und den Verlauf dystrophischer Kardiomyopathien abmildern. Ein bereits zugelassener, weiterer vielversprechender Therapie-Ansatz ist die Modifikation der Dystrophin-mRNA. Hierbei wird der Spleißvorgang durch ein Oligonukleotid so reguliert, dass eine verkürzte, aber funktionstüchtige Dystrophin-Isoform translatiert wird (Exon-Skipping).

Die Errungenschaften, die bisher in der Therapie der Duchenne-Krankheit erzielt wurden, geben einen Vorgeschmack darauf, was auch bei anderen monogenetisch bedingten Krankheiten möglich ist. Sollte man in Zukunft das *PABPC1*-Gen doch als Ursache von Muskeldystrophien identifizieren, wäre es denkbar, ebenfalls gentherapeutische Ansätze zu entwickeln, um die neuromuskuläre Krankheit zu heilen.

Es wird künftig immer wichtiger werden, die genetische Grundlage von seltenen Erkrankungen zu identifizieren, um für betroffene Patienten eine maßgeschneiderte, personalisierte Therapie anbieten zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen *PABPC1* als mögliches neues Kandidatengen bei Gliedergürtel-Muskeldystrophie mit Herzbeteiligung untersucht. Ein erster Anhalt ergab sich aus der Exom-Analyse bei einer familiären Kardiomyopathie mit Gliedergürteldystrophie.

Mit einer unabhängigen Methode, der direkten Sanger-Sequenzierung, wurde *PABPC1* molekulargenetisch in einer ausgewählten Kohorte von Patienten analysiert, bei denen bislang keine genetische Ursache der Gliedergürtelsyndrome oder degenerativen Myopathie-Syndrome in bekannten Genen identifiziert werden konnte. Mit Hilfe der direkten Sequenzanalyse der kodierenden Abschnitte und angrenzender intronischer Bereiche, die mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert wurden, wurde das *PABPC1*-Gen auf mögliche Sequenzvarianten untersucht.

Zusammenfassend wurde keine pathogene Sequenzvariante im *PABPC1*-Gen in der selektierten Patientenkohorte identifiziert. Dies lässt darauf schließen, dass kein Zusammenhang zwischen einer Mutation des *PABC1*-Gens und der Entstehung von Gliedergürtelmuskeldystrophie in der kleinen untersuchten Patientenkohorte besteht. Weitere Studien sind erforderlich, um mögliche genetische Ursachen in kodierenden oder auch nicht-kodierenden Bereichen des Genoms zu identifizieren.

7 LITERATUR

- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov and S. R. Sunyaev (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." Nat Methods **7**(4): 248-249.
- Aitken, C. E. and J. R. Lorsch (2012). "A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes." Nature Structural and Molecular Biology **19**(6): 568.
- Allfrey, V., M. M. Daly and A. E. Mirsky (1953). "Synthesis of protein in the pancreas: II. The role of ribonucleoprotein in protein synthesis." The Journal of general physiology **37**(2): 157-175.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Amrani, N., S. Ghosh, D. A. Mangus and A. Jacobson (2008). "Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP." Nature **453**(7199): 1276.
- Bäckman, E. and E. Nylander (1992). "The heart in Duchenne muscular dystrophy: a non-invasive longitudinal study." European heart journal **13**(9): 1239-1244.
- Benarroch, L., G. Bonne, F. Rivier and D. Hamroun (2020). "The 2021 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome)." Neuromuscul Disord **30**(12): 1008-1048.
- Berlit, P. and B. Stegaru-Hellring (1991). "The heart in muscular dystrophy: an electrocardiographic and ultrasound study of 20 patients." European archives of psychiatry and clinical neuroscience **241**(3): 177-180.
- Boland, B. J., P. L. Silbert, R. V. Groover, P. C. Wollan and M. D. Silverstein (1996). "Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy." Pediatric neurology **14**(1): 7-12.
- Bönnemann, C. G., M. R. Passos-Bueno, E. M. McNally, M. Vainzof, E. d. S. Moreira, S. K. Marie, R. C. Pavanello, S. Noguchi, E. Ozawa and M. Zatz (1996). "Genomic screening for β -sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E)." Human molecular genetics **5**(12): 1953-1961.
- Brookes, A. J. and J. A. Prince (2005). "Genetic association analysis: lessons from the study of Alzheimers disease." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **573**(1): 152-159.
- Bushby, K. M. (1999). "The limb-girdle muscular dystrophies—multiple genes, multiple mechanisms." Human molecular genetics **8**(10): 1875-1882.
- Buszczak, M., R. A. Signer and S. J. Morrison (2014). "Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis." Cell **159**(2): 242-251.
- Campbell, K. P. (1995). "Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage." Cell **80**(5): 675-679.
- Carlier, P. G., E. Mercuri and V. Straub (2012). "Applications of MRI in muscle diseases." Neuromuscul Disord **22 Suppl 2**: S41.
- Choi, Y., G. E. Sims, S. Murphy, J. R. Miller and A. P. Chan (2012). "Predicting the

- functional effect of amino acid substitutions and indels." PLoS One **7**(10): e46688.
- Chorghade, S., J. Seimetz, R. Emmons, J. Yang, S. M. Bresson, M. De Lisio, G. Parise, N. K. Conrad and A. Kalsotra (2017). "Poly (A) tail length regulates PABPC1 expression to tune translation in the heart." eLife **6**: e24139.
- Cohn, R. D. and K. P. Campbell (2000). "Molecular basis of muscular dystrophies." Muscle & nerve **23**(10): 1456-1471.
- Consortium, I. H. (2005). "A haplotype map of the human genome." Nature **437**(7063): 1299.
- Corrado, G., A. Lissoni, S. Beretta, L. Terenghi, G. Tadeo, G. Foglia-Manzillo, L. M. Tagliagambe, M. Spata and M. Santarone (2002). "Prognostic value of electrocardiograms, ventricular late potentials, ventricular arrhythmias, and left ventricular systolic dysfunction in patients with Duchenne muscular dystrophy." The American journal of cardiology **89**(7): 838-841.
- de Kermadec, J.-M., H.-M. Becane, A. Chénard, F. Tertrain and Y. Weiss (1994). "Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: an echocardiographic study." American heart journal **127**(3): 618-623.
- de Visser, M., W. G. de Voogt and G. V. la Rivière (1992). "The heart in Becker muscular dystrophy, facioscapulohumeral dystrophy, and Bethlem myopathy." Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine **15**(5): 591-596.
- Dec, G. W. and V. Fuster (1994). "Idiopathic dilated cardiomyopathy." New England Journal of Medicine **331**(23): 1564-1575.
- Domingos, J., A. Sarkozy, M. Scoto and F. Muntoni (2017). "Dystrophinopathies and Limb-Girdle Muscular Dystrophies." Neuropediatrics **48**(4): 262-272.
- Duan, D. (2018). "Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy." Molecular Therapy.
- Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kühn, B. Maisch and W. J. McKenna (2007). "Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases." European heart journal **29**(2): 270-276.
- Emery, A. (1989). "Emery-Dreifuss muscular dystrophy and other related disorders." British medical bulletin **45**(3): 772-787.
- Emery, A. (1989). "Emery-Dreifuss syndrome." Journal of medical genetics **26**(10): 637-641.
- Farah, M. G., E. B. Evans and P. J. Vignos (1980). "Echocardiographic evaluation of left ventricular function in Duchenne's muscular dystrophy." The American journal of medicine **69**(2): 248-254.
- Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M. R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, H. J. Vidaillet Jr, S. Spudich and U. De Girolami (1999). "Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease." New England Journal of Medicine **341**(23): 1715-1724.
- Fichna, J. P., A. Macias, M. Piechota, M. Korostyński, A. Potulska-Chromik, M. J. Redowicz and C. Zekanowski (2018). "Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic mutations and putative phenotype-influencing variants in Polish limb-girdle muscular dystrophy patients." Human genomics **12**(1): 34.

- Gallie, D. R. (1991). "The cap and poly (A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency." Genes & development **5**(11): 2108-2116.
- Garlick, P. J., M. A. McNurlan and V. R. Preedy (1980). "A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine." Biochemical Journal **192**(2): 719-723.
- Garlick, P. J., J. Wernerman, M. A. McNurlan and S. D. Heys (1991). "Organ-specific measurements of protein turnover in man." Proceedings of the Nutrition Society **50**(2): 217-225.
- Gerull, B., M. Gramlich, J. Atherton, M. McNabb, K. Trombitás, S. Sasse-Klaassen, J. Seidman, C. Seidman, H. Granzier and S. Labeit (2002). "Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy." Nature genetics **30**(2): 201-204.
- Grünig, E., J. A. Tasman, H. Kücherer, W. Franz, W. Kübler and H. A. Katus (1998). "Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy." Journal of the American College of Cardiology **31**(1): 186-194.
- Guglieri, M., V. Straub, K. Bushby and H. Lochmüller (2008). "Limb-girdle muscular dystrophies." Current opinion in neurology **21**(5): 576-584.
- Herman, D. S., L. Lam, M. R. Taylor, L. Wang, P. Teekakirikul, D. Christodoulou, L. Conner, S. R. DePalma, B. McDonough and E. Sparks (2012). "Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy." New England Journal of Medicine **366**(7): 619-628.
- Hicks, D., A. Sarkozy, N. Muelas, K. Köehler, A. Huebner, G. Hudson, P. F. Chinnery, R. Barresi, M. Eagle and T. Polvikoski (2010). "A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb girdle muscular dystrophy." Brain **134**(1): 171-182.
- Hoogerwaard, E., W. G. de Voogt, A. A. Wilde, P. A. van der Wouw, E. Bakker, G.-J. B. van Ommen and M. de Visser (1997). "Evolution of cardiac abnormalities in Becker muscular dystrophy over a 13-year period." Journal of neurology **244**(10): 657-663.
- Hung, T., K. Mak and K. Fong (1990). "A specificity enhancer for polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res **18**(16): 4953.
- Jackson, A. and M. J. O'Donnell (1960). "Progressive muscular dystrophy with 1: 1 atrial flutter." American heart journal **59**(2): 277-282.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen and T. V. Pestova (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." Nature reviews Molecular cell biology **11**(2): 113.
- Jørgensen, L. H., N. Larochelle, K. Orlopp, P. Dunant, R. W. Dudley, R. Stucka, C. Thirion, M. C. Walter, S. H. Laval and H. Lochmüller (2009). "Efficient and fast functional screening of microdystrophin constructs in vivo and in vitro for therapy of duchenne muscular dystrophy." Human gene therapy **20**(6): 641-650.
- Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler and D. Haussler (2002). "The human genome browser at UCSC." Genome Res **12**(6): 996-1006.
- Koyama, J., P. A. Ray-Sequin, R. Davidoff and R. H. Falk (2002). "Usefulness of pulsed tissue Doppler imaging for evaluating systolic and diastolic left ventricular function in patients with AL (primary) amyloidosis." The American journal of cardiology **89**(9): 1067-1071.
- Kumar, P., S. Henikoff and P. C. Ng (2009). "Predicting the effects of coding non-

synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." Nat Protoc **4**(7): 1073-1081.

Landrum, M. J., J. M. Lee, M. Benson, G. R. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, W. Jang, K. Karapetyan, K. Katz, C. Liu, Z. Maddipatla, A. Malheiro, K. McDaniel, M. Ovetsky, G. Riley, G. Zhou, J. B. Holmes, B. L. Kattman and D. R. Maglott (2018). "ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence." Nucleic Acids Res **46**(D1): D1062-d1067.

Laval, S. and K. Bushby (2004). "Limb-girdle muscular dystrophies—from genetics to molecular pathology." Neuropathology and applied neurobiology **30**(2): 91-105.

Lewis, S., F. Kelly and D. Goldspink (1984). "Pre-and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow-and fast-twitch skeletal muscles of the rat." Biochemical Journal **217**(2): 517-526.

Lippmann, C., C. Lindschau, E. Vijgenboom, W. Schröder, L. Bosch and V. Erdmann (1993). "Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo." Journal of Biological Chemistry **268**(1): 601-607.

Lowenstein, A. S., S. R. Arbeit and I. L. Rubin (1962). "Cardiac involvement in progressive muscular dystrophy: An electrocardiographic and ballistocardiographic study*." American Journal of Cardiology **9**(4): 528-533.

Manolio, T. A., K. L. Baughman, R. Rodeheffer, T. A. Pearson, J. D. Bristow, V. V. Michels, W. H. Abelmann and W. R. Harlan (1992). "Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop)." The American journal of cardiology **69**(17): 1458-1466.

Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman and J. B. Young (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies." Circulation **113**(14): 1807-1816.

Mathews, K. D. and S. A. Moore (2003). "Limb-girdle muscular dystrophy." Current neurology and neuroscience reports **3**(1): 78-85.

McNally, E. M., J. R. Golbus and M. J. Puckelwartz (2013). "Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy." The Journal of clinical investigation **123**(1): 19.

Mead, S. (2006). "Prion disease genetics." European Journal of Human Genetics **14**(3): 273.

Melacini, P., M. Fanin, G. A. Danieli, G. Fasoli, C. Villanova, C. Angelini, L. Vitiello, M. Miorelli, G. F. Buja and M. L. Mostacciolo (1993). "Cardiac involvement in Becker muscular dystrophy." Journal of the American College of Cardiology **22**(7): 1927-1934.

Melacini, P., A. Vianello, C. Villanova, M. Fanin, M. Miorin, C. Angelini and S. Dalla Volta (1996). "Cardiac and respiratory involvement in advanced stage Duchenne muscular dystrophy." Neuromuscular disorders **6**(5): 367-376.

Mendell, J. R. and M. Lloyd-Puryear (2013). "Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy." Muscle & nerve **48**(1): 21-26.

Mestroni, L., B. Maisch, W. McKenna, K. Schwartz, P. Charron, C. Rocco, F. Tesson, R. Richter, A. Wilke and M. Komajda (1999). "Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies." European heart journal **20**(2): 93-102.

Michels, V. V., P. P. Moll, F. A. Miller, A. J. Tajik, J. S. Chu, D. J. Driscoll, J. C. Burnett,

- R. J. Rodeheffer, J. H. Chesebro and H. D. Tazelaar (1992). "The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." New England Journal of Medicine **326**(2): 77-82.
- Monségu, J., D. Duboc, L. Freychet, B. Eymard, M. Fardeau, H. Becane, T. Willig and F. Guerin (1993). "L'atteinte cardiaque au cours de certaines maladies musculaires: à propos de 216 observations." Archives des maladies du coeur et des vaisseaux **86**(10): 1421-1426.
- Moore, W. (1954). "Cardiac involvement in progressive muscular dystrophy." The Journal of pediatrics **44**(6): 683-687.
- Morales, A. and R. E. Hershberger (2013). "Genetic evaluation of dilated cardiomyopathy." Current cardiology reports **15**(7): 375.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Nigro, G., L. I. Comi, L. Politano, F. M. Limongelli, V. Nigro, M. L. De Rimini, M. A. Giugliano, V. R. Petretta, L. Passamano and B. Restucci (1995). "Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy." Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine **18**(3): 283-291.
- Nigro, V. and M. Savarese (2014). "Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update." Acta Myol **33**(1): 1-12.
- Park, E. H., S. E. Walker, J. M. Lee, S. Rothenburg, J. R. Lorsch and A. G. Hinnebusch (2011). "Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1-PABP mRNPs in vivo." The EMBO journal **30**(2): 302-316.
- Parks, S. B., J. D. Kushner, D. Nauman, D. Burgess, S. Ludwigsen, A. Peterson, D. Li, P. Jakobs, M. Litt and C. B. Porter (2008). "Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy." American heart journal **156**(1): 161-169.
- Perloff, J. K., A. C. De Leon and D. O'doherty (1966). "The cardiomyopathy of progressive muscular dystrophy." Circulation **33**(4): 625-648.
- Perloff, J. K., W. C. Roberts, A. C. de Leon Jr and D. O'Doherty (1967). "The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy: An electrocardiographic-pathologic correlative study." The American journal of medicine **42**(2): 179-188.
- Pinto, Y. M., P. M. Elliott, E. Arbustini, Y. Adler, A. Anastasakis, M. Böhm, D. Duboc, J. Gimeno, P. de Groote and M. Imazio (2016). "Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases." European heart journal **37**(23): 1850-1858.
- Politano, L., V. Nigro, L. Passamano, V. Petretta, L. Comi, S. Papparella, G. Nigro, P. F. Rambaldi, P. Raia and A. Pini (2001). "Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies." Neuromuscular disorders **11**(2): 178-185.
- Reilich, P., S. Krause, N. Schramm, U. Klutzny, S. Bulst, B. Zehetmayer, P. Schneiderat, M. C. Walter, B. Schoser and H. Lochmüller (2011). "A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A)." Journal of neurology **258**(8): 1437-1444.

- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz and J. P. Mesirov (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-26.
- Rubin, I. L. and A. S. Buchberg (1952). "The heart in progressive muscular dystrophy." American heart journal **43**(2): 161-169.
- Safaei, N., G. Kozlov, A. M. Noronha, J. Xie, C. J. Wilds and K. Gehring (2012). "Interdomain allostery promotes assembly of the poly (A) mRNA complex with PABP and eIF4G." Molecular cell **48**(3): 375-386.
- Saito, M., H. Kawai, M. Akaike, K. Adachi, Y. Nishida and S. Saito (1996). "Cardiac dysfunction with Becker muscular dystrophy." American heart journal **132**(3): 642-647.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the national academy of sciences **74**(12): 5463-5467.
- Saxena, R., B. F. Voight, V. Lyssenko, N. P. Burtt, P. I. de Bakker, H. Chen, J. J. Roix, S. Kathiresan, J. N. Hirschhorn and M. J. Daly (2007). "Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels." Science **316**(5829): 1331-1336.
- Schuster, S. C. (2007). "Next-generation sequencing transforms today's biology." Nature methods **5**(1): 16.
- Shapiro, H. S., J. Ribeilima and V. E. Wendt (1964). "Myocardial infarction in progressive muscular dystrophy." American Journal of Cardiology **14**(2): 232-236.
- Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nature biotechnology **26**(10): 1135.
- Stothard, P. (2000). "The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences." Biotechniques **28**(6): 1102, 1104.
- Straub, V., A. Murphy and B. Udd (2018). "229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017." Neuromuscul Disord **28**(8): 702-710.
- Suh, Y. and J. Vijg (2005). "SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **573**(1): 41-53.
- Takenaka, A., M. Yokota, M. Iwase, K. Miyaguchi, H. Hayashi and H. Saito (1993). "Discrepancy between systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle in patients with Duchenne muscular dystrophy." European heart journal **14**(5): 669-676.
- Tarun, S. and A. B. Sachs (1996). "Association of the yeast poly (A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G." The EMBO journal **15**(24): 7168-7177.
- Taylor, M. R., E. Carniel and L. Mestroni (2006). "Cardiomyopathy, familial dilated." Orphanet journal of rare diseases **1**(1): 27.
- Thompson, R. and V. Straub (2016). "Limb-girdle muscular dystrophies—international collaborations for translational research." Nature Reviews Neurology **12**(5): 294.
- Thorvaldsdottir, H., J. T. Robinson and J. P. Mesirov (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." Brief Bioinform **14**(2): 178-192.
- Towbin, J. A., A. M. Lowe, S. D. Colan, L. A. Sleeper, E. J. Orav, S. Clunie, J. Messere,

-
- G. F. Cox, P. R. Lurie and D. Hsu (2006). "Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children." Jama **296**(15): 1867-1876.
- Van der Kooi, A., W. De Voogt, P. Barth, H. Busch, F. Jennekens, P. Jongen and M. De Visser (1998). "The heart in limb girdle muscular dystrophy." Heart **79**(1): 73-77.
- Walton, J. N. and F. J. Nattrass (1954). "On the classification, natural history and treatment of the myopathies." Brain **77**(2): 169-231.
- Wang, Y. and S. A. Armstrong (2007). "Genome-wide SNP analysis in cancer: leukemia shows the way." Cancer cell **11**(4): 308-309.
- Wei, C., L. Stock, C. Schneider-Gold, C. Sommer, N. A. Timchenko and L. Timchenko (2018). "Reduction of Cellular Nucleic Acid Binding Protein Encoded by a Myotonic Dystrophy Type 2 Gene Causes Muscle Atrophy." Molecular and cellular biology **38**(14): e00649-00617.
- Weintraub, R. G., C. Semsarian and P. Macdonald (2017). "Dilated cardiomyopathy." The Lancet.
- Weisenfeld, S. and W. J. Messinger (1952). "Cardiac involvement in progressive muscular dystrophy." American heart journal **43**(2): 170-187.
- Yamamoto, S., H. Matsushima, A. Suzuki, I. Sotobata, T. Indo and Y. Matsuoka (1988). "A comparative study of thallium-201 single-photon emission computed tomography and electrocardiography in Duchenne and other types of muscular dystrophy." American Journal of Cardiology **61**(10): 836-843.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T. L. Madden (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC Bioinformatics **13**: 134.
- Zatuchni, J., E. E. Aegerter, L. Molthan and C. R. Shuman (1951). "The heart in progressive muscular dystrophy." Circulation **3**(6): 846-853.
- Zhao, Z., Y.-X. Fu, D. Hewett-Emmett and E. Boerwinkle (2003). "Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution." Gene **312**: 207-213.

8 ANHANG

8.1 PABPC1 Exon-Exon-Grenzen

uc003yjs.1

```

          10          20          30          40          50          60
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
 1 ATGAACCCAGTGCCCCAGCTACCCATGGCCTCGCTCTACGTGGGGACCTCCACCCC 60
 1 M N P S A P S Y P M A S L Y V G D L H P 20

          70          80          90          100         110         120
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 GACGTGACCGAGGCGATGCTCTACGAGAAGTTACGCCGGCCGGCCATCCTCTCCATC 120
21 D V T E A M L Y E K F S P A G P I L S I 40

          130         140         150         160         170         180
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 CGGGTCTGACGGGACATGATCACCCGCCGCTCCTTGGGCTACGCGTATGTGAACCTCCAG 180
41 R V C R D M I T R R S L G Y A Y V N F Q 60

          190         200         210         220         230         240
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 CAGCCGGCGGACGCGGAGCGTGCTTTGGACACCATGAATTTTGATGTTATAAAGGGCAAG 240
61 Q P A D A E R A L D T M N F D V I K G K 80
      ||
      exon1/exon2

          250         260         270         280         290         300
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 CCAGTACGCATCATGTGGTCTCAGCGTGATCCATCACTTCGCAAAAGTGGAGTAGGCAAC 300
81 P V R I M W S Q R D P S L R K S G V G N 100

          310         320         330         340         350         360
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 ATATTCATTAATACTGGACAAATCCATTGATAATAAAGCACTGTATGATACATTTTCT 360
101 I F I K N L D K S I D N K A L Y D T F S 120

          370         380         390         400         410         420
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 GCTTTTGGTAACATCCTTTTCATGTAAGGTGGTTTGTGATGAAAATGGTTCCAAGGCTAT 420
121 A F G N I L S C K V V C D E N G S K G Y 140
      ||
      exon2/exon3

          430         440         450         460         470         480
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 GGATTTGTACNCTTTGAGANGCAGGAAGCAGCTGAAAGAGNTATTGAAAAATGAATGGA 480
141 G F V X F E X Q E A A E R X I E K M N G 160

          490         500         510         520         530         540
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 ATGCCTCTAATGANCACAAAGTATTTGTTGGACGATTTAAGTCTCGTAAAGAACGAGAA 540
161 M L L N X R K V F V G R F K S R K E R E 180
      ||
      exon3/exon4

          550         560         570         580         590         600
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 GCTGAACTGGAGCTAGGGCAAAAGAATTCACCAATGTTTACATCAAGAATTTGGAGAA 600
181 A E L G A R A K E F T N V Y I K N F G E 200

          610         620         630         640         650         660
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 GACATGGATGATGAGCGCCTTAAGGATCTCTTTGGCAAGTTTGGGCTGCCTTAAGTGTG 660
201 D M D D E R L K D L F G K F G P A L S V 220
      ||
      exon4/exon5

          670         680         690         700         710         720
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 AAAGTAATGACTGATGAANGTGAAAATCCAAAGGATTTGGATTTGTAAGCTTTGAAAGG 720
221 K V M T D E X G K S K G F G F V S F E R 240
          730         740         750         760         770         780

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 CATGANGATGCACAGAAAGCTGTGGATGAGATNAAANGAAAGGAGCTCAATGGAAAAACAA 780
241 H X D A Q K A V D E X X G K E L N G K Q 260
      ||
      exon5/exon6

          790          800          810          820          830          840
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781 ATTTATGTTGGTCGAGCTCAGAAAAAGGTGGAACGGCAGACGGAACCTAAGCGCAAATTC 840
261 I Y V G R A Q K K V E R Q T E L K R K F 280

          850          860          870          880          890          900
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
841 GAACAGATGAAACAAGATAGGATCACCAGANACCAGGGTGTAAATCTTTATGTGAAAAAT 900
281 E Q M K Q D R I T R X Q G V N L Y V K N 300
      ||
      exon6/exon7

          910          920          930          940          950          960
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
901 CTTGATGATGGTATTGATGATGAACGTCTCCGAAAGAGTTTTCTCCATTTGGTACAATC 960
301 L D D G I D D E R L R K E F S P F G T I 320

          970          980          990          1000          1010          1020
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
961 ACTAGTGCAAAGGTTATGATGGAGGGTGGTCGCAGCAAAGGGTTTGGTTTTGTATGTTTC 1020
321 T S A K V M M E G G R S K G F G F V C F 340
      ||
      exon7/exon8

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1021 TCCTCNCCAGAAGAAGCCACTAAAGCAGTTACAGAAATGAACGGTAGAATTGTGGCCACA 1080
341 S S P E E A T K A V T E M N G R I V A T 360

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 AAGCCATTNTATGTAGCTTTAGCTCAGCGCAAAGAAGAGCGCCAGGCTCACCTCACTAAC 1140
361 K P X Y V A L A Q R K E E R Q A H L T N 380

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1141 CAGTATATGCAGAGAATGGCAAGTGTACGAGCTGTNCCCAACCCTGTAATCAACCNTAC 1200
381 Q Y M Q R M A S V R A V P N P V I N P Y 400

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1201 CAGCCAGCACCTCCCTCAGGTTACTTCATGGCAGCTATCCACAGACTCAGAACCGTGCT 1260
401 Q P A P P S G Y F M A A I P Q T Q N R A 420
      ||
      exon8/exon9

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1261 GCATACTATCCTCCTAGCCAAATGCTCAACTAAGACCAAGTCCCTCGCTGGACTGCTCAG 1320
421 A Y Y P P S Q I A Q L R P S P R W T A Q 440

          1330          1340          1350          1360          1370          1380
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1321 GGTGCCAGACCTCATCCATTCCAAAATATGCCCGGTGCTANCCGCCAGCTGCTCCTAGA 1380
441 G A R P H P F Q N M P G A X R P A A P R 460
      ||
      exon9/exon10

          1390          1400          1410          1420          1430          1440
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1381 CCACCATTTAGTACTATGAGACCAGCTTCTTCACANGTTCACGAGTCATGTCAACACAG 1440
461 P P F S T M R P A S S X V P R V M S T Q 480

          1450          1460          1470          1480          1490          1500
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1441 CGTGTGCTAACACATCAACACAGACAATGGGTCCANGTCCTGCAGCTGCAGCNGCTGCA 1500
481 R V A N T S T Q T M G P X P A A A A A A 500
      ||
      exon10/exon11

```

```

          1510      1520      1530      1540      1550      1560
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1501 GCTACTCCTGCTNTCNGCACCGTTCCACAGTATAAATATGCTGCAGGANTTCGCAATCCT 1560
501 A T P A X X T V P Q Y K Y A A G X R N P 520

          1570      1580      1590      1600      1610      1620
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1561 CAGCAACATCTTAATGCACAGCCACAAGTTACAATGCAACAGCCTGCTGTTTCATGTACAA 1620
521 Q Q H L N A Q P Q V T M Q Q P A V H V Q 540
      ||
      exon11/exon12

          1630      1640      1650      1660      1670      1680
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1621 GGTCAGGAACCTTTTGACTGCTTCCATGTTGGCATCTGCCCTCCTCAAGAGCAAAAGCAA 1680
541 G Q E P L T A S M L A S A P P Q E Q K Q 560

          1690      1700      1710      1720      1730      1740
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1681 ATGTTGGGTGAACGGCTGTTTCCCTTANTCAAGCCATGCACCCTACTCTTGCTGGTAAA 1740
561 M L G E R L F P L X Q A M H P T L A G K 580
      ||
      exon12/exon13

          1750      1760      1770      1780      1790      1800
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1741 ATCACTGGCATGTTGTTGGAGATTGATAATTCAGAACTTCTTCATATGCTCGAGTCTCCA 1800
581 I T G M L L E I D N S E L L H M L E S P 600

          1810      1820      1830      1840      1850      1860
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1801 GAGTCACTCCGTTCTAAGGTTGATGAAGCTGTAGCTGTACTACAAGCCACCAAGCTAAA 1860
601 E S L R S K V D E A V A V L Q A H Q A K 620
      ||
      exon13/exon14

          1870      1880      1890      1900      1910
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1861 GAGGCTGCCAGAAAGCAGTTAACAGTGCCACCGTGTTCCAAGTGTAA 1911
621 E A A Q K A V N S A T G V P T V * 636

```

Die Darstellung des kodierenden Bereichs des *PABPC1*-Gens mit den Exon-Exon-Grenzen wurde im Rahmen des Primer-Designs mit Hilfe der ExonPrimer-Anwendung über die UCSC Genome Browser-Webseite generiert (Kent, Sugnet et al. 2002).

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. M. Dieterich FANA, FEAN, Direktorin der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Friedrich-Baur-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität und Frau Prof. Dr. med. Maggie Walter, M.A., die es ermöglichten, die Dissertation am Friedrich-Baur-Institut unter besten Arbeitsbedingungen durchzuführen.

Besonders möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause bedanken, die mir stets helfend zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor für Molekulare Myologie bedanken. Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Johannes Vogel für die ausführliche Einarbeitung im Labor bedanken.

Auch bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie mir stets zur Seite standen, mir das Medizinstudium ermöglichten und somit das Verfassen der Doktorarbeit möglich war.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Molekulargenetische Untersuchung des Kandidatengens *PABPC1* bei hereditären Gliedergürtelmuskeldystrophien

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.

Ottobrunn, den 29.11.2021

Katharina Melanie Kramer