

Aus dem Friedrich-Baur-Institut
Neurologische Klinik und Poliklinik
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Marianne Dieterich



**Nicht-radioaktiver Nachweis von CTG-Repeats in
Muskelgewebe von Patienten mit
myotoner Dystrophie Typ 1**

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

vorgelegt von

Raphaela Victoria Mensel

aus Gütersloh

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Benedikt Schoser
Mitberichterstatter: PD Dr. med. vet. Marlene Reithmair
apl. Prof. Dr. rer. nat. Alexander Faußner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Stefan Hintze

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	13
1. Einleitung	17
1.1 Allgemeine Einführung	17
1.2 Geschichte	19
1.3 Diagnostik	19
1.4 Molekularpathogenese.....	21
1.5 Phänotyp	22
1.6 Aktuelle Therapiemöglichkeiten	25
2. Fragestellung.....	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Zellkultur	29
3.2 DNA-Isolierungsmethoden	29
3.2.1 Myoblasten	29
3.2.2 Leukozyten	30
3.3 Gelelektrophorese	31
3.4 PCR zur Klonierung von CTG-Repeats	31
3.5 Restriktionsverdau	32
3.6 Gelextraktion.....	32
3.7 Plasmidfällung	33
3.8 Blunt-end Ligation.....	33
3.9 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	33

3.10 Plasmidisolation	34
3.11 Plasmidkarten	35
3.12 DIG-Markierung der Sonde	35
3.13 Tüpfeltest der Sonde.....	36
3.14 <i>Small-pool</i> -PCR	36
3.15 Southern Blot.....	37
3.16 Detektion	39
3.17 Berechnung der Repeatanzahl.....	39
3.18 Materialien.....	40
Polymerasen	42
Restriktionsenzyme	43
4. Ergebnisse	44
4.1 Patientenrekrutierung	44
4.2 Kultivierung primärer Zellen.....	45
4.3 DNA-Gewinnung	45
4.4 Herstellung einer CTG-Repeat-spezifischen Sonde.....	46
4.5 Herstellung eines CTG-Repeat-haltigen Markers	47
4.6 Optimierung der <i>small-pool</i> -PCR.....	50
4.7 Bestimmung der Repeat-Länge durch <i>small-pool</i> -PCR im Muskelgewebe von DM1-Patienten.....	52
Patient DM1-2.....	52
Patient DM1-3.....	54
Patient DM1-5.....	55
4.8 Klinik der Patienten	57
Patient DM1-2.....	57

Patient DM1-3.....	58
Patient DM1-5.....	59
4.9 Vergleich der CTG-Repeatanzahl mit dem klinischen Phänotyp	59
5. Diskussion	61
5.1 Quantifizierung der CTG-Repeatanzahl im Muskelgewebe	61
5.2 Quantifizierung der CTG-Repeatanzahl mit Hilfe der <i>small-pool</i> PCR	62
5.3 Nicht-radioaktive Detektionsverfahren.....	64
5.4 Bewertung der erhobenen Ergebnisse.....	65
5.5 Perspektive	67
Bibliographie.....	69
Danksagung	83
Eidesstattliche Erklärung	85

Zusammenfassung

Die hier vorliegende Promotionsarbeit hatte die Etablierung einer nicht-radioaktiven Methodik zur quantitativen Bestimmung von CTG-Repeats in Muskelgewebe von Patienten mit Myotoner Dystrophie Typ I (DM1) zum Ziel. Dies sollte eine genauere, gewebespezifische Korrelation von Repeatlänge und klinischem Phänotyp erlauben.

Mit Hilfe der hierfür optimierten *small-pool*-PCR und Digoxigenin-markierten, CTG-spezifischen Sonden gelang es, die zuvor im Blut der Patienten bestimmten Allellängen zu bestätigen und die Mosaiksituation der CTG-Repeats im Muskel eindrucksvoll darzustellen.

Es zeigte sich, dass eine unmittelbare DNA-Extraktion aus den entnommenen Muskeln der Extraktion aus subkultivierten Myoblasten hinsichtlich der erfassten Allellängen deutlich überlegen ist. Zudem scheint die richtige Wahl der Polymerase (Ampli-Taq) für die Amplifikation der oft sehr langen, hoch-repetitiven DNA-Abschnitten von besonderer Bedeutung zu sein.

Auf dem Boden der hier etablierten Methodik wird es in Zukunft möglich sein, in einem großen Patientenkollektiv gewebespezifische Aussagen über die CTG-Repeatanzahl in unterschiedlichen Muskelgruppen und Organen bei DM-1 Patienten zu treffen. Dies kann dabei helfen, das Verständnis zwischen molekularpathologischen Veränderungen und klinischem Erscheinungsbild zu vertiefen und gegebenenfalls therapeutisch zu nutzen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	19
Abbildung 2	35
Abbildung 3	45
Abbildung 4	47
Abbildung 5	48
Abbildung 6	49
Abbildung 7	51
Abbildung 8	52
Abbildung 9	53
Abbildung 10	54
Abbildung 11	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	44/45
Tabelle 2	46
Tabelle 3	48
Tabelle 4	50
Tabelle 5	53
Tabelle 6	55
Tabelle 7	57

Abkürzungsverzeichnis

³² P	Phosphorus-32
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (einfach destilliertes Wasser)
ATE	Solution A-Tris-EDTA
BIPAP	Biphasic Positive Airway Pressure
bp	Basenpaar
CCG	Cytosin Cytosin Guanin
CCTG	Cytosin Cytosin Thymin Guanin
CCUG	Cytosin Cytosin Uracil Guanin
CELF1	<i>CUGBP Elav-like family member 1</i>
CK	Kreatinkinase
cm	Zentimeter
CRSPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSPD	<i>[3-(1-chloro-3'-methoxyspiro[adamantane-4,4'-dioxetane]-3'-yl)phenyl] dihydrogen phosphate</i>
CTG	Cytosin Thymin Guanin
CUG	Cytosin Uracil Guanin
CUGBP	<i>CUG triplet repeat, RNA binding protein 1</i>
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i>
DIG	Digoxigenin
DM	<i>Dystrophia myotonica</i> (Myotone Dystrophie)
DM1	Myotone Dystrophie Typ 1
DM2	Myotone Dystrophie Typ 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMPK	<i>dystrophia myotonica protein kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiografie
EMG	Elektromyografie

ePAL	<i>estimated progenitor allele length</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GGC	Guanin Guanin Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IQ	Intelligenzquotient
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogenkarbonat
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
M	molare Masse
M.	musculus
MBNL-1	<i>Muscleblind Like Splicing Regulator 1</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MTCC	Munich tissue culture collection
Na ₂ EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
PTH	Parathormon
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SGM-Medium	<i>Skeletal Muscle Cell Growth Medium</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TP-PCR	<i>Triplet Repeat Primed PCR</i>
U/min	Umdrehungen/Minute
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
ZI	Zeitinkrement
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die Myotone Dystrophie (*Dystrophia myotonica* [griech.], DM) ist eine autosomal-dominant vererbare Repeaterkrankung, welche zu systemübergreifenden Symptomen sowohl mit muskulären als auch extramuskulären Manifestationen mit vordergründiger Muskeldystrophie und Myotonie führt (Schneider-Gold et al., 2010). Die langsam fortschreitende Muskelschwäche betrifft vor allem die distalen Muskelgruppen der Extremitäten, die Gesichtsmuskeln (Facies myotonica) sowie die Hals- und Nackenmuskulatur. Typisch für extramuskuläre Symptome sind ein frühzeitiger Katarakt, endokrine Störungen sowie kardiale Beteiligungen, wie Rhythmusstörungen und Kardiomyopathien. Die klinische Ausprägung der Erkrankung ist bei den Patienten sehr unterschiedlich und hängt mit dem Ausmaß der individuellen genetischen Pathologie zusammen (Udd and Krahe, 2012).

Bei der Myotonen Dystrophie wird zwischen DM Typ 1 (DM1) und DM Typ 2 (DM2) unterschieden. DM1 (auch Morbus Curschmann-Steinert) wird durch heterozygote Trinukleotid-Repeat-Expansionen (CTG) in der 3'-UTR (engl. *untranslated region*), also in einer nicht-codierenden Region des *DMPK*-Gens (*dystrophia myotonica-protein kinase*) auf Chromosom 19q13.3 verursacht. Diese Mutation wurde erstmals 1992 beschrieben (Brook et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). DM2-verursachende Mutationen sind Expansionen eines Vier-Basen-Repeats (CCTG) im Intron 1 des Zinkfingerprotein-9-(ZNF-9)-Gens auf Chromosom 3q (Liquori et al., 2001). Bei DM1 wird eine Repeatlänge von mehr als 50, bei DM2 von mehr als 75 Repeats als kausal für die phänotypische Ausprägung der Erkrankung definiert. Prämutationsallele werden bei der DM1 Allele genannt, die eine Länge von 35-49 CTG-Repeats haben (Bird, 1993; The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC), 2000). In der gesunden Population finden sich Repeatlängen von 5-34 Repeats.

Die Repeatexpansionen können sowohl die Keimbahn, als auch somatische Zellen betreffen (Pearson et al., 2005; Cleary et al., 2010; Dogan et al., 2016; Yum et al., 2017). Daher kann bei der Myotonen Dystrophie auch das Phänomen der genetischen Antizipation beobachtet werden (Erläuterung s.u.).

Bei der DM1 ist eine Korrelation zwischen der Repeatlänge und der Schwere der Erkrankung beschrieben - je länger die Repeats sind, desto ausgeprägter und früher zeigt sich die klinische Symptomatik (La Spada, 1997; Logigian et al., 2004). Diese

Korrelation konnte bei der DM2 bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Turner and Hilton-Jones, 2010).

Nichtsdestotrotz handelt es sich lediglich um eine Korrelation, die nicht dazu verleiten darf, aufgrund der Repeat-Länge eine genaue Prognose zu stellen, da der klinische Phänotyp eines Patienten sehr individuell ist und nicht nur anhand der CTG-Anzahl prognostiziert werden kann (Lavedan et al., 1993; Smith and Gutmann, 2016).

Darüber hinaus sind die Repeats während der Meiose und Mitose sehr instabil, weshalb es zu Mosaiksituationen kommen kann, das bedeutet, betroffene Patienten können Allele mit unterschiedlichen Größen in verschiedenen Geweben (Lavedan et al., 1993; Pearson et al., 2005) aufweisen. Diese Instabilität ist möglicherweise ursächlich für die unterschiedliche Ausprägung der klinischen Symptome sowohl innerhalb einer Patientenpopulation wie auch innerhalb der Organsysteme eines Patienten. Auch die sogenannte Antizipation, ein früheres und schwereres Auftreten der Symptome in nachfolgenden Generationen, lässt sich aus dieser Instabilität erklären (Redman et al., 1993). Dabei spielt insbesondere das Geschlecht des Elternteils, welcher die Mutation trägt und an die Nachkommen weitergibt, eine Rolle bei der Elongation der kindlichen Allele. Diese Repeat-Verlängerungen finden insbesondere bei der maternalen Transmission statt (Brunner et al., 1993). Kinder von Patienten mit symptomatischer DM1 haben ein hohes Risiko, eine stärkere, meist kongenital ausgeprägte Form der Myotonen Dystrophie zu entwickeln. Eine kongenitale Form und eine klinisch relevante Antizipation ist bei der DM2 bisher nicht bekannt (Udd et al., 2003).

Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Repeats im Muskel häufig länger sind als diejenigen der zur Diagnostik meist verwendeten Leukozyten (Anvret et al., 1993; Thornton et al., 1994). Diese Erkenntnis stützt die Hypothese der somatischen Instabilität in unterschiedlichen Geweben. Ferner zeigt sich auch eine Heterogenität in Zellen des gleichen Gewebetyps, die durch die hohe Instabilität und Mutabilität der Repeats bei mitotischer Zellteilung erklärt werden kann (Pearson et al., 2005). Hinzu kommt, dass ein gewisser Teil (3-5%) von DM1-Patienten untypische Repeatmuster mit Unterbrechungen (CCG-, GGC- und CTG-Repeats) innerhalb des DMPK-Repeatstrangs haben und diese in den nachfolgenden Generationen unterschiedlich variieren sowie andere Lokalisationen aufweisen können (Braida et al., 2010; Musova et al., 2009).

Die DM1 ist die häufigste hereditäre Muskelerkrankung im Erwachsenenalter. Insgesamt haben die Myotonen Dystrophien weltweit eine Prävalenz von ca. 5-180 pro 1 Mio. Menschen. Die absolute Häufigkeit variiert dabei von Region zu Region. Die bisher

höchste Prävalenz der Myotonen Dystrophie ist in Kroatien zu finden (Theadom et al., 2014).

1.2 Geschichte

Die Erstbeschreibung der Myotonen Dystrophie als eigenständige Erkrankung erfolgte erstmals 1909 durch den Internisten Hans Steinert (1875-1911) (Steinert, 1909). Dieser war ab 1901 an der Uniklinik Leipzig als Assistenzarzt unter Curschmann tätig und bezeichnete die Krankheit bereits damals als „myotonische Dystrophie“. Steinert erfasste, dass die Patienten ein „stereotypes“ Erscheinungsbild haben und eine Muskelatrophie insbesondere der Gesichts-, Kau-, Hals-, Vorderarm- und der kleinen Handmuskeln aufweisen. Hans Curschmann (1875-1950) ergänzte das Erscheinungsbild der Erkrankung ab 1912 durch weitere Merkmale und beschrieb somit eine Beteiligung mehrerer Organsysteme (Curschmann, 1912).

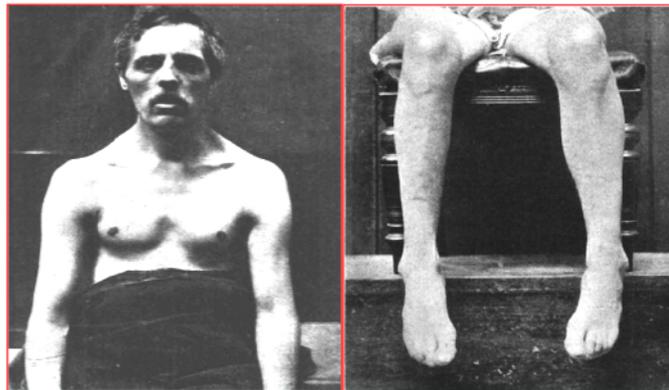


Abbildung 1: Erste Abbildung eines Patienten mit DM1 im Jahr 1909 (Batten and Gibb, 1909)

Der Schweizer Ophthalmologe Bruno Fleischer beschäftigte sich mit dem gehäuften Auftreten des Katarakts bei Patienten mit „myotonischer Dystrophie“ und analysierte des Weiteren anhand von Familienstambäumen, dass es eine Relation zwischen milder Symptomatik mit myotonem Katarakt in der ersten Generation und schwereren und früher auftretenden muskulären und extramuskulären Symptomen in der nachfolgenden Generation gibt. Er beschrieb somit bereits 1908 das Prinzip der Antizipation, ohne die molekulare Ursache dafür zu kennen (Fleischer, 1918).

1.3 Diagnostik

Diagnostisch wird standardmäßig eine DNA-Analyse mit Blutproben zur molekulargenetischen Untersuchung durchgeführt. Dabei bilden die PCR sowie der Southern Blot die Grundlage der diagnostischen Repeatlängen-Bestimmung aus der

DNA der gewonnenen Leukozyten (Turner and Hilton-Jones, 2010; Kamsteeg et al., 2012).

Für die Diagnostik obligate Untersuchungen sind neben der klinischen Untersuchung auch die laborchemischen Befunde. Dazu gehört die Bestimmung der CK, Transaminasen, GGT, des Blutzuckers, HbA1c und der Schilddrüsenwerte (Schneider-Gold et al., 2018). Zu den klassischen EMG-Befunden bei DM-Patienten gehören myotone Entladungsserien sowie myopathietypische EMG-Veränderungen (Hehir and Logigian, 2013). Aufgrund des hohen Auftretens von myotonen Katarakten bei DM-Patienten sollte eine augenärztliche Untersuchung zur frühzeitigen Erkennung erfolgen und aufgrund der kardialen Beteiligung EKG-Ableitungen sowie Langzeit-EKGs angefordert werden. Auch empfehlen die Leitlinien Lungenfunktionsprüfungen (Schneider-Gold et al., 2018).

Zur Diagnosestellung sollte eine molekulargenetische Untersuchung erfolgen (s.u.). Auch eine genetische Beratung, insbesondere für Risikopersonen in betroffenen Familien, wird empfohlen (Schneider-Gold et al., 2018).

Fakultativ kommen nach individueller Entscheidung und Besprechung mit dem Patienten folgende Untersuchungen hinzu:

Eine Echokardiographie zum Ausschluss einer Kardiomyopathie, die Beurteilung der Blasenfunktion (Restharnsonographie), bei klinisch manifestem Hypogonadismus Bestimmung der Hormonwerte als Grundlage für eine mögliche Behandlung, Durchführung eines Kernspintomogramms der Muskulatur zur Stuserhebung, Durchführung einer neuropsychologischen Leistungstestung und eines Kernspintomogramms des Gehirns mit der Frage nach einer zerebralen Beteiligung, Bestimmung der Immunglobuline im Serum als ergänzender serologischer Parameter sowie eine Muskelbiopsie in unklaren Fällen (Schneider-Gold et al., 2018).

Zur molekulargenetischen Untersuchung wird routinemäßig die genomische DNA aus dem Blut des Patienten gewonnen. In aller Regel wird im Anschluss daran zunächst eine konventionelle PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) des *DMPK*-Gens mit flankierenden Primern durchgeführt (Chakraborty et al., 2016). Bei homozygoten, gesunden Menschen mit zwei normal langen Allelen erscheint eine einzige Bande, da beide Allele die gleiche Länge haben und somit optisch nur eine Bande aufweisen. Heterozygote Patienten mit einem normal langen und einem gering expandierten Allel präsentieren zwei Banden. 100 und weniger Repeats können mit der konventionellen PCR sowie Fluoreszenz-

markierten Primern amplifiziert und detektiert werden. Hat jedoch das mutierte Allel ein extrem langes CTG-Repeat, wird mit der konventionellen PCR nur eine Bande (die des Wildtyp-Allels) dargestellt, da sehr lange Allele mit der konventionellen PCR nur schwer amplifizierbar sind (Kamsteeg et al., 2012). Im umgekehrten Schluss kann daraus die falsche Annahme resultieren, dass der Patient gesund sei, da fälschlicherweise die einzelne sichtbare Bande als gemeinsame Erscheinung beider „gesunder“ Allele angenommen wird. Um dies zu überprüfen, sollte bei Vorliegen einer einzelnen Bande eine TP-PCR (*Triplet-repeat-primed-PCR*), eine *small-pool-PCR* und/oder ein Southern Blot durchgeführt werden (Kamsteeg et al., 2012; Chakraborty et al., 2016; Yum et al., 2017). Zur Detektion wird entweder das PCR-Produkt oder genomische DNA, welche zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde, verwendet (Yum et al., 2017).

Zur Detektion der Repeats werden bei der Durchführung der Southern Blot-Hybridisierung standardmäßig radioaktiv-markierte Sonden, zum Beispiel mittels ^{32}P , verwendet. Diese binden an die repetitiven Abschnitte des amplifizierten PCR-Produkts. Bildtechnisch können die Banden anschließend mittels Röntgendetektoren sichtbar gemacht werden (Tomé et al., 2014).

1.4 Molekularpathogenese

Ein wesentlicher Hauptfaktor in der Pathogenese der Myotonen Dystrophie ist der fehlregulierte Mechanismus bei der RNA-Transkription (Tian et al., 2000). Sowohl die DM1 als auch die DM2 werden als RNA-vermittelte Erkrankungen bezeichnet, die ihren Ursprung in repetitiven RNA Abschnitten (CUG- bzw. CCUG-Repeats) nehmen (Ranum and Cooper, 2006). Die pathologisch verlängerten CUG-Repeats induzieren ein fehlerhaftes Splicing der prä-mRNA, welche dann unter Ausbildung von haarnadelförmigen Strukturen (den sogenannten *hairpins* (Tian et al., 2000)) in Kerneinschlüssen, den so genannten ribonukleären Foci, sowie im Zytoplasma angereichert wird (Ranum and Cooper, 2006). Dies wiederum bedingt Wechselwirkungen der toxischen RNA mit RNA-bindenden Proteinen, die Proteinexpression und RNA-Splicing regulieren (Ranum and Cooper, 2006).

Im Detail kommt es zu einer verstärkten nukleären Sequestrierung u.a. von *muscle-blind* (MBNL-1, ein RNA-Bindeprotein) in ribonucleären Foci sowie einer erhöhten Stabilisierung und vermehrten Expression *CUGBP/Elav-like-family member 1* (CELF1) (Phillips et al., 1998; Fardaei et al., 2001; Lin et al., 2006). Beide Proteine wurden in der Vergangenheit als wichtige Regulatoren des alternativen Splicens identifiziert (Kalsotra et al., 2008). Die veränderte Balance von MBNL-1 und CELF1 bedingen das Vorkommen

von embryonalen Splicing-Isoformen in adulten Geweben, die wesentlich zur Pathologie der Erkrankung beitragen (Sicot et al., 2011; Rohilla and Gagnon, 2017; Hale et al., 2019; Tomé and Gourdon, 2020).

1.5 Phänotyp

Die myotone Dystrophie ist in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich und der Verlauf kann von einem sehr milden bis hin zum sehr ausgeprägten klinischen Bild variieren. Die Symptomatik und das Manifestationsalter korrelieren tendenziell mit der Länge der CTG-Repeats, wobei Patienten mit mehr als 400 Repeats eine weniger ausgeprägte Korrelation zeigen (Schara and Schoser, 2006).

Eine Einteilung der Myotonen Dystrophie Typ 1 erfolgt in drei Grade (milde, klassische, schwere Form) sowie der Klinik und des Manifestationsalters entsprechend in folgende Kategorien: Kongenital (< 1 Monat), Infantil (1 Monat bis 10 Jahre), Juvenil (10 bis 20 Jahre), Erwachsen (20 bis 40 Jahre), *late-onset* (> 40 Jahre) (De Antonio et al., 2016; Wenninger et al., 2018).

Bei der kongenitalen Form der Myotonen Dystrophie tritt die Symptomatik in der Regel bereits bei oder kurz nach der Geburt auf (Bird, 1993). Während der Schwangerschaft können ein Polyhydramnion sowie geringe fetale Bewegungen auffällig sein. Nach der Geburt sind Hypotonie, Hyporeflexie, allgemeine Schwäche, Trinkschwäche, Gesichtsdysmorphien, respiratorische Schwierigkeiten bis hin zur Ateminsuffizienz in 50% der Fälle typische Erscheinungsformen (Wenninger et al., 2018). Insgesamt haben Patienten mit einer kongenitalen Form der DM eine schlechtere Prognose (Mathieu et al., 1999).

Eine kongenitale Form bei der DM2 ist bisher nicht beschrieben (Schoser, 2006).

Einige Patienten mit diagnostizierter Myotoner Dystrophie haben einen sehr milden Verlauf oder einen sehr späten Manifestationszeitpunkt, so dass sie ein relativ beschwerdefreies Leben ohne Alltagseinschränkungen führen können. Bei anderen Patienten wiederum verläuft die Erkrankung sehr ausgeprägt. Das Manifestationsalter der klassischen Form liegt im Durchschnitt zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr (Bird, 1993).

Die Hauptsymptome der Myotonen Dystrophie Typ I sind muskulären Ursprungs und bedingen eine Myotonie, insbesondere im Bereich der Hände und Beine, eine Muskelschwäche und eine Muskelatrophie beginnend im Bereich der Unterschenkel und Unterarme sowie der Kopfbeuger (Schneider-Gold et al., 2018). Klassischerweise ist bei

der DM1 die Extremitätenschwäche distal stärker ausgeprägt als proximal. Bei der klassischen Form der DM2 ist dieses Phänomen *vice versa*: Die proximale Muskulatur ist stärker als die distale betroffen (Ricker et al., 1994). Typisch ist das so genannte *warm-up*-Phänomen, bei welchem es zu einer Verminderung der Myotonie durch wiederholte Muskelkontraktionen kommt (Bird, 1993). Die Muskelschwäche zeigt einen langsamen, aber progressiven Verlauf, welcher von der CTG-Repeat-Anzahl abhängt (Bouchard et al., 2015). Zudem ist der skelettale Muskelschmerz ein häufig begleitendes und belastendes Symptom (Parmova, 2014).

Weitere typische körperliche Erscheinungsbilder sind die so genannte „Facies myopathica“, eine ausgeprägte Atrophie des M. temporalis, sowie die Stirnglatze (Schneider-Gold et al., 2010). Auch die glatte Muskulatur kann betroffen sein, weshalb Patienten über Dysphagie, Verstopfungen und Diarrhoe leiden können. Des Weiteren sind auch abdominelle Schmerzen, Reflux und Cholestase häufig. Auch Erbrechen und Stuhlinkontinenz können zu den gastrointestinalen Symptomen gehören (Rönblom et al., 1996; Bellini et al., 2006; Hilbert et al., 2017). Generell sind gastrointestinale Symptome bei DM-Patienten sehr häufig, treten oft auch vor Diagnosestellung auf und sind für viele Patienten sehr belastend: Etwa ein Viertel der Patienten hält die assoziierten gastrointestinale Symptome für die gravierendsten Symptome ihrer Erkrankung (Rönblom et al., 1996).

Da die Myotone Dystrophie eine Multiorganerkrankung ist, sind die extramuskulären Symptome sehr vielfältig und variieren zwischen den einzelnen Patienten sehr stark.

Viele Patienten mit DM1 haben typischerweise einen Katarakt, welcher oft sehr früh auftritt und aus diesem Grund in dem langfristigen Behandlungsprozess eine regelmäßige augenärztliche Untersuchung alle zwei Jahre bedingen sollte (Turner and Hilton-Jones, 2014; Voermans et al., 2015; Ashizawa et al., 2018).

Eine kardiale Beteiligung ist bei DM-Patienten häufig zu beobachten und bei manchen Patienten auch das initiale Symptom. Besonders häufig sind dabei Kardiomyopathien und Arrhythmien (McNally and Sparano, 2011). Aufgrund des erhöhten Risikos für Vorhofflimmern besteht bei diesen Patienten ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle. Daher sollten regelmäßige kardiologische Kontrollen erfolgen und etwaige Arrhythmien frühzeitig behandelt werden (Yoshida et al., 2018). Eine Korrelation zwischen der Repeatlänge und kardialen Komplikationen wurde bereits eindrücklich gezeigt (Melacini et al., 1995; Clarke et al., 2001; Hardin et al., 2003).

Patienten mit Myotoner Dystrophie Typ 1 zeigen im Allgemeinen ein vermehrtes Auftreten an endokrinen Störungen (Ørngreen et al., 2012). Typisch sind ein Hypogonadismus durch einen relativen oder absoluten Androgenmangel sowie Diabetes mellitus durch eine Insulinresistenz (Savkur et al., 2001). Des Weiteren sind insbesondere folgende Hormonstörungen zu nennen, welche Ørngreen et al. in einer großen Studie mit 97 DM1-Patienten identifizieren konnten: Neben den bisher beschriebenen endokrinen Dysfunktionen fanden sich erhöhte PTH- und Calciumspiegel sowie Schilddrüsenfunktionsstörungen. Sie zeigten außerdem, dass eine Korrelation zwischen der CTG-Repeat-Länge und den Hormonspiegeln von PTH, Phosphat und Testosteron in der untersuchten Kohorte existiert (Ørngreen et al., 2012).

An weiteren extramuskulären Symptomen ist die ZNS-Beteiligung zu nennen, welche sich bei DM1-Patienten vor allem in Persönlichkeitsstörungen, Konzentrationsstörungen, einer nachweisbaren Hirnatrophie und kognitiven Einschränkungen äußert. Jean et al. zeigten unterdurchschnittliche IQ-Werte bei DM1-Patienten sowohl bei der klassischen als auch bei der milden Form (Jean et al., 2014). Bei DM-Patienten ist eine progressive Hirnatrophie häufig, wobei gezeigt werden konnte, dass diese sehr heterogen verläuft und unabhängig von Alter oder CTG-Repeat-Anzahl ist (Conforti et al., 2016). Frühere Studien hingegen zeigten, dass die kognitiven Fähigkeiten wiederum mit der Anzahl an CTG-Repeats korreliert (Winblad et al., 2006; Jean et al., 2014). Eine Studie von Labayru et al. zeigt auf, dass die visuellen Fähigkeiten der Patienten im Krankheitsverlauf beeinträchtigt sein können (Labayru et al., 2019). Fatigue und Tagesmüdigkeit schränken darüber hinaus die Leistungsfähigkeit vieler Patienten ein (Angelini and Tasca, 2012; Okkersen et al., 2017a, 2017b).

Psychosoziale Faktoren spielen ebenfalls eine Rolle in der klinischen Ausprägung und können sich in Ängstlichkeit sowie Depression äußern und wurden in einer Studie bei 50% der DM1-Patienten erkannt (Antonini et al., 2006).

Zudem wurden tiefgreifende Persönlichkeitsstörungen wie ängstlich-vermeidende, passiv-aggressive, schizotypische sowie zwanghafte Persönlichkeitsstörungen mit der DM1 assoziiert (Delaporte, 1998; Winblad et al., 2005).

Des Weiteren kommen Hypersomnien, Apathie und das Schlafapnoe-Syndrom bei DM-Patienten häufig vor, welche die Lebensqualität sehr einschränken können und von Patienten oft beklagt werden (Rubinsztein et al., 1998; Laberge et al., 2009).

Lungenfunktionsstörungen sind möglich und können sich bis zur Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung verschlechtern (Bird, 1993).

1.6 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Eine kausale Therapieform der Myotonen Dystrophie existiert aktuell nicht (Thornton et al., 2017), allerdings gibt es einige experimentelle, vielversprechende Strategien, wie zum Beispiel *genome editing* mittels CRISPR-CAS9 (Provenzano et al., 2017), *RNA editing* (Batra et al., 2017), *small molecules*-Therapien (Nguyen et al., 2015; Luu et al., 2016; Rzuczek et al., 2017) sowie *antisense-oligonucleotide-based-therapies* (Wheeler et al., 2009), welche in die molekularen Mechanismen auf DNA-, RNA- und nachgeordneter Ebene eingreifen. Diese Möglichkeiten sind bisher jedoch noch in der Entwicklungsphase und bedürfen weiteren Modifikationen, bevor sie möglicherweise für DM-Patienten einen therapeutischen Nutzen haben werden (LoRusso et al., 2018). Besonders hervorzuheben sind Forschungsergebnisse, die auf dem letztjährigen American Academy of Neurology Annual Meeting (AANAM 2021) vorgestellt wurden (Mullard, 2021): Dabei gelang es einem Forscherteam um Dr. Barbora Malecova von Avidity Bioscience einen monoklonalen Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor mit einer *DMPK*-spezifischen siRNA zu koppeln und somit die Akkumulation von toxischen CTG-Produkten in präklinischen Modellen zu reduzieren. Inzwischen befindet sich der Wirkstoff in der Phase I Studie (NCT05027269).

Supportive Maßnahmen können jedoch auch heute schon die jeweiligen Symptome der Patienten mit DM1 und DM2 mildern, den Verlauf verzögern sowie den Alltag erleichtern (Smith and Gutmann, 2016). Symptomatisch vordergründig bei DM1-Patienten ist die Beteiligung der distalen Extremitätenmuskulatur (Thornton, 2014), welche je nach Patient unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann und sich von einer sehr milden Klinik bis hin zur Gehunfähigkeit präsentieren kann. Der Natrium-Kanal-Blocker Mexiletin wird seit Langem eingesetzt, um die Myotonie bei DM-Patienten beider Typen zu reduzieren (Logigian et al., 2010). Nachteilig ist jedoch das proarrhythmische Potenzial, weshalb die Indikation bei Patienten mit kardialen Symptomen streng gestellt werden sollte (LoRusso et al., 2018). Bei der kongenitalen Form wird zudem zur Linderung der Symptomatik moderates Muskeltraining empfohlen, auch wenn hierfür die Evidenzlage kontrovers ist (Voet et al., 2013). Darüber hinaus können Orthesen Erleichterung bringen und einem erschwerten Gangbild entgegenwirken. Diese werden von vielen Patienten gerne angenommen (Mnatsakanian et al., 2017).

Für viele Patienten stellt das häufig mit der DM1 einhergehende Fatigue-Syndrom eine große Belastung dar. Eine Studie konnte zeigen, dass dieses durch intensive kognitive Verhaltenstherapien sowie körperliche Bewegungsübungen positiv beeinflusst werden kann (Okkersen et al., 2018).

In Spätphasen der Erkrankung kommen zur Unterstützung der Atemmuskulatur zudem nichtinvasive Beatmungsformen, wie zum Beispiel die BIPAP-Beatmung, zum Einsatz (Romigi et al., 2013). Das Stimulans Modafinil ist in Deutschland zur Behandlung der Tagesmüdigkeit bei DM-Erkrankten nicht mehr zugelassen, kann jedoch in Einzelfällen als *off-label-use* unterstützend verwendet werden (Schneider-Gold et al., 2018).

Neben den Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung kardialer Beteiligungen, welche regelmäßige 12-Kanal-EKG-Ableitungen und bildgebende Herzuntersuchungen (zum Beispiel Kardio-MRT) in 2- bis 5-jährigen Abständen beinhalten, werden auch Pacemaker und Defibrillatoren bei bestimmten Störungen der Herzweiterleitung eingesetzt, um die Rate an plötzlichen Herztoden von DM-Patienten zu senken (Groh et al., 2008).

Da auch das endokrine System betroffen sein kann, haben DM1-Patienten häufig eine Insulinresistenz und Dyslipidämien, sodass dementsprechend Lifestyle-Änderungen sowie Antidiabetika und cholesterinsenkende Medikamente zur Senkung des kardiovaskulären Risikos indiziert sind (Smith and Gutmann, 2016).

Die Beteiligung der glatten Muskulatur kann zu Aspirationen und gastrointestinalen Motilitätsstörungen führen, sodass Prokinetika und Laxantien notwendig werden können (Turner and Hilton-Jones, 2014).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Therapiemaßnahmen für DM1-Patienten eines multimodalen Konzeptes bedürfen, in das Spezialisten verschiedener Fachrichtungen involviert sein müssen, um den Patienten den Alltag bestmöglich zu erleichtern (Ashizawa et al., 2018; Schoser et al., 2019).

2. Fragestellung

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung einer nicht-radioaktiven Methode zur Bestimmung der tatsächlichen Repeatlänge der *DMPK*-Loci in Muskelgewebe von Patienten, die an Myotoner Dystrophie Typ I leiden. Hierzu sollten eine *small-pool*-PCR sowie ein Southern-Blot miteinander kombiniert werden, um selbst an kleinsten Mengen DNA genetische Mosaiksituation identifizieren und die tatsächlichen Repeatlängen im Muskelgewebe bestimmen zu können.

Für die Diagnose "Myotone Dystrophie" wird der Gendefekt klassischerweise molekulargenetisch anhand von Blutproben nachgewiesen. Die sehr langen Repeats dieser Erkrankung können mit herkömmlichen Detektionsmethoden allerdings nicht exakt erfasst werden und stellen diagnostisch eine Herausforderung dar. Sanger-Sequenzierungen, welche routinemäßig bei monogenetischen Erbkrankheiten zur Detektion von Mutationen eingesetzt werden, sequenzieren repetitive DNA-Abschnitte oft nur fehlerhaft oder brechen gar vollständig ab (Liu et al., 2017). Auch sogenannte Next-Generation-Sequenziermethoden stellen den Untersucher bei repetitiven DNA-Abschnitten aufgrund der kurzen Readlänge oft vor große Probleme bei der Auswertung der Daten (Treangen and Salzberg, 2012). Zusätzlich erschweren genetische Mosaiksituationen die Analyse selbst mit PCR-basierten Nachweismethoden, da es zur Amplifikation und Detektion unzähliger, teils überlappender Banden bei herkömmlicher elektrophoretischer Auftrennung kommen kann, sodass häufig nur ein Größenbereich für die Diagnose angegeben werden kann (z.B. 300-500 Repeats). Der diagnostische Nachweis durch eine *small-pool*-PCR und anschließenden Southern Blot vor diesem Hintergrund ist zwar aufwändiger, jedoch sicherer (Savić Pavićević et al., 2013).

Die routinemäßige Gewinnung der DNA aus Leukozyten der Patienten hat zudem zur Folge, dass keine Aussagen über die tatsächliche Repeatlänge in den unterschiedlichen Geweben, insbesondere in den unterschiedlichen Muskelgruppen, getroffen werden können. Zwei unabhängige Untersuchungen zeigten zum Beispiel, dass die CTG-Repeats im *DMPK*-Gen im Muskelgewebe von DM1-Patienten aufgrund der somatischen Mosaiksituation teils 3- bis 25-fach länger sind als die im Blut der Patienten gemessenen (Thornton et al., 1994; Nakamori et al., 2013). Sowohl für die individuelle Prognosestellung der Patienten wie auch für die wissenschaftliche Forschung ist jedoch eine genaue Charakterisierung der Repeatlänge in Myoblasten essentiell, da die muskulären Symptome häufig den Alltag der Patienten am stärksten einschränken. Zu diesem Zweck sollten Satellitenzellkulturen aus Muskelbiopsien verwendet werden, die

eine genaue Charakterisierung und wiederholte DNA-Extraktion erlauben, bevor DNA direkt aus der Muskelbiopsie ohne zwischenzeitliche Subkultivierung extrahiert werden sollte.

Methodisch wurde für die Vervielfältigung der CTG-Repeats die *small-pool*-PCR gewählt. Diese Form der PCR umgeht das Problem heterogener Templates bei somatischen Mosaiksituationen durch Verdünnung der Ausgangs-DNA auf nur wenige Genomäquivalente (0,5-200), im Idealfall auf die DNA einer einzelnen Zelle (Gomes-Pereira et al., 2004). Durch dieses Vorgehen möchte man selektiv einzelne Mutationsallele sowie das Wildtyp-Allel amplifizieren, sodass im nachfolgenden Southern Blot einzelne, distinkte Banden und keine Überlagerung der Banden („Schmier“) detektiert werden können.

Klassischerweise werden die PCR-Produkte oder genomischen CTG-Repeats im Anschluss an den Southern Blot mithilfe von radioaktiv-markierten Isotopen auf einem Detektor sichtbar gemacht (Feinberg and Vogelstein, 1983). Diese Methode zeigt eine große Sensitivität und wird auch heute noch in vielen Laboren weltweit genutzt. Allerdings versucht man seit vielen Jahren, die Verwendung von Radioaktivität in der Forschung sowohl aufgrund der hohen bürokratischen Hürden, wie auch dem mit ihr verbundenen Gesundheitsrisiko zu verzichten (Pollard-Knight et al., 1990; Viterbo et al., 2018).

Deshalb sollte in dieser experimentellen Arbeit eine nicht-radioaktive Detektionsmethode etabliert werden, welche mit vergleichbarer Sensitivität zur herkömmlichen, radioaktiven Methode die pathognomonischen CTG-Repeats nachweisen kann. Hierfür wurde die Digoxigenin-Markierung gewählt, die bereits 2014 von der Arbeitsgruppe Tomé et al. an transgenetisch veränderten DM1-Mausmodellen erfolgreich angewendet wurde und auch hier zur Detektion der in der *small-pool*-PCR gewonnenen Produkte dienen sollte (Tomé et al., 2014).

Ziel dieser Promotionsarbeit war somit die Entwicklung einer möglichst genauen, nicht-radioaktiven Methode zur Analyse der Repeatlänge der CTG-Repeats in Myoblasten, um eine genauere Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp zu ermöglichen und Mosaiksituationen zu identifizieren.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Zur Untersuchung oben genannter Fragestellung wurden Myoblastenkulturen von 5 Patienten aus der MTCC (Munich tissue culture collection) verwendet. Die MTCC des Friedrich-Baur-Instituts der LMU München stellte gemäß des Ethikvotums-Nr. 45-14 die Kulturen zu Forschungszwecken zur Verfügung. Die etablierten Myoblasten-Zelllinien wurden bei 37°C und in 5% CO₂-Athmosphäre adhärent in Zellkultur-Schalen kultiviert. Die Kultivierung der Myoblasten erfolgte in Skeletal Muscle Cell Growth Medium (PELO Biotech). Erreichten die Zellkulturen eine Konfluenz von etwa 70%, wurden die Zellen nach einem Waschschrift mittels Trypsin abgelöst. Anschließend wurden sie auf zwei Zellkulturplatten gesplittet und in regelmäßigen Abständen mittels Trypsin-Verdau gelöst, gesplittet und in neue Schalen überführt. Um den Bestand der Zelllinien zu erhalten, wurden diese in der Phase des exponentiellen Wachstums in einem speziellen Gefriermedium (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert, auf mehrere Kryotubes verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2 DNA-Isolierungsmethoden

3.2.1 Myoblasten

Die Isolation der DNA aus den Myoblasten erfolgte mithilfe des Quick - DNA™ Miniprep Plus Kit der Firma ZymoResearch.

Hierfür wurde ein Myoblastenzellpellet (gewonnen aus einer 10 CM Zellkulturplatte) in 200 µl Aqua dest. gelöst, in ein Eppendorfreagiergefäß überführt und 200 µl BioFluid & Cell Buffer sowie 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Nach ausreichendem Durchmischen der Inhalte wurde das Reagiergefäß für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nun wurden 440 µl Genomic Binding Buffer hinzugefügt und ebenfalls durchmischt. Die Lösung wurde anschließend in eine Zymo-Spin™ IIC-XL Säule gegeben, welche in ein Collection Tube gesteckt wurde, und für eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert. Das Collection Tube wurde nun verworfen und die Säule in ein neues Tube gesteckt. 400 µl DNA Pre-Wash Buffer wurden hinzugefügt, die Säule bei 12000 x g für eine Minute zentrifugiert und dieser Schritt mit 700 µl g-DNA Wash Buffer sowie mit 200 µl g-DNA Wash Buffer wiederholt. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule in ein neues Eppendorfreagiergefäß überführt und mit 50 µl Aqua dest. benetzt. Nach 5-minütigem Inkubieren bei Raumtemperatur wurde dieses Reagiergefäß für eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert und die Säule entfernt.

3.2.2 Leukozyten

Für den Vergleich von Repeatlängen und deren Verhaltensweisen in den unterschiedlichen Geweben Blut und Muskel wurde ebenfalls DNA aus Patientenblut nach dem Prinzip der Hochsalzfällung isoliert:

Für die Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit dem Vortexer durchmischt und anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nun wurde die dreifache Menge eines 1.33-fach konzentrierten Erythrozyten-Lysepuffers dazugegeben und durch Schwenken mit dem Blut gemischt. Das Blut wurde danach für mindestens 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 2000 U/min bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und verworfen. Anschließend wurden erneut 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer auf das Pellet gegeben, resuspendiert und das Röhrchen für 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgekippt und etwaige Reste mit einem Tuch entfernt. Hiernach wurde das Pellet mit 5 ml SE-Puffer resuspendiert und 250 µl 20%iges SDS (verdünnt in Aqua dest.) dazugegeben und gemischt. Anschließend wurde das Lysat bei 55°C im Wasserbad für drei Stunden inkubiert.

Für die Fällung der DNA wurden nach der Inkubation 2,5 ml SE-Puffer und 2,1 ml gesättigte 6 molare NaCl-Lösung zugegeben und die Lösung für 10 Sekunden gevortext. Im Anschluss daran wurde das Lysat für weitere 10 Minuten bei 55°C inkubiert, um ausgefallene Salze zu lösen und 15 Minuten bei 4000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und die zweifache Volumenmenge 100%igen Ethanol zugefügt und anschließend gemischt, bis eine DNA-Wolke zu sehen war. Diese wurde mit einem Häkchen entnommen und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zur Messung der erhaltenen DNA Menge wurde die isolierte Probe mittels des Fluoreszenz-basierten Nachweisverfahren „Qubit“ analysiert.

Daran anschließend wurde ein kombinierter Restriktionsverdau der DNA und ein *RNase*-Verdau durchgeführt, um einerseits die Tertiärstruktur der DNA zu zerstören und andererseits überschüssige RNA in der DNA-Probe zu eliminieren, welche die weitere Analytik der DNA möglicherweise stören könnte. Dies wurde mittels folgendem Reaktionsansatz erreicht:

DNA	500 ng Gesamtmenge
Puffer Cut Smart 10x	5 µl
HindIII	1 µl

RNase	2 μ l
ddH ₂ O	Ad 50 μ l

Der oben genannte Ansatz wurde für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.3 Gelelektrophorese

Durch die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA über das elektrische Feld werden unterschiedliche DNA-Stränge der Länge nach aufgetrennt.

Dazu wurde Agarose in 1%iger Konzentration zusammen mit 200 ml TAE-Puffer unter mehrmaligem Schwenken im Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle für insgesamt etwa 7 Minuten bis zum Siedepunkt erhitzt, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde die heiße Agaroselösung im Hybridisierungssofen bei 65°C für 30-60 Minuten abgekühlt, um sie anschließend in eine Gelelektrophoresekammer mit einhängendem Kamm gießen zu können und aushärten zu lassen. Anschließend wurde die Gelkammer mit einer ausreichenden Menge TAE-Puffer aufgefüllt und die in Loading Buffer verdünnten DNA-Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 10 Minuten bei 100 Volt gestartet, anschließend auf 140 Volt eingestellt und für ca. 60 Minuten durchgeführt.

3.4 PCR zur Klonierung von CTG-Repeats

Zur Amplifikation von CTG-Repeats aus Myoblasten-DNA wurde in Anlehnung an das Paper von Monckton et al. (Monckton et al., 1995) folgendes Protokoll etabliert:

	Patient A	Patient B
Primer DM-DR 100 μ M	2 μ l	2 μ l
Primer DM-C 100 μ M	2 μ l	2 μ l
GC-Puffer	10 μ l	10 μ l
GC-Enhancer		10 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l	1 μ l
Myoblasten-DNA	50 ng	50 ng
Phusion	0,5 μ l	
Q5		0,5 μ l
ddH ₂ O	30,5 μ l	20,5 μ l

Die PCR-Ansätze wurden in 35 Zyklen im Thermocycler nach folgendem Protokoll amplifiziert:

Initial Denaturation	98°C	60 s
Denaturation	98°C	10 s
Annealing	60°C	30 s

Elongation	72°C	60 s
Final Elongation	72°C	600 s
	4°C	∞

3.5 Restriktionsverdau

Enzymatische Restriktionsverdau wurden nach Herstellerangaben in 50 μ l Volumen durchgeführt. Je nach verwendetem Enzym wurde entweder CutSmart (NEB) oder Y-Tango Puffer (ThermoFisher) verwendet:

Puffer (CutSmart oder Y-Tango)	5 μ l
DNA	1 μ g
Enzym 1	1 μ l
ggf. Enzym 2	1 μ l
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Der Verdau wurde routinemäßig 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Lediglich Smal wurde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden diese Restriktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und gegebenenfalls die einzelnen Banden herausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Eine vollständige Liste der verwendeten Enzyme findet sich unter 3.18.

3.6 Gelextraktion

Zur Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel wurde das „innuPREP DOUBLEpure Kit“ von Analytik Jena DNA verwendet:

Das Agarose-Stück (Gewicht bis zu 300 mg) wurde in ein Eppendorfreagiergefäß gegeben und zusammen mit 650 μ l Gel Solubilizer bei 50°C für 10 Minuten inkubiert. 50 μ l Binding Optimizer wurden hinzugegeben und durch Pipettieren oder Vortexen mit der gelösten Agarose durchmischt. Ein Spin Filter wurde in ein Receiver Tube gesteckt und die Lösung aus dem Eppendorfreagiergefäß vorsichtig in den Spin Filter überführt. Anschließend wurde der Tube bei 11000 U/min. für eine Minute zentrifugiert. Zum Waschen der Lösung wurden 700 μ l Washing Solution LS hinzu pipettiert und das Gefäß für 1 Minute bei 11000 U/min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um das Ethanol zu entfernen wurde das Filtrat entfernt und der Spin Filter in ein neues Receiver Tube gesteckt. Dieses wurde dann für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde der Spin Filter in ein Elution Tube gesteckt und mit 30 μ l Elution Buffer benetzt. Nach einer ein-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Tube für 1 Minute bei 11000 U/min. zentrifugiert und die isolierte DNA weiterverwendet.

3.7 Plasmidfällung

Zur Fällung von (restriktionsverdauten) Plasmiden wurde ein 10-faches Volumen an Ethanol hinzugefügt und der Inhalt durchmischt. Anschließend wurde der Inhalt bei -80°C für 10-15 Minuten eingefroren und dann für 10 Minuten bei 4°C bei maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge zentrifugiert. Es erfolgte danach eine 10-minütige Trocknung bei 45°C in einem Speed-Vac Vakuum Konzentrator und das Pellet wurde in 20 μ l ddH₂O aufgenommen.

3.8 Blunt-end Ligation

Blunt-end Ligationen von Plasmid und Insert wurden wie folgt durchgeführt:

	Menge/Volumen
Plasmid pUC19	50 ng
T4-Ligase Puffer	2 μ l
T4-Ligase (NEB)	1 μ l
Insert	20 ng
ddH ₂ O	Ad 20 μ l

Die Ansätze wurden bei 4-5°C über Nacht inkubiert.

3.9 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 50 μ l kompetente Zellen (DH5-alpha-E.coli) auf Eis aufgetaut. Jeweils 10 μ l des Ligationsansatzes wurden zu der Zellsuspension hinzugegeben und 20 Minuten auf dem Eis stehen gelassen. Danach erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien für eine Minute bei 42°C im Thermoblock und eine fünfminütige Ruhephase auf Eis. Jeweils 1 ml LB-Medium wurde hinzugegeben und die Eppendorfreagiergefäße für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese wurden dann bei 13000 U/min. für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand jeweils dekantiert. Die Pellets wurden in je 100 μ l LB-Medium resuspendiert und die Zellsuspensionen auf Selektivmedien (LB-Medium mit Ampicillin) ausplattiert sowie anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden mehrere Kultur-Röhrchen mit jeweils 5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium vorbereitet und in jedes Röhrchen mit einem sterilen Holz-Zahnstocher eine Kolonie gegeben. Pro Platte wurden 5 Kolonien gepickt. Diese wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Orbitalschüttler inkubiert.

3.10 Plasmidisolaton

Im Anschluss an die Transformation erfolgte die Plasmidisolaton. Aus den Röhrchen wurden je 1,5 ml Medium in ein Eppendorfreagiergef  b überführt und für 30 Sekunden bei 13000 U/min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ l P1 Resuspensionspuffer (siehe Material) resuspendiert. 200 μ l P2 Denaturierungspuffer wurden dazu gegeben und 10 Mal geschwenkt. Ebenso wurden 150 μ l P3 Neutralisierungspuffer zugefügt und 10 Mal geschwenkt. Das Eppendorfreagiergef  b wurde dann für 10 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfreagiergef  b dekantiert. 400 μ l Isopropanol, welches bei -20 C vorgekühlt worden war, wurde hinzugegeben und wiederum 10 Mal geschwenkt. Es erfolgte eine 10-minütliche Zentrifugation bei 13000 U/min. Der Überstand wurde abgegossen und verworfen. 500 μ l 70%-iges Ethanol, welches ebenfalls bei -20 C vorgekühlt worden war, wurde hinzugefügt und das Gef  b 10 Mal geschwenkt. Anschließend wurde erneut bei 13000 U/min. für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und verworfen. Um das Ethanol vollständig zu entfernen, wurde das Pellet für 10 Minuten in dem SpeedVac Vakuum Konzentrator bei 50 C getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 30 μ l sterilem ddH₂O aufgenommen.

Um zu überprüfen, ob die Ligation erfolgreich war, wurde eine Restriktionanalyse aller Proben mittels EcoRI und HindIII durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden anhand des Ergebnisses Proben ausgewählt, die eine positive Ligation aufwiesen und gemäß folgendem Protokoll re-tranformiert:

50 μ l DH5-alpha-E. coli-Zellen wurden mit 5 μ l Plasmid für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für zwei Minuten bei 42 C auf dem Heizblock. Wiederum wurden die Eppendorfreagiergef  be für fünf Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann in 500 μ l LB-Medium aufgenommen und bei 37 C im Schüttler für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine 20-minütliche Zentrifugation bei 4000 U/min. Der Überstand wurde abgegossen, in 50 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einem Ampicillin-Selektivmedium ausplattiert und anschließend bei 37 C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde jeweils eine Kolonie mit einem sterilen Holz-Zahnstocher entnommen, in ein Falcon-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium gegeben und über Nacht im Schüttler bei 37 C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde diese Suspension für 20 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert.

Mithilfe des inuPREP Plasmid Mini Kits von Analytik Jena wurden die Plasmide wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurde erneut eine Restriktionskontrolle mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI nach oben genanntem Protokoll durchgeführt.

Die klonierten Plasmide wurden zur Sequenzierung verschickt. Das Ergebnis zeigte, dass zwei der vier Plasmide Repeats mit einer Länge von 13 bzw. 20 Repeats aufwiesen. Das Plasmid mit 20 CTG-Repeats wurde pRM1, das Plasmid mit 13 Repeats pRM2 genannt.

3.11 Plasmidkarten

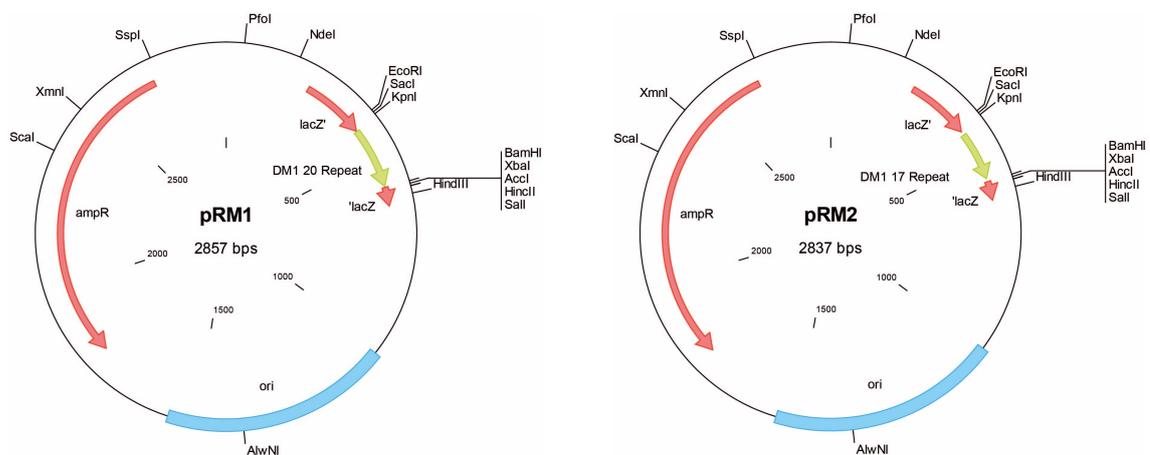


Abbildung 2: Plasmidkarten des pRM1 (2857 bp) und pRM2 (2837 bp) mit Schnittstellen.

3.12 DIG-Markierung der Sonde

Für die Hybridisierung des Southern Blots wurde die Sonde mithilfe des „DIG probe synthesis Kit“ von Roche wie folgt amplifiziert:

Puffer V3	5 μ l
DIG-Probe-Synthesis-Mix V2	5 μ l
pRM1 1:100 in ddH ₂ O verdünnt	4 μ l
Primer DM-C	0,5 μ l
Primer DM-DR	0,5 μ l
ddH ₂ O	35 μ l
Enzym-Mix V1	0,75 μ l

Die PCR wurde im Thermocycler mit 35 Zyklen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initial Denaturation	98°C	60 s
Denaturation	98°C	10 s
Annealing	60°C	30 s
Elongation	72°C	60 s
Final Elongation	72°C	600 s
	4°C	∞

3.13 Tüpfeltest der Sonde

Um die Markierung der Sonde mit Digoxin zu überprüfen, wurde ein sogenannter Tüpfeltest durchgeführt. Es wurden Verdünnungen der Sonde mit ddH₂O in den Konzentrationen 1:50, 1:500 und 1:5000 hergestellt. Anschließend wurde jeweils 1 µl der Verdünnungen auf eine Nylonmembran pipettiert, diese für fünf Minuten mittels UV-Licht gecrosslinkt und anschließend nach dem Detection-Protokoll (s. unten) weiter verfahren. Sofern die Punkte der unterschiedlichen Verdünnungen nach der Detektion mit dem LiCor ausreichend zu sehen waren, war die DIG-Markierung erfolgreich.

3.14 *Small-pool-PCR*

Mit folgendem Protokoll wurde zu Beginn der Methodenentwicklung die *small-pool-PCR* durchgeführt (Zyklenzahl 28):

Initial Denaturation	95°C	260 s
Denaturation	95°C	45 s
Annealing	68°C	45s
Extension	72°C	180 s + 15s Zeitinkrement (ZI)
Final Extension	72°C	600 s

Anschließend folgten unten genannte Optimierungen des PCR-Protokolls:

PCR-Protokoll	1	2	3	4	5	6
Initial Denaturation	98°C, 150 s	98°C, 150 s	95°C, 240 s	95°C, 240 s	96°C, 240 s	96°C, 240 s
Denaturation	98°C, 30 s	98°C, 15 s	95°C, 45 s	95°C, 45 s	96°C, 45 s	96°C, 45 s
Annealing	68°C, 30 s	66°C, 15 s	68°C, 45 s	68°C, 45 s	64°C, 45 s	Gradient 64-68°C, 45 s
Extension	72°C, 180 s + 15 s ZI	72°C, 240 s + 15 s ZI	72°C, 180 s			
Final Extension	70°C, 600 s	72°C, 600 s				
Zyklen	33	33	30	28	28	28

Die Extension-Temperatur bezieht sich auf die Verwendung der AmpliTaq bzw. Phusion DNA-Polymerase (Invitrogen). Sofern die HotStart Taq DNA-Polymerase (ThermoFisher) verwendet wurde, wurde eine reduzierte Extension-Temperatur von 68°C verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden mit folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt:

Mastermix 1: AmpliTaq bzw. Phusion	50 µl
10x Puffer I bzw. HF	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
DM-A 100 µM	2 µl
DM-BR 100 µM	2 µl
DNA	100-600 pg
AmpliTaq bzw. Phusion	0,25 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl
Mastermix 2: HotStart Taq	50 µl
Hot Start Green Mix	26 µl
DM-A 100 µM	2 µl
DM-BR 100 µM	2 µl
DNA	100-600 pg
ddH ₂ O	ad 50 µl

3.15 Southern Blot

In der Vorbereitung des Southern Blots wurde in die Mitte einer dünnen Gummimatte ein Fenster in der Größe des zu gewünschten Blot-Ausschnitts geschnitten. Die Nylonmembran des Vakuum-Blots sowie die Gummimatte wurden in ddH₂O eingeweicht.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Agarosegel vorsichtig in eine ausreichend große Plastikwanne platziert und mit ddH₂O abgespült. Es wurde dann so viel Depurinierungspuffer hinzugegeben, dass das Gel mit Flüssigkeit bedeckt war. Die DNA im Gel wurde für 15 Minuten depuriniert. Zwischen den Schritten wurde das Agarosegel großzügig mit ddH₂O abgespült. Nach der Depurinierung erfolgte die Denaturierung für 30 Minuten mit ebenso viel Denaturierungspuffer wie im Schritt zuvor. Danach wurde das Gel für zweimal 15 Minuten mit Neutralisierungspuffer und zuletzt für 10 Minuten mit SSC benetzt. Nach dem Neutralisierungsschritt wurde die Nylonmembran vorbereitet, indem diese ausgeschnitten (ca. 11x13 cm) und zusammen mit dem Whatman-Paper (ca. 3x3 cm größer als die Nylonmembran) für 20 Minuten in SSC äquilibriert wurde.

Der Blot konnte dann aufgebaut werden: Auf das Grundgerüst wurde in die vorgesehene Einkerbung die weiße Membran gelegt. Das Whatman-Paper wurde behutsam mit zwei Pinzetten mittig platziert, ebenso die Nylonmembran, welche auf dem Whatman-Paper zum Liegen kam. Anschließend wurde die nasse Gummimatte auf das Whatman-Paper sowie die Nylonmembran gelegt. Damit keine Blasen entstehen, wurden zunächst ca. 20 ml SSC auf die Nylonmembran pipettiert, bevor das Agarosegel auf diese gelegt wurde. Nach Auflegen des Gels wurde dieses ebenfalls mit SSC benetzt und bei ca. 90 mbar für zwei Stunden geblottet. Weil auf dem Gel stets Flüssigkeit vorhanden sein sollte, wurden alle 15-30 Minuten ca. 10-20 ml SSC auf das Gel pipettiert.

Eine halbe Stunde vor Ende des Blotting-Vorgangs wurden 10 ml des Hybridisierungspuffers in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und im Hybridisierungssofen zusammen mit einem leeren Hybridisierungsrohr bei 65°C vorgewärmt.

Nach Abschluss des Blotting-Vorgangs wurde die Vakuum-Maschine ausgeschaltet und das Gel vorsichtig entfernt. Die Ecken der Nylonmembran wurden mit einem Bleistift markiert und diese wurde anschließend für zwei Minuten in SSC aquilibriert. Danach wurden die Ränder mit einem Skalpell an der Markierung entlang abgeschnitten und die Membran vorsichtig mit einem Whatman-Paper leicht bedeckt, damit etwas Flüssigkeit aufgesogen wurde. Die Nylonmembran wurde anschließend auf eine LiCor-Platte mithilfe von zwei Pinzetten gelegt und im Hybridisierungssofen bei 65°C für fünf Minuten getrocknet. Danach wurde diese für fünf Minuten unter UV-Licht gelegt, um die DNA auf die Membran zu crosslinken. Mithilfe von zwei Pinzetten wurde die Membran eingerollt und zusammen mit dem vorgewärmten Hybridisierungspuffer in das ebenfalls vorgewärmte Hybridisierungsrohr aus Glas gegeben. Unter langsamem horizontalen Drehen des Rohrs wurde der Puffer auf der Membran gleichmäßig verteilt. Es sollten möglichst keine Luftblasen vorhanden sein. Die Membran wurde in dem Rohr für 15-30 Minuten prähybridisiert.

In der Zwischenzeit wurden 20 μ l der Sonde (9 ng/ μ l) zusammen mit 80 μ l ddH₂O für 10 Minuten bei 100°C im Heizblock denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gegeben. Die Sonde wurde danach ebenfalls in den Hybridisierungspuffer zu der Membran dazu pipettiert und diese über Nacht bei 65°C hybridisiert.

3.16 Detektion

Am Folgetag wurde zunächst zweimal die Waschlösung vorbereitet: Je 2 ml 20x SSC wurden mit 0,4 ml SDS (0,2% Endkonzentration) auf 200 ml mit ddH₂O aufgefüllt. Die Waschlösung wurde für 30 Minuten im 65°C Hybridisierungssofen vorgewärmt. Der Hybridisierungspuffer mitsamt der Sonde wurde mit einer Pipette abgenommen, bevor ca. 30 ml der Waschlösung in das Glasrohr gefüllt und die Membran 20 Minuten unter Rotation im Hybridisierungssofen gewaschen wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur in einer Plastikschaale fünf Minuten im Wasch-Puffer gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die Blocking-Lösung (10x) in 0,1 M Maleinsäure-Puffer 10-fach verdünnt.

Der Wasch-Puffer wurde abgegossen und die DNA auf der Membran für 30 Minuten unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in 50 ml Blocking-Lösung blockiert. 4 µl des Digoxigenin-Antikörperkonjugates (DIG Luminiscent Detection Kit, Roche) wurden in 40 ml Blocking-Lösung gelöst und diese Lösung im nächsten Schritt für 30 Minuten auf die Membran gegeben. Unter leichtem Schwenken wurde diese für 30 Minuten auf dem Schüttler belassen. Die Antikörper-Blocking-Lösung wurde abgegossen und die Membran 2 Mal für 15 Minuten in Wasch-Puffer gewaschen. Nach Abgießen des Wasch-Puffers wurde die Membran für fünf Minuten im Detektionspuffer äquilibriert.

Ein 2 ml Eppendorfreagiergefäß wurde mit Alufolie umwickelt und 2 ml Detektionspuffer sowie 20 µl CSPD (DIG Luminiscent Detection Kit, Roche) in dieses hinein pipettiert. Die Nylonmembran wurde nach dem Äquilibrierungsschritt auf ein Blatt einer glatten Klarsichtfolie gelegt, mit der CSPD-Lösung beträufelt und mit dem gegenüberliegenden Blatt der Klarsichtfolie bedeckt. Die CSPD-Lösung wurde durch vorsichtiges Glattstreichen der Folie auf der Membran verteilt und die umhüllte Membran dann lichtgeschützt bei Raumtemperatur für fünf Minuten stehen gelassen. Danach wurde diese mitsamt der Abdeckung bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf eine LiCor-Platte gelegt, mit einer Rolle glattgestrichen und für 10-60 Minuten im LiCor (Odyssey Fc Imaging System) ausgelesen.

3.17 Berechnung der Repeatanzahl

Zur Berechnung der Repeatanzahl wurde die Länge der PCR-Produkte anhand des selbst hergestellten Markers mit Hilfe der Benutzersoftware des LiCor Imager bestimmt. Aus der Fragmentlänge wurde dann durch folgende Formel die Repeatanzahl bestimmt:

$x = \frac{y-z}{3} + i$. Dabei ist x die Repeatanzahl, y die Fragmentlänge, z die flankierenden

Genabschnitte (311 bp) und i die Anzahl der im Marker enthaltenen Repeats. Als die *estimated progenitor allele length* (ePAL) wurde die kürzeste, nicht wildtypische Allellänge in Anlehnung an Monckton et al. bezeichnet (Monckton et al., 1995).

3.18 Materialien

Puffer für den Southern Blot

Puffer	Inhalt
Depurinierungspuffer	HCl 0,25 M
Denaturierungspuffer	NaCl 1,5 M NaOH 0,5 M
Neutralisierungspuffer	NaCl 1,5 M Tris/HCl 0,5 M EDTA 1 mM pH 7,2
SSC-Puffer (20x)	NaCl 3 M Na-Citrat 0,3 M pH 7,0
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure 1 M NaCl 1,5 M pH 7,5
Blocking-Lösung (10x)	Blocking-Powder (DIG Luminescent Detection Kit, Roche) 10 g Maleinsäure-Puffer (0,1 M) 100 ml
Detektions-Puffer	Tris 6,07 g NaCl 2,9 g ddH ₂ O ad 500 ml pH 9,5
Wasch-Puffer	Maleinsäure-Puffer 100 ml 20% Tween 15 ml ddH ₂ O ad 1000 ml
Hybridisierungspuffer "PerfectHyb™ Plus Hybridization Buffer" Pro Hybridisierung 10 ml	SIGMA-Aldrich

Puffer für die Makroisolierung aus Blut

Puffer	Inhalt		
Lysepuffer	NH ₄ Cl	155mM	8,29 g
	KHCO ₃	10mM	1,00 g
	Na ₂ EDTA	0,1mM	0,029 g
	ddH ₂ O		ad 1000 ml
	pH 7,4		
SE-Puffer	NaCl	75mM	4,39 g
	Na ₂ EDTA	25mM	8,41 g
	ddH ₂ O		ad 1000 ml
	pH 8,0		
TE-Puffer	Tris/HCl	10mM	1,21 g
	EDTA	1mM	0,34 g
	ddH ₂ O		ad 1000 ml
	pH 8,0		
NaCl	6 M		

Puffer für die Plasmidisolierung

Puffer	Inhalt
P1 Resuspensionspuffer	5x-TE-Puffer mit RNase pH 8,0
P2 Denaturierungslösung	0,2 M NaOH 1% SDS
P3 Neutralisierungspuffer	3 M Kaliumacetat pH 4,8

DNA-Isolationskits

Analytik Jena innuPREP DNA Mini Kit
Analytik Jena smart DNA Prep

Qiagen: DNeasy Blood & Tissue Kit
Zymo Research: Quick DNA Plus

Primer-Sequenzen

DM-A 5'-CAGTTCACAACCGCTCCGAGC-3'
DM-BR 5'-CGTGGAGGATGGAACACGGAC-3'
DM-C 5'-AACGGGGCTCGAAGGGTCCT-3'
DM-DR 5'-CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC-3'

E. coli-Stamm

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
DH5α	<i>supE44 hsdR17 (rk-mk+)</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>ΔlacU169 (Φ80</i> <i>ΔlacZ::M15)</i>	Hanahan, 1985

Plasmid pSH1

Grundvektor	Genetischer Marker	Herkunft/Referenz
p426-MET25HA	<i>MET25PRO-HA3-</i> <i>CYC1TER 2μm URA3</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1994

Polymerasen

DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (ThermoFisher)	<i>small-pool-PCR</i>
AmpliTaq DNA Polymerase (Invitrogen)	<i>small-pool-PCR</i>
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher)	Herstellung der Sonde, <i>small-pool-PCR</i>

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, NEB)	Herstellung der Sonde
--	-----------------------

Restriktionsenzyme

SmaI	ThermoFisher
HindIII	New England Biolabs (NEB)
AlwNI	New England Biolabs (NEB)
BsaI	New England Biolabs (NEB)
AatII	New England Biolabs (NEB)
EcoRI	New England Biolabs (NEB)
EcoRV	New England Biolabs (NEB)
ScaI	New England Biolabs (NEB)
PvuII	New England Biolabs (NEB)
KpnI	New England Biolabs (NEB)
XbaI	New England Biolabs (NEB)
BamHI	New England Biolabs (NEB)

4. Ergebnisse

4.1 Patientenrekrutierung

Insgesamt wurden drei Patienten mit Myotoner Dystrophie Typ 1 für die Untersuchungen der Repeatlänge in deren Myoblastenkulturen und im Muskel ausgewählt. Zwei männliche Patienten und eine Patientin im Alter von 33 bis 42 Jahren mit klinisch sowie genetisch diagnostizierter Myotoner Dystrophie Typ 1 wurden dafür rekrutiert (EK-Nr. 45-14). Die Patienten erklärten sich mit der Gewebeentnahme für wissenschaftliche Zwecke schriftlich einverstanden. Im Vorfeld wurde bei allen Patienten die Anzahl der pathognomonischen CTG-Repeats im *DMPK*-Gen mittels standardisierter Diagnostik aus Blutzellen bestimmt (siehe Tabelle 1). Dabei zeigte sich innerhalb der Patientengruppe eine deutliche Heterogenität der Repeatanzahl in den untersuchten patienteneigenen Leukozyten (minimal 50, maximal 600).

Im Folgenden wurde der Myoblastenanteil der jeweiligen Patientenprobe mittels Desmin-Immunfluoreszenz-Färbung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es sich bei zwei von drei Proben um reine Myoblastenkulturen nach Biopsie des angegebenen Muskels handelte. Trotz eines Myoblastenanteils von 0% wurde der Patient DM1-3 in die Untersuchungen miteingeschlossen, um zur Etablierung der Methodik eine möglichst große Bandbreite an Repeatlängen zu erreichen. In diesem einen Fall wurde das Ursprungsgewebe unberücksichtigt gelassen. Mutmaßlich handelte es sich in dieser Probe jedoch um eine Kontamination durch patienteneigene Fibroblasten.

In einem Fall wurden die Biopsien aus dem M. biceps brachii entnommen, daneben jedoch auch aus dem M. vastus lateralis sowie aus dem M. deltoideus. Eine Übersicht der Patienten ist im Folgenden aufgezeigt (Tabelle 1).

Patienten-ID	Repeats im Blut	Myoblastenanteil in %	Muskel der Gewebeentnahme	Geschlecht	Alter bei Biopsie
DM1-2	400-600	100	M. vastus lateralis rechts	w	33
DM1-3	50-70	0	M. biceps brachii links	m	42
DM1-5	240-430	100	M. deltoideus links	m	34

Tabelle 1: Patientenübersicht. Dargestellt sind die Patienten-ID, die im Blut diagnostizierten Repeatlängen, der mittels Desmin-Immunfluoreszenz-Färbung bestimmte Myoblastenanteil, die Muskeln der Gewebeentnahme, das Geschlecht sowie das Alter bei Biopsieentnahme.

4.2 Kultivierung primärer Zellen

Myoblasten lassen sich über Jahre in flüssigem Stickstoff aufbewahren, sodass diese im Anschluss an die zuvor vom Myologischen Labor des Friedrich-Baur-Instituts durchgeführten Biopsieaufbereitung mithilfe der Zellkultur bei Bedarf aufgetaut und im entsprechenden Medium zum Wachstum angeregt werden können. Innerhalb von drei Tagen sind die Zellen im Muskelmedium in der Petrischale bei 37°C in der Regel ausreichend gewachsen, sodass sie gesplittet werden und anschließend für Forschungszwecke zur Verfügung stehen (vergleiche Abbildung 3). Die Myoblasten wachsen zumeist gruppiert und haben ein länglich, spindelförmiges Aussehen. Mithilfe von Trypsin lassen sie sich leicht vom Petrischalenboden lösen und können anschließend der DNA-Extraktion zugeführt oder wieder eingefroren werden.

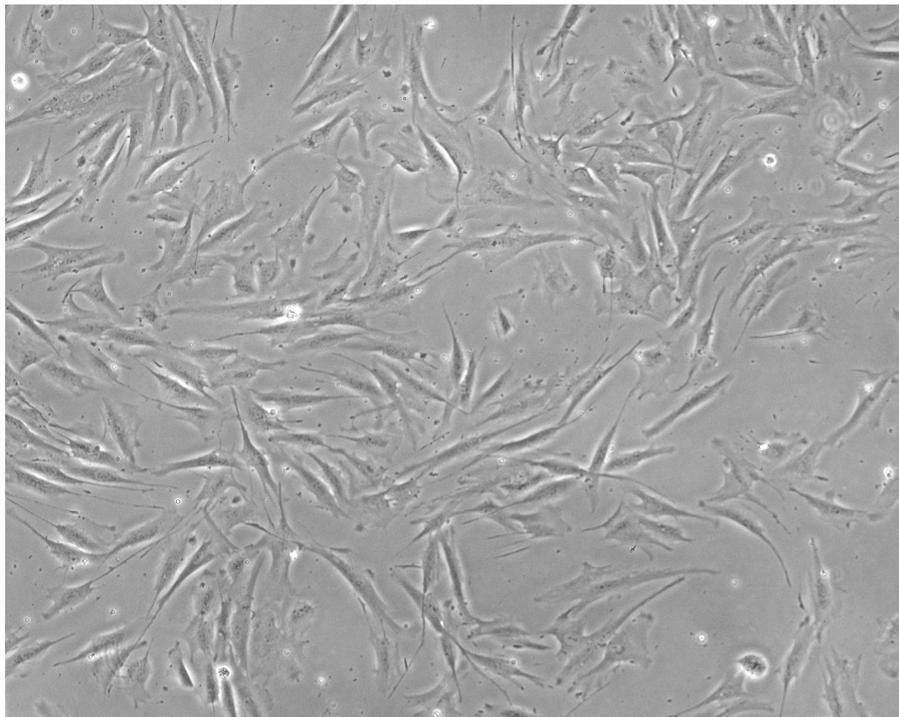


Abbildung 3: Repräsentatives Bild kultivierter, primärer Myoblasten

4.3 DNA-Gewinnung

Für die Extraktion von DNA aus Zellen und Gewebe stehen zahlreiche kommerziell erhältliche Kits zur Verfügung. Nach anfänglichen Vorversuchen wurde das Quick – DNA Miniprep Plus Kit (Zymo) aufgrund der höchsten DNA Ausbeute und der besten Konsistenz der Ergebnisse für die DNA Extraktion aus Myoblastenkulturen ausgewählt.

Die Quantifizierung des Nukleinsäuregehalts erfolgte mittels spektrophotometrischer Messung (Nanodrop). Die Qualität und Reinheit der DNA wurde über eine Gelelektrophorese bestimmt. Dabei zeigte sich, dass trotz optimaler Durchführung des Extraktionsprotokolls eine signifikante Verunreinigung der DNA durch *small molecular weight* RNA bestand, weshalb die Proben einem RNase-Verdau zugeführt wurden. Für die Etablierung der Methode wurden von den fünf unten genannten Patienten-Proben drei Proben verwendet (DM1-2, DM1-3, DM1-5).

Kit	Pat. ID	Konzentration [ng/ μ l]	260/280
Quick	M – DM1-1	63,8	1,93
	M – DM1-2	106,32	2,05
	F – DM1-3	310,49	1,56
	M – DM1-5	329,21	1,84
	M – DM1-6	218,61	1,59

Tabelle 2: DNA-Messungen mittels Nanodrop. Dargestellt sind die entsprechenden Patienten-IDs, die DNA-Konzentration in ng/ μ l sowie die Purity (260/280). F = Fibroblasten, M = Myoblasten.

4.4 Herstellung einer CTG-Repeat-spezifischen Sonde

Um CTG-Repeats in den späteren Patientenproben sicher identifizieren zu können, wurde eine CTG-Repeat spezifische Sonde hergestellt. Zunächst wurde eine PCR mit DNA von Patienten aus der Muskelbank des Friedrich-Baur-Instituts durchgeführt, die nachweislich nicht an einer myotonen Dystrophie erkrankt sind. In diesem Fall wurde DNA von zwei Pompe-Patienten ausgewählt. Es wurde eine PCR mit den Primern DM-C und DM-DR durchgeführt, um in Anlehnung an das Paper von Monckton et al. (Monckton et al., 1995) ein ca. 150 bp langes CTG-Repeat-Fragment zu erhalten.

Die erhaltenen DNA-Amplifikate (150-350 bp lang) wurden anschließend wie beschrieben nach Smal-Verdau blunt-end in pUC19 ligiert und durch Transformation chemisch kompetenter Bakterien zwei Plasmide mit 20 (pRM1) bzw. 13 CTG-Repeats (pRM2) generiert.

Die so hergestellten Plasmide sollten zwei Zwecke erfüllen. Zum einen ist es einfacher Plasmid-DNA zur Herstellung der DIG-markierten Sonde zu verwenden, da keine störende genomische DNA im Ansatz vorhanden ist. Zum anderen konnten mittels

verschiedener Restriktionsspaltungen unterschiedlich lange DNA Fragmente generiert werden, die in den Southern-Blots als spezifischer Größenmarker verwendet werden konnten.

Die Sonde wurde mit Hilfe des „DIG probe synthesis Kit“ (Roche) gleichzeitig amplifiziert und mit Digoxigenin markiert (siehe Material und Methoden). Die erfolgreiche Herstellung und Markierung wurde durch eine Gelelektrophorese sowie einen Tüpfeltest überprüft (vergleiche Abbildung 4). Die so hergestellten Sonden wurden Sonde 20 (pRM1) und Sonde 13 (pRM2) genannt.

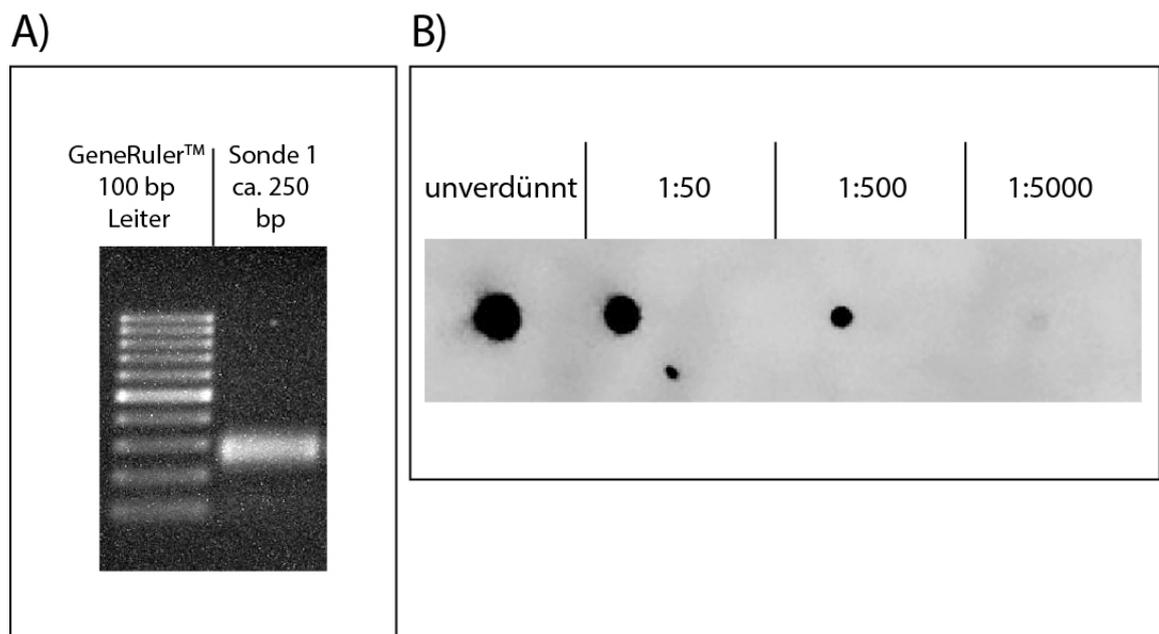


Abbildung 4: A) Gelelektrophorese (Sonde 20; ca. 250 bp). B) Tüpfeltest Sonde 20 unverdünnt, 1:50, 1:500, 1:5000

4.5 Herstellung eines CTG-Repeat-haltigen Markers

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten mithilfe des Southern Blots ist ein Marker bekannter Länge notwendig, der ebenfalls von der verwendeten Sonde gebunden wird und somit auf der Membran visualisiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Marker aus den zuvor hergestellten CTG-Repeat-haltigen Plasmidfragmenten (pRM1 und pRM2; pUC19 Backbone) hergestellt. Aufgrund seiner zahlreichen Restriktionsschnittstellen eignet sich das Plasmid pUC19 ideal für die Herstellung eines Markers mit großer Bandbreite nach Restriktionsverdau.

Es wurden Restriktionsansätze sowohl mit pRM1 als auch mit pRM2 und den Restriktionsenzymen durchgeführt. pRM1 enthält 20 CTG-Repeats, pRM2 lediglich 13 Repeats. Dafür wurden die Enzyme HindIII, AlwNI, BsaI und AatII (später auch ScaI)

verwendet (Durchführung s. Material-Methoden-Teil). Die daraus resultierenden CTG-Repeat-haltigen Fragmentlängen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Restriktionsenzyme	CTG-Repeat-haltige Fragmentlänge in bp
HindIII	pRM1: 2857 pRM2: 2836
HindIII + A1WNI	pRM1: 2082 pRM2: 2061
HindIII + Bsal	pRM1: 1544 pRM2: 1523
HindIII + AatII	pRM1: 683 pRM2: 662

Tabelle 3: CTG-Repeat-haltige Fragmentlängen nach enzymatischem Verdau von pRM1 und pRM2.

Je 2 μ l der Spaltungsansätze wurden dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 140 Volt die Gelelektrophorese durchgeführt. Unter der UV-Lampe ließen sich die erwarteten Banden in einer Range von 662 bis 2857 bp darstellen (vergleiche Abbildung 5), sodass die gleiche Gelelektrophorese wiederholt und das Gel für den Southern Blot genutzt wurde.

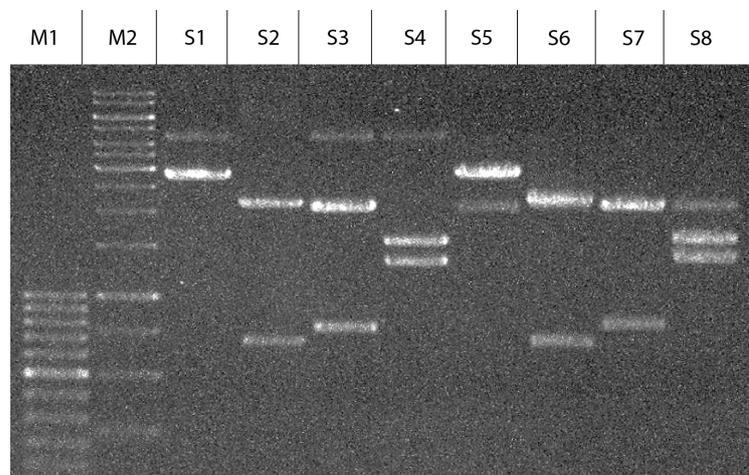


Abbildung 5: Markerfragmente. Plasmidfragmente von pRM1 (S1-4) und pRM2 (S5-S8). Folgende Enzyme wurden für die Spaltungen verwendet: S1 und S5: HindIII; S2 und S6:

AatII + HindIII; S3 und S7: AlwNI + HindIII; S4 und S8: BsaI + HindIII. M1: DNA Marker 1 (100 bp), M2: DNA Marker 2 (1000 bp)

Nach erfolgreichem Southern Blotting konnten die Fragmente unter Zuhilfenahme der zuvor generierten Sonden (Sonde 20 bzw. Sonde 13) auf der Membran sichtbar gemacht werden (vergleiche Abbildung 6).

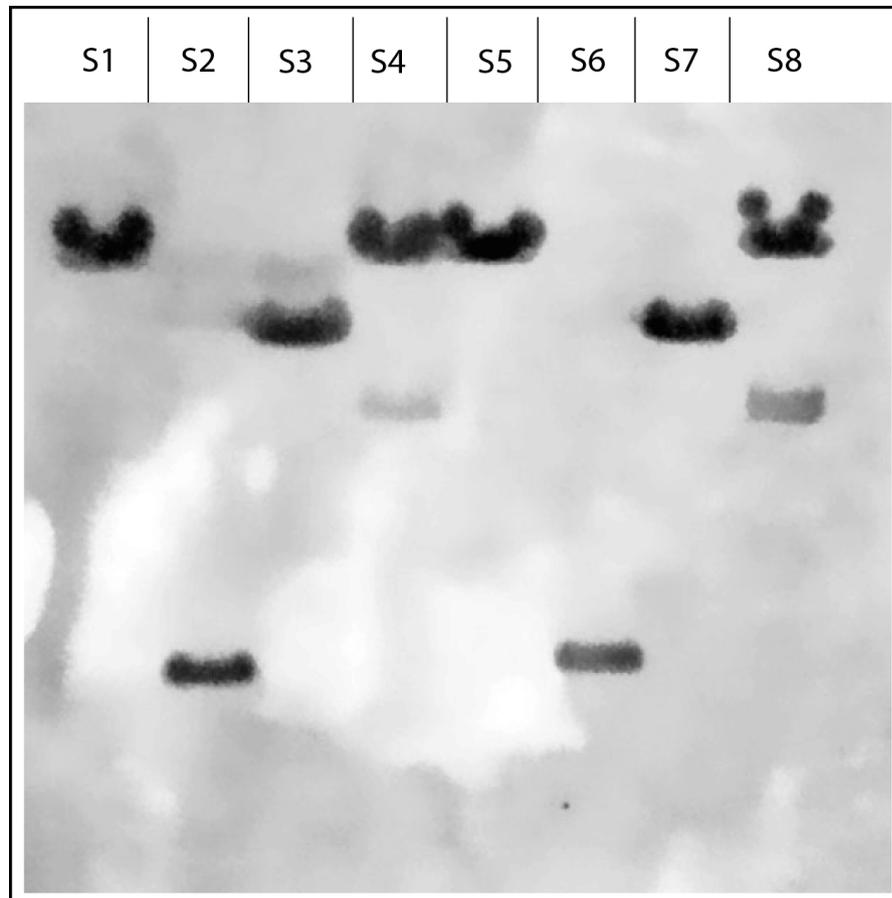


Abbildung 6: Southern Blot der Plasmidfragmente (Lade-Schema siehe Abbildung 5).

Wie der Southern Blot (und auch das Agarosegel) offenbarte, zeigten einige der Proben einen unvollständigen Restriktionsverdau (2 Banden auf dem Blot sichtbar), weshalb diese Spaltungsansätze mit einer größeren Enzymmenge wiederholt, über das Agarosegel erneut aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten und aus dem Gel als jeweiliges Fragment extrahiert wurden.

Zur Erweiterung der Bandbreite wurde zudem ein weiteres CTG-Repeat-haltiges Plasmid größerer Länge (pSH1) wie zuvor beschrieben (siehe Material und Methoden) verdaut und die jeweiligen Fragmentlängen durch elektrophoretische Auftrennung und anschließende Gelextraktion aufgereinigt. Die Fragmente wurden miteinander gemischt, sodass schließlich ein Marker mit folgenden Fragmentlängen generiert wurde: 6613 bp,

4035 bp, 2857 bp, 1929 bp, 1335 bp, 1105 bp, 469 bp, 298 bp und 190 bp. Die verwendeten Enzyme und resultierenden Fragmentlängen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Das jeweils benötigte Volumen der verschiedenen Fragmente wurde gelelektrophoretisch bestimmt und die Fragmente anschließend miteinander vermischt (vergleiche Tabelle 4). Der Marker wurde in einer Verdünnung von 1:25 (ca. 800 ng Gesamtgehalt) in späteren Versuchen verwendet.

Länge (bp)	Plasmid / Restriktionsenzym	Menge
6613	pSH1 / EcoRI	10 μ l
4035	pSH1 / Scal	10 μ l
2857	pRM1 / HindIII	8 μ l
1929	pSH1 / EcoRV	10 μ l
1335	pSH1 / PvuII	10 μ l
1105	pRM1 / HindIII, Scal	8 μ l
469	pSH1 / KpnI	15 μ l
298	pSH1 / XbaI	20 μ l
190	pSH1 / BamHI	25 μ l

Tabelle 4: Längen, verwendete Plasmide und Enzyme sowie finales Volumen der im Marker enthaltenen CTG-Repeat-haltigen Fragmente.

4.6 Optimierung der *small-pool*-PCR

Als Grundlage für die Etablierung der *small-pool*-PCR wurde auf die Publikation über die Entwicklung der *small-pool*-PCR zurückgegriffen (Monckton, Wong et al. 1995), das Protokoll jedoch wurde individuell an die Patienten und die Bedingungen für den Southern Blot neu angepasst.

Insgesamt wurde das Protokoll für die *small-pool*-PCR mehrfach geändert und zeitaufwändig optimiert, indem die unterschiedlichen Einflussgrößen sequentiell verändert und das Ergebnis ausgewertet wurde.

Die veränderten Einflussgrößen sind: Die Polymerase, die DNA-Gesamtmenge, die Puffer und die Einstellungen der Reaktionszyklen im Thermocycler. Von mehreren entwickelten PCR-Protokollen haben schließlich sechs Protokolle zufriedenstellende Ergebnisse erbracht. Jedes Protokoll wurde für das gewünschte Ergebnis individuell angepasst.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Optimierungsschritte der *small-pool*-PCR. Zu Beginn des Optimierungsprozesses (PCR Protokoll 1, siehe Material und Methoden) konnte unter Verwendung der Phusion-Polymerase lediglich das Wildtyp-Allel sowohl bei einem DM1 Patienten (DM1-2) wie auch bei einem

gesunden Kontroll-Patienten (C-3) amplifiziert werden (vergleiche Abbildung 7). Jedoch zeigt sich bereits hier, dass eine Amplifikation von nur 150 pg DNA-Template ausreichend für die Visualisierung im Southern Blot ist. Des Weiteren zeigt sich eine geringe Längen-Differenz zwischen den beiden Proben, was auf eine unterschiedliche CTG-Repeatlänge des Wildtyp-Allels im DMPK-Gen schließen lässt.

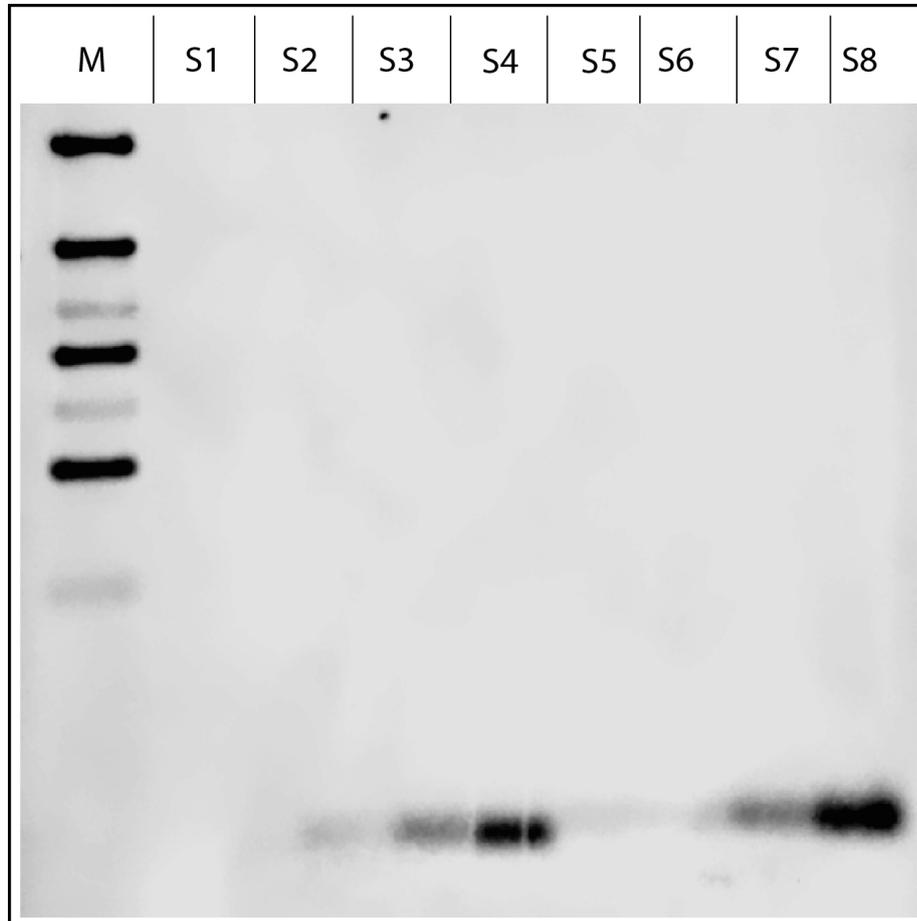


Abbildung 7: Southern Blot nach *small-pool*-PCR: Links DM1-2, rechts C-3 (S1 und S5 15 pg, S2 und S6 150 pg, S3 und S7 300 pg, S4 und S8 1000 pg DNA-Template).

Ausgehend von diesem Ergebnis wurden nun zur weiteren Optimierung schrittweise die Konditionen der *small-pool*-PCR verändert. Zunächst zeigte sich die HotStart-Taq Polymerase der Phusion-Polymerase in der Amplifikation des Wildtyp-Allels deutlich überlegen, sodass die PCR Banden deutlich stärker visualisiert werden konnten. Zusätzlich wurde ein RNase-Verdau der PCR vorangeschaltet (siehe Abschnitt DNA-Gewinnung), um eine mögliche Kontamination durch RNA zu eliminieren. Zuletzt wurde die Denaturierungs- und Annealing-Dauer verlängert (PCR Protokoll 3, siehe Material und Methoden). Diese Anpassungen erlaubten zum ersten Mal eine Amplifikation eines mutierten Allels im Patient DM1-5 (vergleiche Abbildung 8).

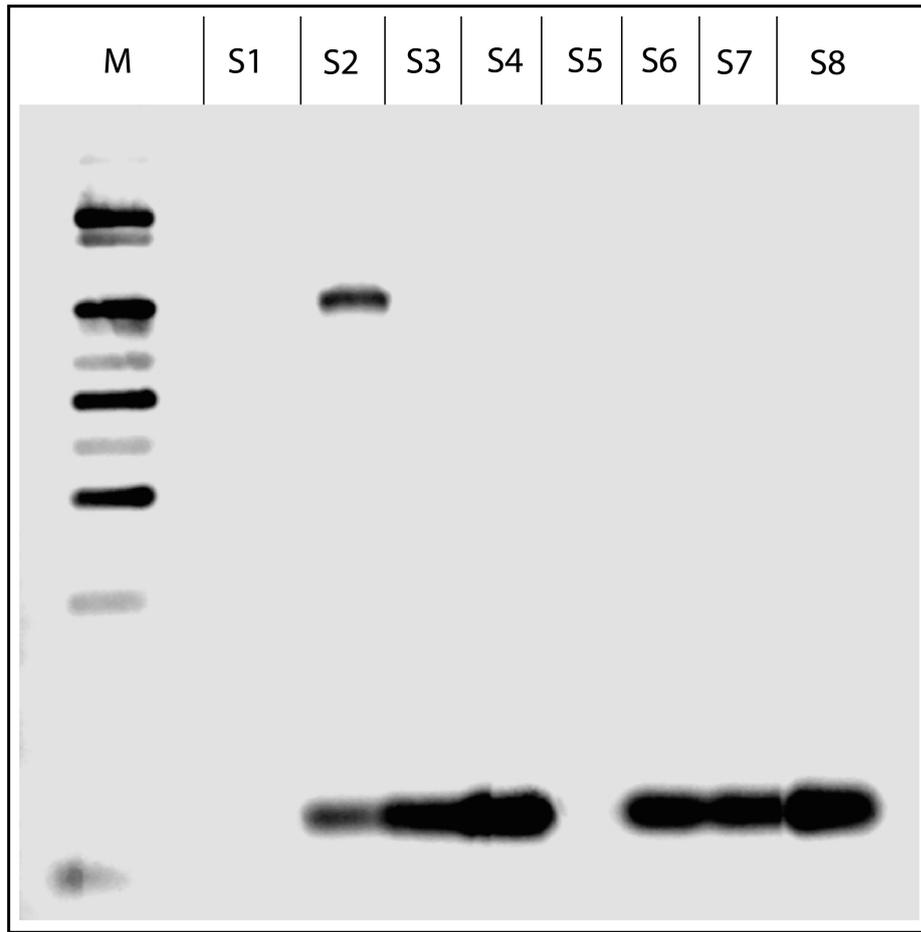


Abbildung 8: Southern Blot nach *small-pool*-PCR: Links DM1-5, rechts C-3 (S1 und S5 15 pg, S2 und S6 150 pg, S3 und S7 300 pg, S4 und S8 1000 pg DNA-Template).

Daran anschließend wurden die PCR Protokolle schrittweise optimiert, wobei PCR-Protokoll 6 zuletzt die besten Ergebnisse für die Bestimmung der Repeatlängen lieferte.

4.7 Bestimmung der Repeat-Länge durch *small-pool*-PCR im Muskelgewebe von DM1-Patienten

Patient DM1-2

Die DNA des Patienten DM1-2 konnte ebenfalls mit dem PCR-Protokoll Nr. 6 am erfolgreichsten amplifiziert werden. Für die Proben wurde jeweils eine DNA-Menge von 300 pg eingesetzt. Hier wurden die beiden Enzyme Ampli-Taq und HotStart-Taq unmittelbar miteinander verglichen.

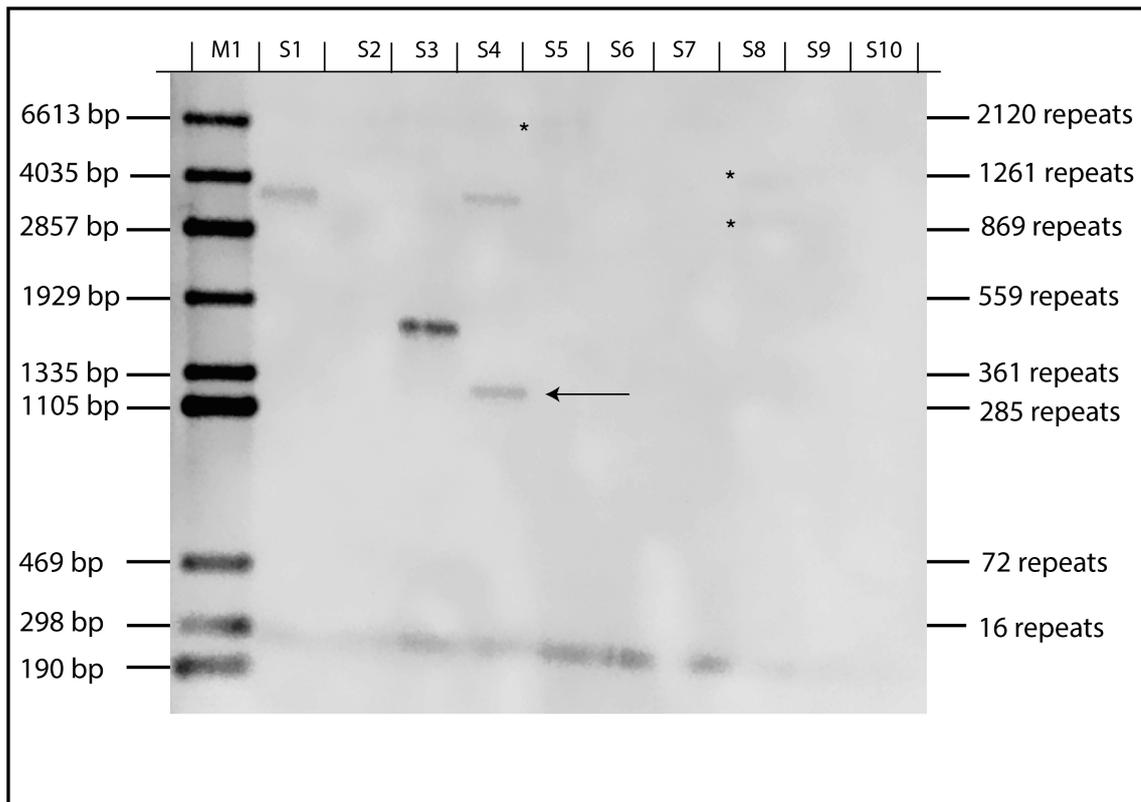


Abbildung 9: Southern Blot nach *small-pool-PCR*. M1: Marker. S1-S9: Patient DM1-2. S10: Kontrolle C-5. S1-S5: Ampli-Taq. S6-S10: HotStart-Taq. Verwendung von unterschiedlichen Annealing-Temperaturen: S1: 64°C, S2, S3, S6, S7 und S10: 66°C, S4, S5, S8 und S9: 67°C. Der Pfeil markiert die ePAL. Die Sterne markieren die nicht erkannten, sehr schwachen Banden (siehe Text).

Auf der Abbildung 9 ist zu erkennen, dass eine zuverlässige Amplifikation der mutierten Allele lediglich mit der Ampli-Taq Polymerase gelingt. In Spalte 5 und 8 zeigen sich jeweils zwei sehr lange Repeat-Expansionen, die jedoch aufgrund des schwachen Signals nicht durch die Imaging-Software erkannt werden konnten und somit auf 800 – 2100 repeats geschätzt werden müssen (siehe Stern-Markierung). Die *estimated progenitor allele length* (ePAL) beträgt in dieser Probe 316 repeats. Die Banden des Wildtyp-Allels kommen aufgrund der niedrigen Repeatzahl nur schwach zur Darstellung.

Banden	Spalten				
	1	3	4	5	8
1	1113 repeats	473 repeats	1063 repeats	1 repeat	900 repeats (geschätzt)
2		1 repeat	316 repeats	2100 repeats (geschätzt)	1200 repeats (geschätzt)

Tabelle 5: Auswertung der Fragmentlängen und Repeats des Patienten DM1-2 von lang nach kurz (= oben nach unten). Die ePAL ist in Spalte 4 hervorgehoben.

Patient DM1-3

Nach mehreren Versuchen und Anpassungen des PCR-Protokolls konnten schließlich mithilfe des PCR-Protokolls Nr. 6 (siehe Material und Methoden) die Mutationsallele vom Patienten DM1-3 aus der Zellkultur detektiert werden (vergleiche Abbildung 10). Die Polymerasen „Ampli-Taq“ und „HotStart-Taq“ wurden für diesen Versuch verwendet und Annealingtemperaturen von 66°C sowie 67°C eingestellt. Die stärksten Signale erbrachte die Einstellung des Thermocyclers bei 67°C unter Verwendung der „Hot Start“-Polymerase in den Proben. Die Zyklenzahl wurde auf 28 Zyklen reduziert und das Zeitinkrement weggelassen. Obwohl in allen Proben die gleiche DNA-Menge eingesetzt wurde (300 pg), waren deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konditionen (Polymerase, Patient/Kontrolle sowie den Annealingtemperaturen) sichtbar (vergleiche Abbildung 10).

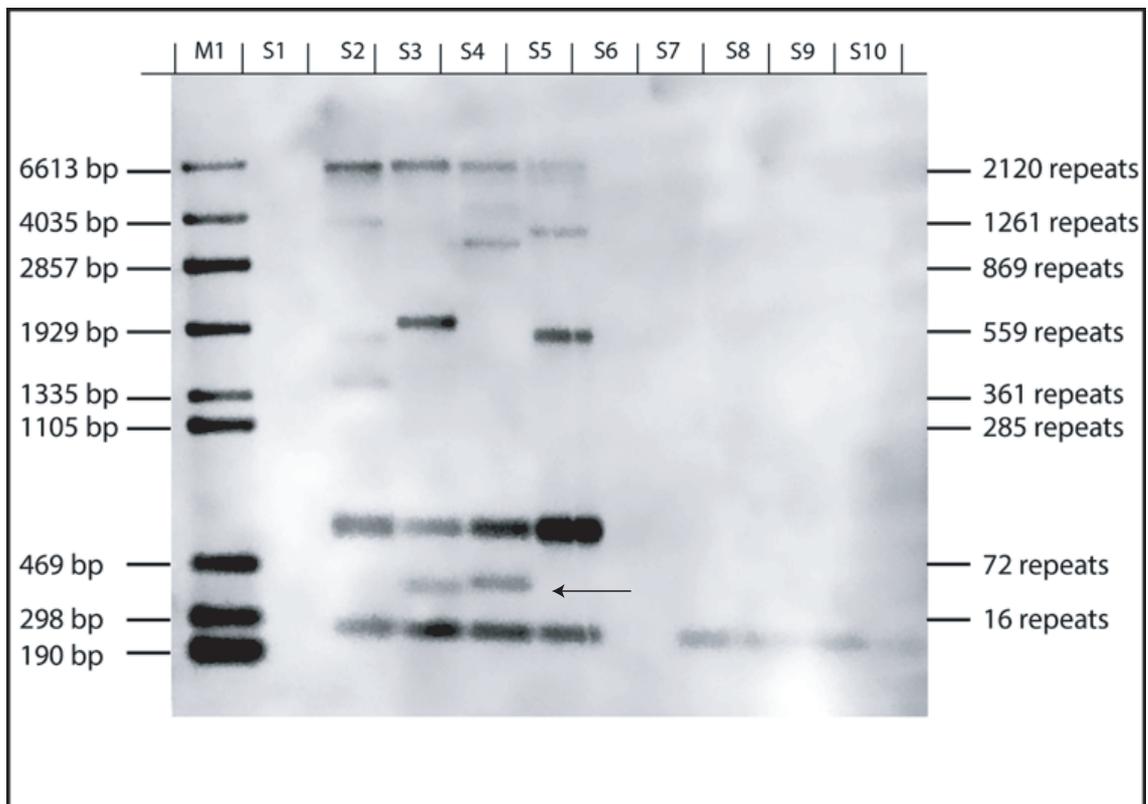


Abbildung 10: Southern Blot nach *small-pool*-PCR. M1: Marker. S1: Null-DNA als Kontrolle. S2-S5: Patient DM1-3. S6: Null-DNA als Kontrolle. S7-S10: Kontrolle C-5. S1, S2, S3, S7 und S8: Ampli-Taq. S4, S5, S6, S9 und S10: HotStart-Taq. S1, S2, S4, S6, S7 und S9: 66°C Annealing. S3, S5, S8 und S10: 67°C Annealing. Der Pfeil markiert die ePAL.

Die Mutationsallele waren in allen Spalten deutlich darstellbar. Die Repeatlänge des am stärksten amplifizierten Mutationsallels betrug im Durchschnitt 109 Repeats. Zusätzlich zu den signalstarken Mutationsbanden wurden weitere Banden sichtbar, welche 44 Repeats (S3-B4 und S4-B5) aufweisen sowie Banden mit wesentlich längeren Repeats.

Diese haben zum einen zwischen 400 und 600 Repeats (s. S2, S3 und S5) und über 1000 Repeats (1203, 1326 und 1080 Repeats, s. S2, S4 und S5). Auffallend ist, dass in allen vier Proben Bandenlängen mit über 1900 Repeats zu sehen sind (vgl. S1-S4). Die ePAL wurde auf 44 bp geschätzt.

Die Spalten 1 und 6 zeigen keinerlei Banden, da hier als Kontrolle Null-DNA aufgetragen worden ist.

In den Proben der Kontrolle C-6 lassen sich unter den gleichen Konditionen wie bei dem Patienten die Wildtyp-Banden darstellen, diese jedoch in geringerer Intensität als bei dem Patienten. Die Repeats haben bei der Kontrolle eine normale Länge von ca. 10 Repeats. In allen vier Proben der Kontrolle sind keine Mutationsallele zu sehen.

Banden	Spalten			
	2	3	4	5
1	2050 repeats	2073 repeats	2026 repeats	1960 repeats
2	1203 repeats	570 repeats	1326 repeats	1080 repeats
3	513 repeats	113 repeats	993 repeats	513 repeats
4	396 repeats	44 repeats	110 repeats	108 repeats
5	114 repeats	2 repeats	44 repeats	2 repeats
6	2 repeats		2 repeats	

Tabelle 6: Auswertung der Fragmentlängen und Repeats des Patienten DM1-3 von lang nach kurz (= oben nach unten). Die ePAL ist in Spalte 3 und 4 hervorgehoben.

Patient DM1-5

Abbildung 11 zeigt die Repeats des Patienten DM 1-5. Die DNA wurde direkt aus dem Muskel entnommen und stammt somit nicht aus einer Zellkultur. Im Vergleich sind die Repeats aus den Myoblasten der Zellkultur auf der rechten Seite des Bildes dargestellt. Auf den ersten Blick ist erkennbar, dass der Muskel wesentlich mehr Banden zeigt als die Zellkultur (vergleiche Abbildung 11). Die Range der Repeats reicht dabei von 138 bis 1766 Repeats.

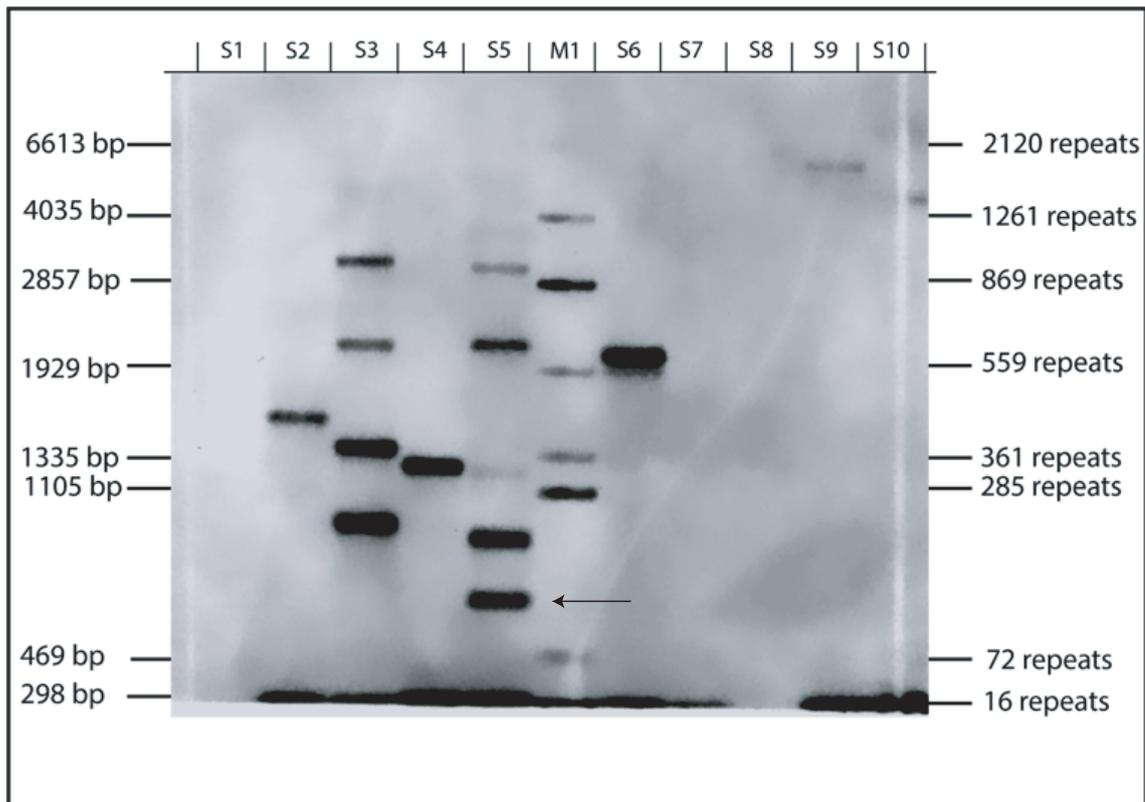


Abbildung 11: Southern Blot nach *small-pool*-PCR. M1: Marker. S1-S10: Patient DM1-5. S1-S5: Ampli-Taq. Vergleich der Repeats zwischen Muskelbiopsie und Zellkultur desselben Patienten. S1-S5: Repeats aus der Muskelbiopsie in aufsteigendem DNA-Gehalt (S1: 50pg, S2 100 pg, S3 150 pg, S4: 300 pg, S5: 600 pg). S6-S10: Myoblastenzellkultur in aufsteigendem DNA-Gehalt (S6: 50pg, S7 100 pg, S8 150 pg, S9: 300 pg, S10: 600 pg). Der Pfeil markiert die ePAL.

Das Wildtyp-Allel hat eine Länge von im Durchschnitt 19 Repeats (S2 = 314 bp, S3 = 311 bp, S4 = 307 bp, S5 = 305 bp) und entspricht damit der Normgröße eines Wildtyp-Allels. Die *estimated progenitor allele length* (ePAL) hat eine Länge von 138 Repeats. In den Spalten S9 und S10 sind die Banden nur sehr schwach, zeigen hier jedoch eine sehr große Repeatanzahl mit 1766 und 1430 Repeats. Eine präferentielle Amplifikation des kürzeren Wildtyp-Allels könnte die Detektion der in Spalte 6 deutlich erkennbaren Bande in den Spalten 7-10 aufgrund der höheren DNA-Konzentration verhindert haben.

Die im Blut diagnostizierte Repeatlänge beträgt 240-430 Repeats, sodass festgehalten werden kann, dass auch hier die Hypothese stimmt und im Muskel wesentlich längere Repeats vorkommen.

Banden	Spalten						
	2	3	4	5	6	9	10
1	446 repeats	990 repeats	340 repeats	943 repeats	603 repeats	1766 repeats	1430 repeats
2		643 repeats		640 repeats			
3		380 repeats		326 repeats			
4		235 repeats		212 repeats			
5				138 repeats			

Tabelle 7: Auswertung der Fragmentlängen und Repeats des Patienten DM1-5 von lang nach kurz (= oben nach unten). Die ePAL ist in Spalte 5 hervorgehoben.

4.8 Klinik der Patienten

Patient DM1-2

Die Patientin DM1-2 wurde 1978 geboren und mit 33 Jahren aus dem rechten M. vastus lateralis biopsiert.

Die DM1 Diagnose wurde 1996 im Rahmen einer Familiendiagnostik mit der Patientin, ihrem Vater, dessen Geschwistern und seiner Mutter gestellt (330-400 CTG-Repeats bei der Patientin). Der Vater der Patientin hat keine ausgeprägte klinische Symptomatik der DM1. Im Jahr 2009 wurde die Diagnostik bei der Patientin wiederholt und es stellte sich nun eine Repeatexpansion von 300-500 CTG-Repeats heraus.

Klinisch präsentiert die Patientin bei Diagnosestellung eine Greif-, Kieferöffnungs- und Zungenmyotonie sowie eine Schwäche in den Händen beim Halten schwerer Gegenstände. Eine minimale Kraftminderung in der Hüft- und Nackenbeugung konnte nachgewiesen werden. Bis auf eine minimale temporale Atrophie hat die Patientin keine weiteren Atrophien. In der elektromyographischen Untersuchung ergaben sich keine pathologische Spontanaktivität und auch bei Willkürinnervation stellten sich unauffällige motorische Einheiten dar. Insbesondere konnten keine myotonen Entladungsserien nachgewiesen werden.

Die Patientin gibt subjektiv keine Beschwerden an. Das Labor ist unauffällig und die Patientin hat bisher keine Medikamente eingenommen. Sie ist sehr sportlich und geht nach eigener Aussage ihrem Beruf ohne Schwierigkeiten nach.

Patient DM1-3

Der Patient DM1-3 wurde 1966 geboren. Die Diagnose DM1 wurde im Jahr 2009 gestellt. Durch Untersuchung der Leukozyten aus EDTA-Blut wurde bei ihm ein kurzes 50-70 CTG-Repeat im DMPK-Gen festgestellt.

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit liegen ärztliche Befunde aus den Jahren 2008 und 2009 vor.

Die Symptome des Patienten begannen im Alter von 32 Jahren, die Muskelbiopsie fand im Alter von 42 Jahren statt. Zu diesem Zeitpunkt (2008) verspürte der Patient bereits seit zehn Jahren Schwierigkeiten beim Öffnen der Hand nach festem Zugreifen, ein Kraftverlust sei ihm jedoch nicht aufgefallen und der Patient fühle sich weiterhin leistungsfähig. Das Sprechen sei subjektiv etwas undeutlich geworden, doch im Beruf in der Telekommunikationsbranche fühle sich der Patient nicht beeinträchtigt.

In der Familienanamnese seien keine Muskelerkrankungen bekannt, die vier Geschwister und drei Kinder des Patienten seien gesund. Die Mutter habe einen Katarakt, der Patient zum Zeitpunkt der Anamnese jedoch nicht. Zum klinischen Erscheinungsbild des Patienten wurde eine Stirnglatze beschrieben.

In der körperlichen Untersuchung zeigten sich keine Paresen, aber eine deutliche Aktions- und Perkussionsmyotonie am Thenar beidseits sowie eine Perkussionsmyotonie der Zungenmuskulatur.

In der neurophysiologischen Untersuchung zeigten sich in der Elektromyographie myotone Entladungsserien bei ansonsten regelrecht konfigurierten Muskelaktionspotentialen.

Im Langzeit-EKG zeigte sich eine bradykarde Sinusarrhythmie. In der Lungenfunktionsuntersuchung ergab sich der Verdacht auf eine beginnende Atemfunktionsstörung. Unter Belastung zeigte der Patient eine mäßige Globalinsuffizienz.

Die augenkonsiliarische Untersuchung erbrachte Befunde eines beginnenden Kataraktes, welcher zu diesem Zeitpunkt nicht interventionswürdig erschien. Eine Medikation habe der Patient bisher noch nicht erhalten.

Im Verlauf wurde 2009 die Diagnose Myotone Dystrophie Typ 1 gestellt. Klinisch hatte der Patient weder Schmerzen, noch Krämpfe, Schluckbeschwerden oder Schwierigkeiten beim Sehen. Das Loslassen der Hand nach dem Greifen fiel dem Patienten jedoch schwer. Der Patient war zu allen Qualitäten vollständig orientiert. Die Reflexe, Koordination, Sensibilität und Extrapiramidalmotorik erwiesen sich als unauffällig.

Laborchemisch war eine Kreatinkinase (CK) mit 540 U/l erhöht, ebenso fanden sich erhöhte Leberwerte (GOT 68U/l, GPT 76 U/l, GGT 203 U/l) und erhöhte segmentierte Granulozyten (79%) sowie mit 15% erniedrigte Lymphozyten.

Die Elektronenmyographie zeigte pathologische Spontanaktivität mit positiv scharfen Wellen, distalen myotonen runs und pseudomyotonen Entladungen.

Im EKG zeigten sich keine Auffälligkeiten. Die Lungenfunktionsuntersuchung ergab eine Verschlechterung im Vergleich zum Vorbefund. Hier konnte eine mäßige Hypoxämie mit geringer Globalinsuffizienz und eine deutliche Einschränkung der muskulären Atempumpe nachgewiesen werden. Die augenkonsiliarische Untersuchung erbrachte die Diagnose einer Cataracta corticalis incipiens beidseits sowie epiretinalen Gliose am rechten Auge.

Patient DM1-5

Der Patient DM1-5 wurde 1979 geboren. Bei ihm lag ein 240-430 CTG-Repeat im DMPK-Gen vor, das Wildtyp-Allel zeigte 12 Kopien. Insgesamt liegen sehr wenig Informationen zu diesem Patienten vor.

Klinisch beschreibt der Patient Sensibilitätsstörungen sowie Paresen an den distalen Armen, welche seit Jahren bestünden. Die Reflexe und die Nervenleitgeschwindigkeit wurden in der klinischen Untersuchung als normal eingestuft. Das EMG weist hingegen myopathische und myotone Muster auf.

Es gibt keine eindeutigen Aussagen darüber, ob die Familienanamnese als positiv beschrieben werden kann.

4.9 Vergleich der CTG-Repeatanzahl mit dem klinischen Phänotyp

Bei der Patientin DM1-2 waren im Southern Blot vier Banden nachweisbar. Das Progenitor-Allel hat eine Länge von 316 Repeats. Die im Blut diagnostizierten Repeatlängen (300-500 Repeats) konnten ebenfalls in den Myoblasten mit 316 (S5-B2) und 473 (S4-B1) nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten sich zwei Banden mit mehr

als 1000 Repeats (vergleiche Abbildung 9). Die Patientin hat einen klinisch sehr milden Verlauf.

Der Patient DM1-3 hat eine klinisch nachweisbare Myotonie neben weiteren extramuskulären Symptomen. Die im Blut diagnostizierte Repeatanzahl von 30-70 Repeats lässt sich auch im Southern Blot aus der Zellkultur in zwei Spuren nachweisen (vergleiche Abbildung 10). Die große Mehrheit der Banden im Southern Blot hat jedoch eine größere Länge. Das Progenitor-Allel hat eine Länge von 44 Repeats. In allen Spuren ist das expandierte Allel mit (im Schnitt) 109 Repeats nachweisbar. Leider handelt es sich bei den isolierten Zellen in Hinblick auf Morphologie und Wachstumsverhalten jedoch höchstwahrscheinlich um Fibroblasten (keine Desmin-Expression in der Immunfluoreszenz), was bei der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Dennoch sind auch hier deutlich längere Allele nachweisbar als in der Blutprobe.

Auch bei Patient DM1-5 konnten die im Blut diagnostizierten Repeats (240-430) nachgewiesen werden, wobei zusätzlich in diesem Blot deutlich längere Banden zu sehen sind (vergleiche Abbildung 11). Das Progenitor-Allel aus dem Muskel hat eine Länge von 138 Repeats, jenes aus der Zellkultur hat eine Länge von 603 Repeats. Der Patient zeigt mit Paresen und Sensibilitätsstörungen eine deutliche Krankheitsmanifestation.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine Methodik zur exakten Bestimmung der Repeatanzahl im Muskelgewebe bei Patienten mit Myotoner Dystrophie Typ 1 zu etablieren und die Ergebnisse im Anschluss mit der Klinik einzelner Patienten zu korrelieren. Anlehnend an die Methodik von Professor Darren Monckton und seiner Glasgower Arbeitsgruppe (Monckton et al., 1995) sollte jedoch eine nicht-radioaktive Quantifizierung von CTG-Repeats verwendet werden, die bei ähnlicher Sensitivität, die Nachteile der Verwendung radioaktiver Sonden in Bezug auf Umweltschutz und Arbeitssicherheit umgeht. Im Folgenden sollen die Vor- und Nachteile der angewandten Methodik beleuchtet und ihr zukünftiger Stellenwert für Diagnostik und Forschung diskutiert werden.

5.1 Quantifizierung der CTG-Repeatanzahl im Muskelgewebe

Bei klinischem Verdacht auf eine Myotone Dystrophie Typ 1 werden zur Bestätigung der Diagnose die Standard-PCR und - bei sehr langen Repeats - der Southern Blot oder die *repeat-primed*-PCR herangezogen. Die DNA hierfür wird routinemäßig aus Leukozyten isoliert.

Diverse Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die CTG-Repeats im Muskelgewebe von denselben DM1-Patienten länger als die Repeats aus dem Blut sind (Anvret et al., 1993; Thornton et al., 1994). Eine überlegene Korrelation der Repeatzahl im Muskel gegenüber der Repeatzahl im Blut wird bisher kontrovers in der Literatur diskutiert: Meola et al. stellen fest, dass keine Korrelation zwischen der Repeatlänge im Muskel und der Schwere der Erkrankung beschrieben werden kann und lediglich die in Leukozyten diagnostizierte Repeatlänge eine Korrelation erlaubt (Meola and Cardani, 2015). Thornton et al. dagegen verlangen weitere Analysen zur endgültigen Bewertung des Korrelationsvergleichs unterschiedlicher Geweben (insbesondere Muskelzellen) und der Schwere der Erkrankung (Thornton et al., 1994).

Vor diesem Hintergrund sollte daher eine Methodik zur Bestimmung der Repeatanzahl im Muskelgewebe etabliert werden, um zukünftig die Ergebnisse aus primären Muskelzellen mit den diagnostizierten CTG-Repeats aus den Leukozyten zu vergleichen und mit der klinischen Symptomatik der Patienten zu korrelieren.

Die Gewinnung von DNA aus Myoblasten ist methodisch gesehen weitaus aufwändiger als die DNA-Gewinnung aus Leukozyten. Die Patienten müssen zunächst der Biopsie zustimmen und sich dieser unterziehen – ein kleiner chirurgischer Eingriff in lokaler

Betäubung oder Leitungsanästhesie ist dafür notwendig. Darüber hinaus ist eine Muskelbiopsie im Regelfall nicht für die Diagnostik der myotonen Dystrophie Typ I notwendig, sie stellt also eine zusätzliche Intervention für den Patienten dar (Schneider-Gold et al., 2018). Dennoch bietet diese Analyse die Möglichkeit, die genetischen Alterationen unmittelbar im primär durch die Erkrankung betroffenen Gewebe zu erfassen und somit zu einem besseren Verständnis der Erkrankung und den zugrundeliegenden Mechanismen beizutragen. Von besonderem Interesse könnten post-mortem Analysen von verstorbenen DM1-Patienten sein, die CTG-Expansionen in verschiedenen Geweben mit der klinischen Beteiligung des jeweiligen Organsystems systematisch auswerten.

5.2 Quantifizierung der CTG-Repeatanzahl mit Hilfe der *small-pool* PCR

In der Diagnostik der myotonen Dystrophie Typ I hat sich in vielen Laboratorien ein zweistufiges Prinzip etabliert: Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer myotonen Dystrophie werden zunächst PCR-basierte Screening-Verfahren und bei positivem Ergebnis ein Southern Blot zur Bestätigung durchgeführt (Kamsteeg et al., 2012; Savić Pavićević et al., 2013; Chakraborty et al., 2016). Seit der Erfindung der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) durch Kary Mullis im Jahr 1983 (erstmalig beschrieben in (Saiki et al., 1985)) haben sich zahlreiche Modifikationen des ursprünglichen PCR-Protokolls mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anwendungen etabliert, so z.B. die sogenannte *touchdown*-PCR (Don et al., 1991), *overlap-extension*-PCR (Urban et al., 1997), *repeat-primed* PCR (Warner et al., 1996) und *small-pool* PCR (Gomes-Pereira et al., 2004). In der Diagnostik der myotonen Dystrophie sind konventionelle PCR Protokolle häufig nicht in der Lage, die langen, mutierten, CTG-amplifizierten Allele aufgrund der präferentiellen Amplifikation des kurzen Wildtyp-Allels zu detektieren (Chakraborty et al., 2016). Dies kann bei Patienten mit sehr großer Repeatzahl zu falsch negativen Testergebnissen führen, wenn Primer verwendet werden, die den DMPK-Locus flankieren und somit die Amplifikation des kürzeren Wildtyp-Allels begünstigen. Deshalb werden solche PCR-Protokolle lediglich zum initialen Screening eingesetzt: Werden zwei unterschiedlich lange, nur wenige CTG-Repeats enthaltende PCR-Produkte amplifiziert, kann das Vorliegen einer myotonen Dystrophie ausgeschlossen werden (Kamsteeg et al., 2012). Kommt jedoch nur ein Allel zur Darstellung, können homozygote Gesunde nicht von falsch negativen Erkrankten unterschieden werden. In der Regel wird deshalb eine sogenannte *repeat-primed* PCR (Warner et al., 1996) durchgeführt, die das Vorliegen langer mutierter Allele zwar sicher detektieren kann,

jedoch keine Rückschlüsse auf die Länge des mutierten Allels bzw. die Repeatzahl zulässt. Zur Auswertung einer *repeat-primed* PCR ist eine kapillarelektrophoretische Fragmentauftrennung notwendig.

Zur Bestätigung und Repeatzahlbestimmung wird häufig ein Southern Blot enzymatisch verdauter, genomischer DNA eingesetzt, der jedoch aufgrund genomischer Mosaiksituationen meist keine distinkten Banden, sondern lediglich einen „Schmier“ des mutierten Allels zeigt. Eine eindeutige Repeatzahlbestimmung ist somit auch hier häufig nicht möglich. Zudem können *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in Restriktionsschnittstellen zu falsch positiven Ergebnissen führen, sodass die Analyse mit mindestens zwei unterschiedlichen Restriktionsansätzen durchgeführt werden sollte, wie Chakraborty et al. eindrücklich zeigen konnten (Chakraborty et al., 2016).

Die *small-pool*-PCR ist eine elegante Methode zur fast exakten Repeatzahlbestimmung bei genetisch instabilen Erkrankungen (Monckton et al., 1995; Coolbaugh-Murphy et al., 2007). Dabei werden einzelne oder nur wenige Genom-Kopien als *template* der PCR-Reaktion eingesetzt, sodass die Anzahl der zu amplifizierenden Allele beschränkt wird und somit „Schmier“-Effekte im anschließenden Southern Blot sowie die präferentielle Amplifikation des Wildtyp-Allels verhindert werden (Malbec et al., 2019). Nur so kann das besondere Merkmal der somatischen Instabilität zum Vorschein gebracht werden (Overend et al., 2019). Diese Methode ist verglichen mit konventionellen PCR-Protokollen und der *repeat-primed* PCR aufwendiger und aufgrund der geringen DNA-Mengen deutlich anfälliger für Kontaminationen, hat sich jedoch insbesondere zu Forschungszwecken und Korrelationen der Repeatzahl mit dem klinischen Phänotyp bewährt.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnte eine genaue Repeatzahlbestimmung bei drei DM1-Patienten durch Kombination der *small-pool*-PCR mit dem Southern Blot erfolgen. Die Amplifikation des DMPK-Locus aus einer einzelnen (haploiden) Genom-Kopie (entspricht etwa 3,3 pg DNA) gelang in der vorliegenden Arbeit nicht, jedoch konnten bereits mit 150 pg (entspricht etwa 50 Kopien) schwache Wildtyp-Banden amplifiziert werden. Hier gilt es jedoch zu beachten, dass die DNA-Quantifikation teils mittels Nanodrop Spektrophotometrie erfolgte, die insbesondere bei niedriger DNA-Konzentration die DNA Menge teils 10fach überschätzt (Khetan et al., 2019). Des Weiteren muss beachtet werden, dass die im Vergleich zu leukozytärer DNA vergleichsweise geringe Allelzahl (vergleiche z.B. Overend et al., 2019) durch Klonalitätseffekte nach Subkultur der Myoblasten hervorgerufen werden kann.

Festzuhalten ist, dass die Etablierung der *small-pool*-PCR sehr aufwendig ist und zum Teil mehrere *Cycling*-Protokolle ausgetestet werden mussten, bevor die optimale Kondition gefunden werden konnte. Die Wahl der Polymerase scheint dabei eine besonders wichtige Rolle zu spielen, lediglich Taq-basierte Polymerasen ohne *proof-reading* Funktion ermöglichten eine erfolgreiche Amplifikation des DMPK-Locus. Diese Methodik scheint somit nicht für die Standard-Diagnostik der myotonen Dystrophie geeignet, vielmehr besitzt sie Ihren Stellenwert zur genauen Repeatzahlbestimmung und Analyse von Mosaiksituationen in unterschiedlichen Geweben zu wissenschaftlichen und gegebenenfalls klinisch-prognostischen Zwecken (Overend et al., 2019). Ob die *small-pool*-PCR auch bei anderen neurologischen und neuromuskulären Trinukleotid-Repeat Erkrankungen eine genaue Repeatzahlbestimmung ermöglicht, bleibt Gegenstand weiterer Forschung (Tomé et al., 2014).

5.3 Nicht-radioaktive Detektionsverfahren

Northern und Southern Blot Analysen wurden in der Vergangenheit routinemäßig unter Einsatz von radioaktiven Isotopen durchgeführt (Southern, 1975; Rio, 2014). Dabei wurde aufgrund seiner hervorragenden Sensitivität bevorzugt ^{32}P verwendet, das jedoch strengen Strahlenschutz-Auflagen unterliegt und eine ernstzunehmende Gefahr für Mensch und Umwelt darstellt (Jones, 2005; Walz et al., 2019). Deshalb wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche, nicht-radioaktive Methoden zur sequenzspezifischen Detektion von DNA und RNA etabliert (Kessler, 1994). Neben Biotin- und Digoxigenin-Markierung der eingesetzten Sonden (Höltke et al., 1995; Huang et al., 2014), die eine Antikörper-vermittelte Detektion erlauben, haben mittlerweile auch direkte Detektionsverfahren z.B. durch Fluoreszenzfarbstoffe (Miller et al., 2018) einen Stellenwert zur Detektion von DNA und RNA erlangt.

In dieser Arbeit sollte aufgrund der in Deutschland geltenden, strengen Regularien zur Handhabung radioaktiver Stoffe sowie unter Berücksichtigung der deutlich überlegenen Arbeitssicherheit ein nicht-radioaktives Nachweisverfahren verwendet werden.

Die Digoxigenin-Markierung der von uns hergestellten Sonden erschien aus vielerlei Gründen optimal für die Detektion mutierter und wildtypischer Allele: Die Markierung ist vergleichsweise sicher und erfolgt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (siehe Material und Methoden) in einer einfachen PCR-Reaktion, die Detektion erreicht eine ähnliche Sensitivität wie radioaktive Isotope und ist sehr stabil (Höltke et al., 1995, 2000). Gegenüber Biotin (Vitamin H) zeichnet es sich zudem durch ein geringeres Hintergrundsignal aus, da Digoxigenin nicht natürlicherweise im Probenmaterial

vorkommt und nur im gebundenen Zustand durch einen Antikörper erkannt werden kann (Hapten) (Kessler, 1994). Auch in unseren Händen zeigte das Digoxigenin-System eine adäquate Sensitivität und ausgezeichnete Spezifität (vergleiche Abbildung 4 und 6), sodass eine Rückkehr zu radioaktiven Detektionsmethoden momentan nicht überlegen oder gar notwendig erscheint. Zudem sind Digoxigenin-markierte Sonden bereits kommerziell erhältlich, auf ihren Einsatz wurde jedoch in dieser Arbeit aus Kostengründen verzichtet.

5.4 Bewertung der erhobenen Ergebnisse

Nachdem in der Vergangenheit die Korrelation zwischen der Anzahl der CTG-Repeats und dem klinischen Phänotyp nicht eindeutig gelang (Hedberg et al., 1999; Hamshere et al., 1999; Andersen et al., 2013; Pratte et al., 2015), konnten Overend et al. kürzlich eine Korrelation der im Blut durch *small-pool*-PCR bestimmten *estimated progenitor allele length* (ePAL) sowie der modalen *allele length* mit 7 bzw. 8 standardisiert erhobenen klinischen Parametern zeigen (Overend et al., 2019). Dies zeigt eindrücklich die Überlegenheit der genauen Repeatzahlbestimmung durch Methoden wie die *small-pool*-PCR gegenüber ungenauen Verfahren wie genomische Southern Blots in der Korrelation des Genotyps zum Phänotyp. Eine ähnliche Korrelation mit aus dem Muskel gewonnener DNA und standardisiert erhobenen klinischen Parametern liegt zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vor.

Diese Promotionsarbeit versteht sich als Grundstein für eben diese Untersuchung und hat die Methodik dazu vollumfänglich etabliert. Auch wenn diese Analyse bei einem großen Patientenkollektiv mit sorgfältig kuratierten klinischen Daten momentan aussteht, so erlauben die bisher erhobenen Daten aus den drei untersuchten Patienten dennoch vorläufige Aussagen:

Während die ePAL bei den untersuchten Patienten mit der im Blut bestimmten Repeatzahl übereinstimmen bzw. unterschreiten (vergleiche DM1-5), finden sich im Muskel in Analogie zu publizierten Ergebnissen (Anvret et al., 1993; Thornton et al., 1994) deutlich längere CTG-Repeats als in Leukozyten. Auffallend ist dabei, dass beim Patienten DM1-3, welcher von allen ausgewählten Patienten die niedrigste im Blut diagnostizierte Repeatanzahl besitzt (50-70 Repeats), die längsten Banden in der Zellkultur aufweist (> 2000 Repeats). Dieses Phänomen zeigte sich auch in der von Anvret et al. untersuchten Kohorte (Anvret et al., 1993). Derartig lange Repeats wurden in der Literatur bereits als unmittelbare Konsequenz der altersabhängigen

Repeatexpansion durch somatische Instabilität beschrieben (Martorell et al., 1998; Morales et al., 2012; Pratte et al., 2015) und können somit durch das Alter des Patienten (Alter bei Biopsieentnahme: 42 Jahre) erklärt werden. Die fehlende Desmin-Expression der isolierten Zellen des Patienten DM1-3 lässt jedoch auf eine Kontamination und Überwachsen der Myoblasten durch Fibroblasten schließen, was die Aussagekraft der für diesen Patienten erhobenen Daten einschränkt. Zusätzlich muss beachtet werden, dass CTG-Repeat haltige PCR Produkte sogenannte *slipped-stranded* Strukturen annehmen können, die die Laufeigenschaften der DNA Moleküle im Agarose Gel deutlich verändern können und zu falsch langen Repeatzahlen in der Analyse führen können (Gomes-Pereira and Monckton, 2017). Diese Strukturen können jedoch durch Zugabe von Ethidiumbromid im Agarose-Gel aufgelöst werden. In dem hier verwendeten Protokoll wurden die verwendeten Agarose-Gele erst nach Ablauf der elektrophoretischen Auftrennung im Ethidiumbromid-Bad sublimeriert und die Banden sichtbar gemacht. Zum sicheren Ausschluss solcher potentiell auftretenden Artefakte sollte jedoch zukünftig das Ethidiumbromid direkt der Agarose beigemischt werden. Dennoch weisen die initial erhobenen Ergebnisse in Zusammenschau mit den anderen untersuchten Patienten auf eine gute interne und externe Validität der Methodik hin.

Der direkte Vergleich der erhaltenen Banden aus der Muskelbiopsie (ohne kulturelle Aufzucht der Zellen) und denen aus der Zellkultur des Patienten DM1-5 zeigt einen Verlust des genomischen Mosaiks in der Patientenprobe DM1-5 (vergleiche Abbildung 11). Dies lässt sich am ehesten durch klonale Proliferationseffekte in der Kultur der Myoblasten erklären. Technische Artefakte bei der Amplifikation der Myoblasten-DNA erscheinen bei der parallel durchgeführten Amplifikation der Biopstat-DNA unwahrscheinlich, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Insgesamt erscheint die direkte DNA-Extraktion aus dem Muskelgewebe ohne Sub-Kultur der Myoblasten aus verschiedenen Gründen von Vorteil: a) Eine Kontamination durch Fibroblasten ist auf den natürlicherweise im Muskel vorkommenden Fibroblastenanteil beschränkt und erreicht niemals 100% (vergleiche DM1-3). b) Klonale Proliferationseffekte mit Verlust der Repeatzahl-Heterogenität sind ausgeschlossen. c) Eine direkte Isolation der DNA aus dem entnommenen Muskel erlaubt eine Kosten- und Zeitersparnis. Somit erscheint es vorteilhaft, bei zukünftigen *high-throughput* Analysen die DNA direkt aus dem Biopstat zu isolieren, sofern die Biopsie zuverlässig Muskelgewebe erfasst.

Eine wissenschaftlich aussagekräftige Korrelation ist mit drei untersuchten Patienten nicht möglich. Während sich in den Patienten DM1-3 und DM1-5 die Repeatzahl gut mit der klinischen Symptomatik assoziieren lässt, zeigt Patientin DM1-2 trotz relativ langer ePAL eine milde Symptomatik, die frühe Erstdiagnose ist auf die positive Familienanamnese und eher nicht auf einen frühen Symptombeginn zurückzuführen. Dies reflektiert die hohe interindividuelle Heterogenität der Patienten (Ashizawa et al., 1992; Lavedan et al., 1993; Gennarelli et al., 1996), sodass eine Prognose bezüglich des individuellen Krankheitsverlaufs nur äußerst zurückhaltend gestellt werden sollten (Kamsteeg et al., 2012).

5.5 Perspektive

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es keinen kurativen Therapieansatz zur Behandlung der myotonen Dystrophie Typ 1. Für zukünftige Therapieansätze ist jedoch die Grundlagenforschung und die damit einhergehende Untersuchung der Verhaltensmuster der ursächlichen Repeatexpansionen in den unterschiedlichen Geweben essentiell (Tomé and Gourdon, 2020). In dieser Arbeit konnte durch die Etablierung der Methode der nicht-radioaktiven Bestimmung der CTG-Repeatanzahl in Muskelgewebe eine Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen werden.

Während der Durchführung dieses Promotionsvorhabens haben Dandelot et al. die so genannte „*flash-small-pool-PCR*“ entwickelt, mit welcher man zeiteffizient und kostengünstig die CTG-Repeats mithilfe einer Infrarot-Fluoreszenz-Markierung eines Primers und der Analyse eines LI-COR-Systems analysieren kann (Dandelot and Gourdon, 2018). In ihrem Protokoll verzichteten die Autoren auf einen Southern Blot mit CTG-sensitiven Sonden, so dass die Spezifität der Methode allein auf der Primer-Spezifität beruht und somit geringfügig niedriger einzuschätzen ist. Dennoch könnte diese Methode aufgrund der großen Zeitersparnis gerade bei großen Patientenkollektiven eine sinnvolle Alternative sein.

Darüber hinaus wurde kürzlich die CTG-Repeatanzahlbestimmung durch *small-pool-PCR* im Speichel mit derjenigen im Blut verglichen und eine ähnliche Stabilität der CTG-Repeats im Speichel wie im Blut festgestellt (Corrales et al., 2019). Diese Analyse erlaubt zwar die genaue Bestimmung der ePAL und somit einfache prognostische Rückschlüsse, auch sie ersetzt jedoch nicht die Analyse in den Endorganen der systemischen Schädigung bei myotoner Dystrophie Typ 1.

Das hier etablierte Protokoll ist aufwendig, jedoch gerade bei Verwendung des primären Biopsiematerials ohne Subkultivierung der Myoblasten zur DNA-Extraktion eine äußerst sensitive und exakte Technik, um die CTG-Repeatanzahl im Muskelgewebe genau zu bestimmen. Die wissenschaftliche Relevanz der von uns entwickelten Methode und die mögliche Anwendbarkeit für andere neurologische und neuromuskuläre Repeaterkrankungen kann jedoch erst in weiteren Arbeiten in einem größeren, systematisch kuratierten Patientenkollektiv gezeigt werden. Dafür konnte jedoch hier die Grundlage in Form einer funktionierenden Methodik gelegt werden.

Bibliographie

Andersen, G., Ørngreen, M.C., Preisler, N., Colding-Jørgensen, E., Clausen, T., Duno, M., Jeppesen, T.D., Vissing, J., 2013. Muscle phenotype in patients with myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 47, 409–415. <https://doi.org/10.1002/mus.23535>

Angelini, C., Tasca, E., 2012. Fatigue in muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* 22, S214–S220. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.10.010>

Antonini, G., Soscia, F., Giubilei, F., De Carolis, A., Gragnani, F., Morino, S., Ruberto, A., Tatarelli, R., 2006. Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *J. Rehabil. Med.* 38, 181–185. <https://doi.org/10.1080/16501970500477967>

Anvret, M., Ahlberg, G., Grandell, U., Hedberg, B., Johnson, K., Edström, L., 1993. Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1397–1400. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.9.1397>

Ashizawa, T., Dubel, J.R., Dunne, P.W., Dunne, C.J., Fu, Y.H., Pizzuti, A., Caskey, C.T., Boerwinkle, E., Perryman, M.B., Epstein, H.F., 1992. Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology* 42, 1877–1883. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.10.1877>

Ashizawa, T., Gagnon, C., Groh, W.J., Gutmann, L., Johnson, N.E., Meola, G., Moxley, R., Pandya, S., Rogers, M.T., Simpson, E., Angeard, N., Bassez, G., Berggren, K.N., Bhakta, D., Bozzali, M., Broderick, A., Byrne, J.L.B., Campbell, C., Cup, E., Day, J.W., De Mattia, E., Duboc, D., Duong, T., Eichinger, K., Ekstrom, A.-B., van Engelen, B., Esparis, B., Eymard, B., Ferschl, M., Gadalla, S.M., Gallais, B., Goodglick, T., Heatwole, C., Hilbert, J., Holland, V., Kierkegaard, M., Koopman, W.J., Lane, K., Maas, D., Mankodi, A., Mathews, K.D., Monckton, D.G., Moser, D., Nazarian, S., Nguyen, L., Nopoulos, P., Petty, R., Phetteplace, J., Puymirat, J., Raman, S., Richer, L., Roma, E., Sampson, J., Sansone, V., Schoser, B., Sterling, L., Statland, J., Subramony, S.H., Tian, C., Trujillo, C., Tomaselli, G., Turner, C., Venance, S., Verma, A., White, M., Winblad, S., 2018. Consensus-based care recommendations for adults with myotonic dystrophy type 1. *Neurol. Clin. Pract.* 8, 507–520. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000531>

Batra, R., Nelles, D.A., Pirie, E., Blue, S.M., Marina, R.J., Wang, H., Chaim, I.A., Thomas, J.D., Zhang, N., Nguyen, V., Aigner, S., Markmiller, S., Xia, G., Corbett, K.D., Swanson, M.S., Yeo, G.W., 2017. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell* 170, 899–912.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.010>

- Batten, F.E., Gibb, H.P., 1909. MYOTONIA ATROPHICA. *Brain* 32, 187–205. <https://doi.org/10.1093/brain/32.2.187>
- Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M.G., Ricchiuti, A., Marchi, S., 2006. Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World J. Gastroenterol.* 12, 1821–1828. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i12.1821>
- Bird, T.D., 1993. Myotonic Dystrophy Type 1, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Bouchard, J.-P., Cossette, L., Bassez, G., Puymirat, J., 2015. Natural history of skeletal muscle involvement in myotonic dystrophy type 1: a retrospective study in 204 cases. *J. Neurol.* 262, 285–293. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7570-x>
- Boussaïd, G., Prigent, H., Laforet, P., Raphaël, J.-C., Annane, D., Orlikowski, D., Lofaso, F., 2018. Effect and impact of mechanical ventilation in myotonic dystrophy type 1: a prospective cohort study. *Thorax* 73, 1075–1078. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210610>
- Braida, C., Stefanatos, R.K.A., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H.J.M., Niel, F., Goizet, C., Arveiler, B., Koenig, M., Lagier-Tourenne, C., Mandel, J.-L., Faber, C.G., de Die-Smulders, C.E.M., Spaans, F., Monckton, D.G., 2010. Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1399–1412. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq015>
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zeman, B., Snell, R.G., Rundle, S.A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P.S., Shaw, D.J., Housman, D.E., 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Brunner, H.G., Brüggewirth, H.T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B.C.J., Hoppe, R.L.E., de Die, C.E.M., Höweler, C.J., van Oost, B.A., Wieringa, B., Ropers, H.H., Smeets, H.J.M., 1993. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele site on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1016–1023.
- Chakraborty, S., Vatta, M., Bachinski, L.L., Krahe, R., Dlouhy, S., Bai, S., 2016. Molecular Diagnosis of Myotonic Dystrophy. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 91, 9.29.1-9.29.19. <https://doi.org/10.1002/cphg.22>

- Clarke, N.R.A., Kelion, A.D., Nixon, J., Hilton-Jones, D., Forfar, J.C., 2001. Does cytosine-thymine-guanine (CTG) expansion size predict cardiac events and electrocardiographic progression in myotonic dystrophy? *Heart* 86, 411–416. <https://doi.org/10.1136/heart.86.4.411>
- Cleary, J.D., Tomé, S., López Castel, A., Panigrahi, G.B., Foiry, L., Hagerman, K.A., Sroka, H., Chitayat, D., Gourdon, G., Pearson, C.E., 2010. Tissue- and age-specific DNA replication patterns at the CTG/CAG-expanded human myotonic dystrophy type 1 locus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1079–1087. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1876>
- Conforti, R., de Cristofaro, M., Cristofano, A., Brogna, B., Sardaro, A., Tedeschi, G., Cirillo, S., Di Costanzo, A., 2016. Brain MRI abnormalities in the adult form of myotonic dystrophy type 1: A longitudinal case series study. *Neuroradiol. J.* 29, 36–45. <https://doi.org/10.1177/1971400915621325>
- Coolbaugh-Murphy, M., Xu, J., Simien, C., Ramagli, L., Brown, B., Lindor, N., Gallinger, S., Haile, R., Seminara, D., Lynch, P., Frazier, M., Siciliano, M., 2007. Small pool PCR (SPPCR) makes microsatellite instability (MSI) a biomarker for identifying genetic risk in normal tissues of HNPCC MSI-high families and in tumors of patients thought microsatellite stable. *Cancer Res.* 67, 828–828.
- Corrales, E., Vásquez, M., Zhang, B., Santamaría-Ulloa, C., Cuenca, P., Krahe, R., Monckton, D.G., Morales, F., 2019. Analysis of mutational dynamics at the DMPK (CTG)_n locus identifies saliva as a suitable DNA sample source for genetic analysis in myotonic dystrophy type 1. *PLOS ONE* 14, e0216407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216407>
- Curschmann, H., 1912. On familiar atrophic myotonia. *Dtsch Z Nervenheilkd* 161–202.
- Dandelot, E., Gourdon, G., 2018. The flash-small-pool PCR: how to transform blotting and numerous hybridization steps into a simple denatured PCR. *BioTechniques* 64, 262–265. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0035>
- De Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., Katsahian, S., Bassez, G., French Myotonic Dystrophy Clinical Network, 2016. Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.08.003>
- Delaporte, C., 1998. Personality patterns in patients with myotonic dystrophy. *Arch. Neurol.* 55, 635–640. <https://doi.org/10.1001/archneur.55.5.635>
- Dogan, C., De Antonio, M., Hamroun, D., Varet, H., Fabbro, M., Rougier, F., Amarof, K., Arne Bes, M.-C., Bedat-Millet, A.-L., Behin, A., Bellance, R., Bouhour, F., Boutte, C., Boyer, F.,

Campana-Salort, E., Chapon, F., Cintas, P., Desnuelle, C., Deschamps, R., Drouin-Garraud, V., Ferrer, X., Gervais-Bernard, H., Ghorab, K., Laforet, P., Magot, A., Magy, L., Menard, D., Minot, M.-C., Nadaj-Pakleza, A., Pellieux, S., Pereon, Y., Preudhomme, M., Pouget, J., Sacconi, S., Sole, G., Stojkovich, T., Tiffreau, V., Urtizberea, A., Vial, C., Zagnoli, F., Caranhac, G., Bourlier, C., Riviere, G., Geille, A., Gherardi, R.K., Eymard, B., Puymirat, J., Katsahian, S., Bassez, G., 2016. Gender as a Modifying Factor Influencing Myotonic Dystrophy Type 1 Phenotype Severity and Mortality: A Nationwide Multiple Databases Cross-Sectional Observational Study. *PloS One* 11, e0148264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148264>

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.

Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D., Hamshere, M.G., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res.* 29, 2766–2771.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6–13. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90418-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90418-9)

Fleischer, B., 1918. Über myotonische Dystrophie mit Katarakt. *Albrecht Von Graefes Arch. Für Ophthalmol.* 96, 91–133. <https://doi.org/10.1007/BF02018704>

Gennarelli, M., F, G.N., Bassi, A., Martorell, L., Cornet, M., Menegazzo, E., Mostacciuolo, M.L., Martinez, J.M., Angelini, C., Pizzuti, A., Baiget, M., Dallapiccola, B., 1996. Prediction of myotonic dystrophy clinical severity based on the number of intragenic [CTG]_n trinucleotide repeats. *Am. J. Med. Genet.* 65, 342–347. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19961111\)65:4<342::AID-AJMG18>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19961111)65:4<342::AID-AJMG18>3.0.CO;2-U)

Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S.I., Monckton, D.G., 2004. Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 277, 61–76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-804-8:061>

Gomes-Pereira, M., Monckton, D.G., 2017. Ethidium Bromide Modifies The Agarose Electrophoretic Mobility of CAG•CTG Alternative DNA Structures Generated by PCR. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00153>

Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., Marashdeh, M.M., Zipes, D.P., Pascuzzi, R.M., 2008. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N. Engl. J. Med.* 358, 2688–2697. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062800>

Hale, M.A., Johnson, N.E., Berglund, J.A., 2019. Repeat-associated RNA structure and aberrant

splicing. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862, 194405. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.07.006>

Hamshere, M.G., Harley, H., Harper, P., Brook, J.D., Brookfield, J.F., 1999. Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J. Med. Genet.* 36, 59–61.

Hardin, B.A., Lowe, M.R., Bhakta, D., Groh, W.J., 2003. Heart rate variability declines with increasing age and CTG repeat length in patients with myotonic dystrophy type 1. *Ann. Noninvasive Electrocardiol. Off. J. Int. Soc. Holter Noninvasive Electrocardiol. Inc* 8, 227–232. <https://doi.org/10.1046/j.1542-474x.2003.08310.x>

Hedberg, B., Anvret, M., Ansved, T., 1999. CTG-repeat length in distal and proximal leg muscles of symptomatic and non-symptomatic patients with myotonic dystrophy: relation to muscle strength and degree of histopathological abnormalities. *Eur. J. Neurol.* 6, 341–346. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.1999.630341.x>

Hehir, M.K., Logigian, E.L., 2013. Electrodiagnosis of Myotonic Disorders. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 24, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2012.08.015>

Hilbert, J.E., Barohn, R.J., Clemens, P.R., Luebke, E.A., Martens, W.B., McDermott, M.P., Parkhill, A.L., Tawil, R., Thornton, C.A., Moxley, R.T., National Registry Scientific Advisory Committee/Investigators, 2017. High frequency of gastrointestinal manifestations in myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Neurology* 89, 1348–1354. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004420>

Höltke, H.J., Ankenbauer, W., Mühlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R., Walter, T., 1995. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 41, 883–905.

Höltke, H.-J., King, K., Hoover, C., Obermaier, I., RÜger, B., Mühlegger, K., Kessler, C., 2000. Labeling and Detection of Nucleic Acids, in: Kessler, C. (Ed.), *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*, Springer Lab Manuals. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 61–93. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57206-7_4

Huang, Q., Mao, Z., Li, S., Hu, J., Zhu, Y., 2014. A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting. *Rice* 7. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0026-1>

Jean, S., Richer, L., Laberge, L., Mathieu, J., 2014. Comparisons of intellectual capacities between mild and classic adult-onset phenotypes of myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 186. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0186-5>

- Jones, C.G., 2005. A review of the history of U.S. radiation protection regulations, recommendations, and standards. *Health Phys.* 88, 105–124.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., Cooper, T.A., 2008. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20333–20338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809045105>
- Kamsteeg, E.-J., Kress, W., Catalli, C., Hertz, J.M., Witsch-Baumgartner, M., Buckley, M.F., van Engelen, B.G.M., Schwartz, M., Scheffer, H., 2012. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 1203–1208. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.108>
- Kessler, C., 1994. Non-radioactive analysis of biomolecules. *J. Biotechnol.* 35, 165–189. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90034-5)
- Khetan, D., Gupta, N., Chaudhary, R., Shukla, J.S., 2019. Comparison of UV spectrometry and fluorometry-based methods for quantification of cell-free DNA in red cell components. *Asian J. Transfus. Sci.* 13, 95–99. https://doi.org/10.4103/ajts.AJTS_90_19
- La Spada, A.R., 1997. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 7, 943–963. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1997.tb00895.x>
- Labayru, G., Aliri, J., Zulaica, M., López de Munain, A., Sistiaga, A., 2019. Age-related cognitive decline in myotonic dystrophy type 1: An 11-year longitudinal follow-up study. *J. Neuropsychol.* <https://doi.org/10.1111/jnp.12192>
- Laberge, L., Bégin, P., Dauvilliers, Y., Beaudry, M., Laforte, M., Jean, S., Mathieu, J., 2009. A polysomnographic study of daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 642–646. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.165035>
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., Junien, C., 1993. Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 875–883.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2087–2097. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W.,

- Ranum, L.P., 2001. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864–867. <https://doi.org/10.1126/science.1062125>
- Liu, Q., Zhang, P., Wang, D., Gu, W., Wang, K., 2017. Interrogating the “unsequenceable” genomic trinucleotide repeat disorders by long-read sequencing. *Genome Med.* 9, 65. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0456-7>
- Logigian, E.L., Martens, W.B., Moxley, R.T., McDermott, M.P., Dilek, N., Wiegner, A.W., Pearson, A.T., Barbieri, C.A., Annis, C.L., Thornton, C.A., Moxley, R.T., 2010. Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 74, 1441–1448. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181dc1a3a>
- Logigian, E.L., Moxley, R.T., Blood, C.L., Barbieri, C.A., Martens, W.B., Wiegner, A.W., Thornton, C.A., Moxley, R.T., 2004. Leukocyte CTG repeat length correlates with severity of myotonia in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 62, 1081–1089. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000118206.49652.a3>
- LoRusso, S., Weiner, B., Arnold, W.D., 2018. Myotonic Dystrophies: Targeting Therapies for Multisystem Disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 15, 872–884. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00679-z>
- Luu, L.M., Nguyen, L., Peng, S., Lee, J., Lee, H.Y., Wong, C.-H., Hergenrother, P.J., Chan, H.Y.E., Zimmerman, S.C., 2016. A Potent Inhibitor of Protein Sequestration by Expanded Triplet (CUG) Repeats that Shows Phenotypic Improvements in a Drosophila Model of Myotonic Dystrophy. *ChemMedChem* 11, 1428–1435. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600081>
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O’Hoy, K., et al., 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3’ untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255. <https://doi.org/10.1126/science.1546325>
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Johnson, K.J., Gich, I., de Munain, A.L., Baiget, M., 1998. Progression of Somatic CTG Repeat Length Heterogeneity in the Blood Cells of Myotonic Dystrophy Patients. *Hum. Mol. Genet.* 7, 307–312. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.307>
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prévost, C., Bégin, P., 1999. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 1658–1662. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.8.1658>
- McNally, E.M., Sparano, D., 2011. Mechanisms and management of the heart in Myotonic Dystrophy. *Heart Br. Card. Soc.* 97, 1094–1100. <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.214197>

- Melacini, P., Villanova, C., Menegazzo, E., Novelli, G., Danieli, G., Rizzoli, G., Fasoli, G., Angelini, C., Buja, G., Miorelli, M., Dallapiccola, B., Volta, S.D., 1995. Correlation between cardiac involvement and CTG trinucleotide repeat length in myotonic dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25, 239–245. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)00351-P](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)00351-P)
- Meola, G., Cardani, R., 2015. Myotonic Dystrophy Type 2: An Update on Clinical Aspects, Genetic and Pathomolecular Mechanism. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, S59–S71. <https://doi.org/10.3233/JND-150088>
- Miller, B.R., Wei, T., Fields, C.J., Sheng, P., Xie, M., 2018. Near-infrared fluorescent northern blot. *RNA N. Y. N* 24, 1871–1877. <https://doi.org/10.1261/rna.068213.118>
- Mnatsakanian, A., Kissel, J.T., Terry, P., King, W.M., 2017. One clinic’s experience with carbon fiber orthoses in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 55, 202–205. <https://doi.org/10.1002/mus.25233>
- Monckton, D.G., Wong, L.J., Ashizawa, T., Caskey, C.T., 1995. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.1.1>
- Morales, F., Couto, J.M., Higham, C.F., Hogg, G., Cuenca, P., Braidia, C., Wilson, R.H., Adam, B., del Valle, G., Brian, R., Sittenfeld, M., Ashizawa, T., Wilcox, A., Wilcox, D.E., Monckton, D.G., 2012. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3558–3567. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds185>
- Mullard, A., 2021. Antibody–oligonucleotide conjugates enter the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 6–8. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00213-5>
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J., Havlovicova, M., Sedlacek, Z., 2009. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 149A, 1365–1374. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32987>
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J., Heatwole, C.R., McDermott, M.P., Chen, T., Cline, M., Tawil, R., Osborne, R.J., Wheeler, T.M., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2013. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy: Splicing Biomarkers of DM. *Ann. Neurol.* 74, 862–872. <https://doi.org/10.1002/ana.23992>
- Nguyen, L., Luu, L.M., Peng, S., Serrano, J.F., Chan, H.Y.E., Zimmerman, S.C., 2015. Rationally Designed Small Molecules That Target Both the DNA and RNA Causing Myotonic Dystrophy

- Type 1. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 14180–14189. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09266>
- Okkersen, K., Buskes, M., Groenewoud, J., Kessels, R.P.C., Knoop, H., van Engelen, B., Raaphorst, J., 2017a. The cognitive profile of myotonic dystrophy type 1: A systematic review and meta-analysis. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* 95, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.08.008>
- Okkersen, K., Jimenez-Moreno, C., Wenninger, S., Daidj, F., Glennon, J., Cumming, S., Littleford, R., Monckton, D.G., Lochmüller, H., Catt, M., Faber, C.G., Hapca, A., Donnan, P.T., Gorman, G., Bassez, G., Schoser, B., Knoop, H., Treweek, S., van Engelen, B.G.M., OPTIMISTIC consortium, 2018. Cognitive behavioural therapy with optional graded exercise therapy in patients with severe fatigue with myotonic dystrophy type 1: a multicentre, single-blind, randomised trial. *Lancet Neurol.* 17, 671–680. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30203-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30203-5)
- Okkersen, K., Monckton, D.G., Le, N., Tuladhar, A.M., Raaphorst, J., Engelen, B.G.M. van, 2017b. Brain imaging in myotonic dystrophy type 1: A systematic review. *Neurology* 89, 960–969. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004300>
- Ørngreen, M.C., Arlien-Søborg, P., Duno, M., Hertz, J.M., Vissing, J., 2012. Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol.* 259, 912–920. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6277-5>
- Overend, G., Légaré, C., Mathieu, J., Bouchard, L., Gagnon, C., Monckton, D.G., 2019. Allele length of the DMPK CTG repeat is a predictor of progressive myotonic dystrophy type 1 phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* 28, 2245–2254. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz055>
- Parmova, O., 2014. The Character and Frequency of Muscular Pain in Myotonic Dystrophy and Their Relationship to Myotonia. *Int. J. Neurol. Neurother.* 1. <https://doi.org/10.23937/2378-3001/1/1/1009>
- Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., Cleary, J.D., 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 6, 729–742. <https://doi.org/10.1038/nrg1689>
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.737>
- Pollard-Knight, D., Simmonds, A.C., Schaap, A.P., Akhavan, H., Brady, M.A., 1990. Nonradioactive DNA detection on Southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 185, 353–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90307-u](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90307-u)

- Pratte, A., Prévost, C., Puymirat, J., Mathieu, J., 2015. Anticipation in myotonic dystrophy type 1 parents with small CTG expansions. *Am. J. Med. Genet. A.* 167A, 708–714. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36950>
- Provenzano, C., Cappella, M., Valaperta, R., Cardani, R., Meola, G., Martelli, F., Cardinali, B., Falcone, G., 2017. CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of CTG Expansions Recovers Normal Phenotype in Myogenic Cells Derived from Myotonic Dystrophy 1 Patients. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 9, 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.10.006>
- Ranum, L.P.W., Cooper, T.A., 2006. RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 259–277. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113014>
- Redman, J.B., Fenwick, R.G., Fu, Y.H., Pizzuti, A., Caskey, C.T., 1993. Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA* 269, 1960–1965.
- Ricker, K., Koch, M.C., Lehmann-Horn, F., Pongratz, D., Otto, M., Heine, R., Moxley, R.T., 1994. Proximal myotonic myopathy: A new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology* 44, 1448–1448. <https://doi.org/10.1212/WNL.44.8.1448>
- Rio, D.C., 2014. Northern blots for small RNAs and microRNAs. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 793–797. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot080838>
- Rohilla, K.J., Gagnon, K.T., 2017. RNA biology of disease-associated microsatellite repeat expansions. *Acta Neuropathol. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0468-y>
- Romigi, A., Albanese, M., Liguori, C., Placidi, F., Marciani, M.G., Massa, R., 2013. Sleep-Wake Cycle and Daytime Sleepiness in the Myotonic Dystrophies [WWW Document]. *J. Neurodegener. Dis.* <https://doi.org/10.1155/2013/692026>
- Rönblom, A., Forsberg, H., Danielsson, A., 1996. Gastrointestinal symptoms in myotonic dystrophy. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 654–657. <https://doi.org/10.3109/00365529609009145>
- Rubinsztein, J.S., Rubinsztein, D.C., Goodburn, S., Holland, A.J., 1998. Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 510–515. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.4.510>
- Rzuczek, S.G., Colgan, L.A., Nakai, Y., Cameron, M.D., Furling, D., Yasuda, R., Disney, M.D., 2017. Precise small-molecule recognition of a toxic CUG RNA repeat expansion. *Nat. Chem. Biol.* 13, 188–193. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2251>
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for

diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
<https://doi.org/10.1126/science.2999980>

Savić Pavićević, D., Miladinović, J., Brkušanić, M., Šviković, S., Djurica, S., Brajušković, G., Romac, S., 2013. Molecular Genetics and Genetic Testing in Myotonic Dystrophy Type 1. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/391821>

Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47. <https://doi.org/10.1038/ng704>

Schara, U., Schoser, B.G.H., 2006. Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin. Pediatr. Neurol.* 13, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.spn.2006.06.002>

Schneider-Gold, C., Grimm, T., Kress, W., Schoser, B., 2010. Myotone Dystrophien. *Aktuelle Neurol.* 37, 348–359. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1248592>

Schneider-Gold, C., Schoser, B., Ellrichmann, G., Quasthoff, S., Lehmann-Horn, F., Sinnreich, M., 2018. Myotone Dystrophien, nicht dystrophe Myotonien und periodische Paralysen. *Aktuelle Neurol.* 45. <https://doi.org/10.1055/s-0043-125352>

Schoser, B., 2006. Myotonic Dystrophy Type 2, in: Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A. (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).

Sicot, G., Gourdon, G., Gomes-Pereira, M., 2011. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum. Mol. Genet.* 20, R116-123. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr343>

Smith, C.A., Gutmann, L., 2016. Myotonic Dystrophy Type 1 Management and Therapeutics. *Curr. Treat. Options Neurol.* 18, 52. <https://doi.org/10.1007/s11940-016-0434-1>

Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0)

Steinert, H., 1909. On the clinical and anatomical picture of myotonic muscle weakening. *Dtsch Z Nervenheilkd* 58–104.

The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC), 2000. New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology* 54, 1218. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.6.1218>

Theadom, A., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Balalla, S., Higgins, C., Bhattacharjee, R., Jones, K.,

- Krishnamurthi, R., Feigin, V., 2014. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology* 43, 259–268. <https://doi.org/10.1159/000369343>
- Thil, C., Agrinier, N., Chenuel, B., Poussel, M., 2017. Longitudinal course of lung function in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve* 56, 816–818. <https://doi.org/10.1002/mus.25604>
- Thornton, C.A., 2014. Myotonic dystrophy. *Neurol. Clin.* 32, 705–719, viii. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.011>
- Thornton, C.A., Johnson, K., Moxley, R.T., 1994. Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann. Neurol.* 35, 104–107. <https://doi.org/10.1002/ana.410350116>
- Thornton, C.A., Wang, E., Carrell, E.M., 2017. Myotonic dystrophy: approach to therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 44, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.007>
- Tian, B., White, R.J., Xia, T., Welle, S., Turner, D.H., Mathews, M.B., Thornton, C.A., 2000. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 6, 79–87.
- Tomé, S., Gourdon, G., 2020. DM1 Phenotype Variability and Triplet Repeat Instability: Challenges in the Development of New Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21020457>
- Tomé, S., Nicole, A., Gomes-Pereira, M., Gourdon, G., 2014. Non-radioactive detection of trinucleotide repeat size variability. *PLoS Curr.* 6. <https://doi.org/10.1371/currents.md.ad50113b899fa1352ce70c087ead706>
- Treangen, T.J., Salzberg, S.L., 2012. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 13, 36–46. <https://doi.org/10.1038/nrg3117>
- Turner, C., Hilton-Jones, D., 2014. Myotonic dystrophy: diagnosis, management and new therapies. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 599–606. <https://doi.org/10.1097/WCO.000000000000128>
- Turner, C., Hilton-Jones, D., 2010. The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 358–367. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.158261>
- Udd, B., Krahe, R., 2012. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 11, 891–905. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70204-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70204-1)
- Udd, B., Meola, G., Krahe, R., Thornton, C., Ranum, L., Day, J., Bassez, G., Ricker, K., 2003. Report of the 115th ENMC workshop: DM2/PROMM and other myotonic dystrophies: 3rd

- Workshop, 14–16 February 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 13, 589–596. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(03\)00092-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(03)00092-0)
- Urban, A., Neukirchen, S., Jaeger, K.-E., 1997. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 25, 2227–2228. <https://doi.org/10.1093/nar/25.11.2227>
- Viterbo, D., Marchal, A., Mosbach, V., Poggi, L., Vaysse-Zinkhöfer, W., Richard, G.-F., 2018. A fast, sensitive and cost-effective method for nucleic acid detection using non-radioactive probes. *Biol. Methods Protoc.* 3. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpy006>
- Voermans, N.C., Erasmus, C.E., Ockeloen, C.W., Van Engelen, B.G., Eggink, C.A., 2015. Primary cataract as a key to recognition of myotonic dystrophy type 1. *Eur. J. Ophthalmol.* 25, e46-49. <https://doi.org/10.5301/ejo.5000565>
- Voet, N.B.M., van der Kooi, E.L., Riphagen, I.I., Lindeman, E., van Engelen, B.G.M., Geurts, A.C.H., 2013. Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003907. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003907.pub4>
- Walz, M., Wucherer, M., Loose, R., 2019. [What are the implications of the new radiation protection ordinance?]. *Radiol.* 59, 457–466. <https://doi.org/10.1007/s00117-019-0508-7>
- Warner, J.P., Barron, L.H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D.R., Brock, D.J., 1996. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 33, 1022–1026.
- Wenninger, S., Montagnese, F., Schoser, B., 2018. Core Clinical Phenotypes in Myotonic Dystrophies. *Front. Neurol.* 9, 303. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00303>
- Wheeler, T.M., Sobczak, K., Lueck, J.D., Osborne, R.J., Lin, X., Dirksen, R.T., Thornton, C.A., 2009. Reversal of RNA Dominance by Displacement of Protein Sequestered on Triplet Repeat RNA. *Science* 325, 336–339. <https://doi.org/10.1126/science.1173110>
- Winblad, S., Lindberg, C., Hansen, S., 2006. Cognitive deficits and CTG repeat expansion size in classical myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Behav. Brain Funct.* 2, 16. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-2-16>
- Winblad, S., Lindberg, C., Hansen, S., 2005. Temperament and character in patients with classical myotonic dystrophy type 1 (DM-1). *Neuromuscul. Disord.* NMD 15, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.12.003>
- Yoshida, K., Aburakawa, Y., Suzuki, Y., Kuroda, K., Kimura, T., 2018. The Frequency and Risk Factors for Ischemic Stroke in Myotonic Dystrophy Type 1 Patients. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*

Off. J. Natl. Stroke Assoc. 27, 914–918.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.030>

Yum, K., Wang, E.T., Kalsotra, A., 2017. Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 44, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.007>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Benedikt Schoser für die Möglichkeit, unter seiner hervorragenden und stets konstruktiven Betreuung meine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Stefan Hintze für die ausgezeichnete methodische und stets motivierende Unterstützung sowie fachliche Betreuung in jeder Phase meiner Dissertation.

Herrn Dr. rer. med. Peter Meinke danke ich für die fachliche Betreuung und die wertvollen Anregungen, die wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Myologie sowie des Myologischen Labors im Friedrich-Baur-Institut für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden für die enorme Unterstützung, die Geduld und den Rückhalt während meines gesamten Studiums und der Anfertigung meiner Dissertation.

Eidesstattliche Erklärung

Mensel, Raphaela Victoria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Nicht-radioaktiver Nachweis von CTG-Repeats in Muskelgewebe von Patienten mit myotoner Dystrophie Typ 1“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, 14.03.2022

Raphaela Victoria Mensel

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand