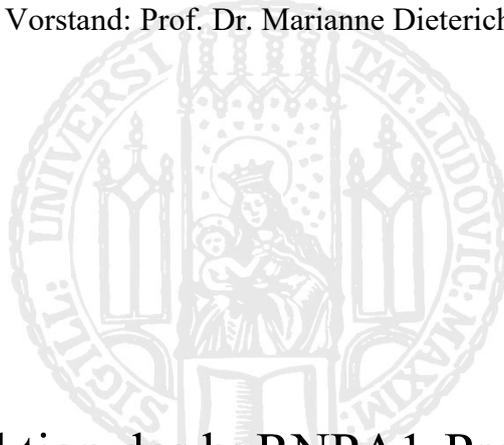


Aus dem Friedrich-Baur-Institut
Neurologische Klinik und Poliklinik,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Marianne Dieterich



Die Funktion des hnRNPA1-Proteins bei der hereditären Multisystemproteinopathie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Johannes Gerhard Vogel

aus

Karlsruhe

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. Dr. Sabine Krause

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Müller-Felber
Priv.Doz. Dr. Matthias Elstner

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2022

Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen und veröffentlicht in:

23. Kongress des Medizinisch-Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke (DGM) e.V. (16.02.2017 – 18.02.2017), München

hnRNPA1-Genmutation als Ursache einer dominanten hIBM

Johannes G. Vogel, Sabine Krause, Marina Dusl, Anna Fidziańska, Benedikt Schoser

Für dieses Flash-Poster wurde der Posterpreis der DGM 2017 verliehen.

Publikationsverzeichnis

Dusl, M., Senderek, J., Müller, J. S., **Vogel, J. G.**, Pertl, A., Stucka, R., Lochmüller, H., David, R., & Abicht, A. (2015). A 3'-UTR mutation creates a microRNA target site in the GFPT1 gene of patients with congenital myasthenic syndrome. *Human molecular genetics*, 24(12), 3418–3426. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv090>

Jasnic-Savovic, J., Krause, S., Savic, S., Kojic, A., Kovcic, V., Boskovic, S., Nestorovic, A., Rakicevic, L., Schreiber-Katz, O., **Vogel, J. G.**, Schoser, B. G., Walter, M. C., Valle, G., Radjkovic, D., Faulkner, G., & Kojic, S. (2016). Differential expression and localization of Ankrd2 isoforms in human skeletal and cardiac muscles. *Histochemistry and cell biology*, 146(5), 569–584. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1465-0>

Für meine Familie

Abstract/Zusammenfassung

Die von Kim (Kim et al., 2013) publizierte Beobachtung, dass Mutationen in *HNRNP*-Genen Multisystemproteinopathien mit Einschlusskörpermyopathie oder Amyotropher Lateralsklerose auslösen können, ergab eine neue Sichtweise auf mögliche Pathomechanismen bei IBM (inclusion body myopathy). Die hereditäre Inclusion Body Myopathy (hIBM) kommt sowohl autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv vor. Sie kann phänotypisch und muskelbiopisch nicht von der sporadischen IBM (sIBM) unterschieden werden, so dass sich die Frage stellte, ob *HNRNPA1*-Genvarianten der Pathogenese bei weiteren IBM-Patienten zugrunde liegen.

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen defekten *HNRNP*-Genen und verschiedenen Varianten der Multisystemproteinopathien. Dafür wurde ein molekulargenetisches Screening im *HNRNPA1*-Gen von 196 Patienten mit einer degenerativen Muskelerkrankung im Sinne einer IBM oder einer ungeklärten Motoneuronenerkrankung mittels PCR-Amplifikation kodierender Exons und flankierender intronischer Bereiche mit Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

Im Screening fand sich bei einem Patienten eine Sequenzvariante im Exon 9 des *HNRNPA1*-Gens auf Chr. 12q13.13 mit dem Basenaustausch c.784G>A und dem daraus resultierenden Aminosäureaustausch p.D262N. Verglichen wurden die Sequenzen mit der Referenzsequenz NM_002136.4 (NCBI). Durch Einführen der identifizierten Mutation mit dem Basenaustausch c.784G>A mittels ortsgerichteter Mutagenese in die *HNRNPA1*-cDNA WT-Sequenz im Plasmid TrueORF Gold und anschließender transienter Transfektion von p.D262N-Mutante und Wildtyp in Mausmyoblasten (C2C12) wurde der Effekt der Sequenzvariante in der Zellkultur überprüft. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine Lokalisation am Rand des Zellkerns und im Zytoplasma sowie eine Co-Lokalisation mit eIF4G-positiven Aggregaten (Eukaryotic translation initiation factor 4 G), was beim Wildtyp nicht beobachtet werden konnte. Ein anti-eIF4G Antikörper wurde als Marker für Stressgranula eingesetzt. Zudem waren die hnRNPA1(D262N)/eIF4G-positiven Aggregate viel größer als Proteinakkumulationen in C2C12-Zellen, die mit dem wt-hnRNPA1-Konstrukt transfiziert wurden. Im Westernblot zeigte sich eine vergleichbare Proteinexpression von eIF4G sowie von hnRNPA1-Wildtyp und -Mutante.

Aus einer Kohorte von 196 Patienten mit degenerativen neuromuskulären Erkrankungen konnte ein hIBM-Patient mit neuer Sequenzvariante in *HNRNPA1* identifiziert werden. Funktionelle

Analysen im C2C12-Zellkulturmodell konnten nach transienter Expression der hnRNPA1-Mutante *in vitro* pathologische, aberrante Proteinaggregation von hnRNPA1 zeigen. Der pathogene Effekt wurde sowohl qualitativ mittels Immunfluoreszenzmikroskopie als auch quantitativ im Westernblot bestätigt. Weitere Experimente sollen die Kinetik der Aggresombildung und mögliche molekulare Therapieansätze im C2C12-Zellkulturmodell untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Überblick Multisystemproteinopathie	1
1.2 Klinische Symptomatik der Multisystemproteinopathie.....	3
1.3 Die Struktur des <i>HNRNPA1</i> -Gens	4
1.4 Die Struktur und die Funktion des hnRNPA1 Proteins	5
2 Zielsetzung	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Patienten und Untersuchungsmaterial.....	11
3.2 Chemikalien.....	11
3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaktion).....	11
3.3.1 Prinzip der PCR.....	11
3.3.2 Reaktionsbedingungen	12
3.3.3 Primer.....	12
3.4 Gelelektrophorese und Amplifikatextraktion aus Agarosegel	13
3.5 Sequenzanalyse.....	14
3.6 Mutagenese und Klonierung	14
3.6.1 Einführen der Mutation Ex 9 c.784 G>A p.D262N in den Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK	14
3.6.2 Primerdesign Mutagenese:	17
3.6.3 Ligation	17
3.7 Transformation von Plasmid DNA in <i>E. coli</i>	18
3.8 Bakterienkultur	19
3.8.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	19
3.8.2 DNA-Mengenbestimmung	20
3.9 Zellkultur.....	20

3.9.1	Transfektion.....	21
3.9.2	Färbung und Immunfluoreszenz.....	21
3.9.3	Proteinaufbereitung für Westernblot und Proteinbestimmung.....	22
3.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Westernblot	22
3.11	Antikörper	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Klinische und molekulargenetische Analyse des <i>HNRNPA1</i> -Gens	24
4.1.1	Analyse der Indexfamilie	26
4.1.2	Klinische Untersuchungsbefunde	27
4.1.3	Laborchemische Befunde.....	27
4.1.4	Befunde apparativer Untersuchungen.....	30
4.1.5	Histologische Charakterisierung.....	32
4.1.6	Sequenzanalyse.....	36
4.2	Funktionelle Analyse der Mutation <i>hnRNPA1</i> D262N.....	38
4.2.1	Westernblotanalyse.....	41
4.2.2	Immunfluoreszenzanalyse.....	43
5	Diskussion	47
5.1	Genotypen der Multisystemproteinopathie	47
5.2	Klinische Symptomatik bei Multisystemproteinopathie.....	48
5.2.1	Körperliche Unteruchung.....	48
5.2.2	Laboranalyse.....	49
5.2.3	Apparative Diagnostik	49
5.2.4	Histologische Analyse.....	53
5.3	Einordnung der molekulargenetischen und zellbiologischen Untersuchung des <i>HNRNPA1</i> -Gens	54
5.3.1	Mutationen im <i>HNRNPA1</i> -Gen.....	54

5.3.2	Westernblot-Ergebnisse und Immunfluoreszenzfärbung zeigen eine Bildung von Stressgranula.....	54
5.4	Ausblick	57
6	Literaturverzeichnis	59
7	Anhang	75
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	75
7.2	Tabellenverzeichnis	75
7.3	Abkürzungsverzeichnis	76
7.4	GenBank Zugangsnummern.....	78
	Eidesstattliche Versicherung.....	81
	Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung.....	83

1 Einleitung

1.1 Überblick Multisystemproteinopathie

Die Multisystemproteinopathie (MSP) ist eine erbliche polyphäne degenerative Erkrankung, welche hauptsächlich die Knochen, Muskeln und das Nervensystem betrifft. Die Erstbeschreibung erfolgte als familiäre Motoneuronerkrankung in Zusammenhang mit Morbus Paget (PDB). Die Multisystemproteinopathie zeigt ebenfalls als Phänotyp die Einschlusskörpermyositis (IBM) oder frontotemporale Demenz (FTD). Das Akronym „IBMPFD“ beschreibt Familien mit dem entsprechenden Syndrom der Einschlusskörpermyositis, des Morbus Pagets und der frontotemporalen Demenz (Inclusion body myopathy with M. Paget and frontotemporal dementia). Seitdem jedoch ebenfalls weitere phänotypische Eigenschaften im klinischen Beschwerdebild der Patienten im Vordergrund stehen ist die Bezeichnung etwas in den Hintergrund getreten. Das Symptomenspektrum ist sehr heterogen und reicht von Symptomen des M. Parkinson und peripherer Neuropathie, welche eher selten sind, bis zu Dysfunktion der Motoneuronen, welche er häufiger ist (11 von 17 Multisystemproteinopathien in einer Serie). Eine gängige Definition von Multisystemproteinopathien ist eine Kombination aus zwei oder mehr Symptomen wie hereditäre Einschlusskörpermyositis, Morbus Paget und amyotrophe Lateralsklerose (ALS)/frontotemporale Demenz (FTD), wobei ALS und FTD als ein Spektrum betrachtet werden. Pathologisch zeigt das Gewebe einer Multisystemproteinopathie Ubiquitin-positive Einschlüsse, welche RNA-Bindeproteine wie zum Beispiel TDP-43, hnRNPA1, und hnRNPA2B1 beinhalten. Außerdem zeigen die Einschlusskörperchen eine positive Färbung für regulierende Proteine der Ubiquitin-abhängige Autophagie wie zum Beispiel p62/SQSTM1, UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosaminekinase (*VCP*-Gen), Optineurin und Ubiquilin-2 (Taylor, 2015).

Tabelle 1 Multisystemproteinopathien mit vergesellschafteten Genen und die assoziierten Erkrankungen (Taylor, 2015)

Gen	Funktion	Syndrom	Assoziierte Phänotypen	Krankhaftes Protein, in den Einschlusskörperchen nachgewiesen
<i>VCP</i>	Ubiquitin-abhängige Segregase	Multisystemproteinopathie 1	Myopathie, Demenz, Motoneuronerkrankung, Morbus Paget	ja
<i>HNRNPA2B1</i>	RNA-Bindeprotein	Multisystemproteinopathie 2	Myopathie, Demenz, Motoneuronerkrankung, Morbus Paget	ja
<i>HNRNPA1</i>	RNA-Bindeprotein	Multisystemproteinopathie 3	Myopathie, Motoneuronerkrankung, Morbus Paget	ja
<i>SQSTM1</i>	Ubiquitin-abhängige Autophagie	Multisystemproteinopathie 4	Myopathie, Demenz, Motoneuronerkrankung, Morbus Paget	ja
<i>MATR3</i>	RNA-Bindeprotein	Multisystemproteinopathie 5	Myopathie, Motoneuronerkrankung	ja
<i>HNRNPDL</i>	RNA-Bindeprotein	Gliedergürteldystrophie	Myopathie	ja
<i>TIA1</i>	RNA-Bindeprotein	distale Myopathie	Myopathie	ja
<i>TARDBP</i>	RNA-Bindeprotein	amyotrophe Lateralsklerose/frontotemporale Demenz	Motoneuronerkrankung, Demenz	ja
<i>FUS</i>	RNA-Bindeprotein	amyotrophe Lateralsklerose/frontotemporale Demenz	Motoneuronerkrankung, Demenz	ja
<i>OPTN</i>	Ubiquitin-abhängige Autophagie	amyotrophe Lateralsklerose	Demenz, Motoneuronerkrankung, Morbus Paget	ja
<i>UBQLN2</i>	Ubiquitin-abhängige Autophagie	amyotrophe Lateralsklerose	Motoneuronerkrankung	ja

1.2 Klinische Symptomatik der Multisystemproteinopathie

Die Multisystemproteinopathie bezieht sich auf einige Symptome aus hereditärer Einschlusskörpermyositis, Morbus Paget und amyotrophe Lateralsklerose (ALS)/frontotemporale Demenz (FTD).

Dabei liegt ein mehrheitlich autosomal rezessiver oder, eher selten, ein autosomal dominanter Erbgang vor. Es sind unterschiedliche Manifestationsalter und Phänotypen beschrieben, wobei ein langsam progredienter Erkrankungsbeginn in der ca. 2. bis 3. Lebensdekade als charakteristisch gilt. Die drei klinischen Leitsymptome der IBMPFD haben eine unterschiedliche genetische Penetranz. Während 90% der Patienten eine Muskelschwäche entwickeln (Leitsymptome bei mehr als der Hälfte der Patienten), zeigen ungefähr 50% der Patienten osteolytische Knochenläsionen, welche mit einem Morbus Paget (PDB) vereinbar sind. Nur ein Drittel der Patienten entwickelt eine frontotemporale Demenz (FTD). Ungefähr 30% der Patienten mit IBMPFD zeigen klinisch nur eine Myopathie, weshalb es bei frühen klinischen Anamneseerhebungen der Status der Familienmitglieder des Patienten bezüglich des Vorhandenseins von Demenz oder Morbus Paget unabdingbar ist (Broccolini & Mirabella, 2015).

Es wurde ebenfalls von anderen phänotypischen Eigenschaften wie dilatative Kardiomyopathie, hepatische Steatose, Katarakt, sensorisch-motorische axonale Neuropathie, Funktionsstörung der Pyramidenbahnen, Störung der Sphinktermuskulatur, sensorischer Hörverlust sowie Symptome der amyotrophen Lateralsklerose berichtet (Weihl, 2011).

Klinisch ist hier eine Fußheberparese typisch, welche sich nach proximal ausbreitet und den Musculus quadriceps femoris relativ ausspart. Die Beteiligung der Muskeln ist jedoch variabel und so zeigt ein Großteil der Patienten eine Schwäche fokussiert auf den Gliedergürtel. Eine axiale Schwäche mit „Head-drop“ wurde ebenfalls beschrieben. Die Serum CK ist gewöhnlich normal oder leicht erhöht. Das EMG zeigt myopathische Veränderungen im Sinne von Fibrillationspotentialen und positiven Sharp waves (Watts et al., 2007). Histologisch weist die Muskulatur vorrangig vakuoläre Veränderungen auf, ohne jedoch entzündliche Veränderungen zu zeigen.

Die Einschlusskörpermyopathie (IBM) soll hier besonders hervorgehoben werden. Sie präsentiert sich in den meisten Fällen klassisch mit einer schleichenden Schwäche der proximalen Beinmuskulatur und/oder distalen Armmuskulatur. Hier sind insbesondere eine langsam progrediente M. quadriceps femoris Schwäche sowie Hüftbeugerschwäche, was zu einer Sturznei-

gung, Gangunsicherheit sowie Standschwierigkeiten führt, und eine Schwäche der Fingerbeuger, was zu einer starken Einschränkung der Geschicklichkeit führt, zu nennen. Die Schwäche der Handmuskulatur ist asymmetrisch mit Beginn in den distalen phalangealen Flexoren, unter Aussparung des Thenar, Hypothenar und der Fingerextensoren, der nicht-dominanten Hand. Die kann als differentialdiagnostisches Kriterium zu (symmetrischen) Motoneuronkrankheiten wie z.B. ALS oder fokalen motorischen Ausfällen einer multiplen Mononeuropathie wie z.B. der multifokalen motorischen Neuropathie (Dimachkie & Barohn, 2014). Zwischen dem Auftreten der Symptome und der Diagnose IBM vergehen im Schnitt fünf bis acht Jahre.

1.3 Die Struktur des *HNRNPA1*-Gens

Das Gen gehört zur Familie der ubiquitär exprimierten heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) welche als RNA-bindende Proteine u.a. besonders mit der pre-mRNA im Nukleus assoziiert sind. Außerdem sind sie am mRNA-Metabolismus und mRNA-Transport beteiligt. Das Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 12 in der zytogenetischen Bande 12q13.13 und umfasst 6896 Basen. Die quantitativ häufigste Expression findet sich in absteigender Reihenfolge im Ovar, Knochenmark, Lymphknoten, Endometrium, Appendix, Plazenta und Colon. Im zentralen und peripheren Nervensystem zeigen in absteigender Reihenfolge das Großhirn, das Kleinhirn, die peripheren Nerven und das Rückenmark die größte Expression an mRNA (Fagerberg et al., 2014).

Die N-terminale Region des Gens, auch Unwinding Protein 1 (UP1) genannt, ist aus zwei eng miteinander verbundenen RNA Erkennungsmotiven (RRM) zusammengesetzt, welche von einer C-terminalen glycinreichen Region gefolgt wird (Barraud & Allain, 2013).

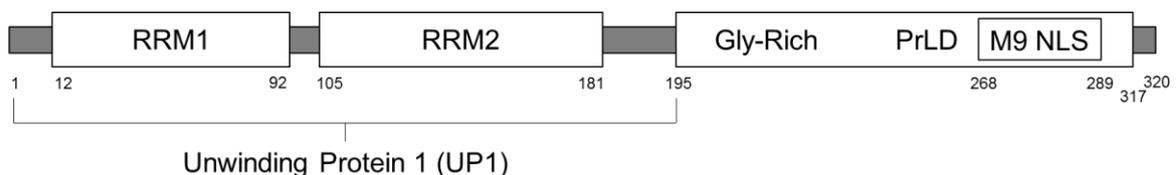


Abbildung 1 Struktur des *HNRNPA1*-Gens (Barraud & Allain, 2013; Kim et al., 2013)

Genvarianten der prion-like domain (PrLD) des *HNRNPA1*-Gens führen zu einer Multisystemproteinopathie, insbesondere Einschlusskörpermyositis mit Early-Onset Morbus Paget mit oder ohne Frontotemporale Demenz 3 (IBMPFD3), und amyotrophe Lateralsklerose (Kim et al., 2013).

1.4 Die Struktur und die Funktion des hnRNPA1 Proteins

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) ist ein Mitglied der A/B Unterfamilie von ubiquitär exprimierten hnRNPs. Ursprünglich wurden die hnRNPA/B Proteine über zwei niedermolekulare Proteinpräparationen aus „Kern“-hnRNP-Partikel von HeLa-Zellen charakterisiert. Später wurden mehrere verwandte (sequenzhomologe) Proteine dieser Familie hinzugefügt. HnRNPs sind, zusammen mit den Histonen, die am meistverbreiteten Proteine im Zellkern, und hnRNPA1 und hnRNPA2 haben allein einen Anteil von 60% an der Proteing Gesamtmasse an hnRNPs in der Zelle. Die bisher bekannten Hauptfunktionen von hnRNPA1 sind die posttranskriptionale Regulation (Interaktion mit Haarnadelstruktur der pri-miRNA), die Wirkung als Transkriptionsfaktor, es ist ein Teil des Spliceosomes und es übernimmt den Transport von mRNA mit Poly(A)-Schwanz in das Zytoplasma durch die Kernporen des Zellkerns (NPC). HnRNPA1 besitzt hierfür eine bidirektionale Transportdomäne. Es enthält ein nukleäres Exportsignal (NES) für den Kernexport der gebundenen mRNA und eine Importdomäne M9, welche in Verbindung mit Varianten des Transportins (Trn1, Trn2b vs. Trn2a) den Kernimport, u. a. auch von Proteinen, regulieren kann (Rebane et al., 2004). Weiterhin wurde hnRNPA1 an der Translationsseite in Polysomen nachgewiesen, wo es möglicherweise mit anderen RNA-Bindeproteinen interagiert. Veränderung an der Konzentration oder an post-transkriptionellen Modifikationen der hnRNPs zeigten Regulierungseffekte im RNA Metabolismus (Bekenstein & Soreq, 2013), Zellentwicklung (Singh & Lakhotia, 2012), Krebs (Patry et al., 2003) und neurodegenerative Erkrankungen (Berson et al., 2012; Lee et al., 2011).

hnRNPA1 besitzt ein Molekulargewicht von 38,747 Da und die Isoform des Proteins hnRNPA1-A ist zwanzig Mal häufiger als die Isoform hnRNPA1-B. Die post-translationalen Modifikationen umfassen eine Demethylierung an den Argininen Arg-194, Arg-206 und Arg-225, eine Sumoylierung und eine Ubiquitylierung. Die Ubiquitylierungsstellen finden sich an den Lysinen Lys3, Lys8, Lys78 und Lys350.

Eukaryontische mRNAs werden als prä-mRNAs transkribiert und enthalten dabei intragene Regionen (Introns) welche beim Splicing entfernt werden wodurch die flankierenden kodierenden

Abschnitte (Exons) zur reifen mRNA zusammengeführt werden. Neben den konstitutionellen Splicing entsteht beim alternativen Splicing eine abweichende mRNA welche für bestimmte Proteine kodiert und die Proteinviefalt erhöht. Für ein effizientes Splicing ist für die meisten Intros eine konservierte 5'Splice Stelle, eine spezielle Sequenz als Verzweigungspunkt gefolgt von einem Polypyrimidine-Abschnitt und eine 3'Splice Stelle erforderlich. Zusätzlich werden die flankierenden Introns oder andere Signalsequenzen entlang der alternativ gesplizierten Exons von zwei großen Proteinfamilien markiert, die letztendlich das alternative Splicing regulieren: die SR-Proteinfamilie (Serin-Arginin Proteinfamilie) und die hnRNP Familie (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein Familie).

Die hnRNP Proteinfamilie besteht aus 20 Proteinen beim Homo sapiens, welche als Teil eines Proteinkomplexes an die prä-mRNA gebunden sind. Die meisten Proteine der hnRNP Familie beinhalten mindestens eine Domäne (eine Domäne bei hnRNP C, vier Domänen bei hnRNP I). Außerdem enthalten sie zusätzliche Domänen, wie glycinreiche Domänen oder aspartat-glutamatreiche Domänen, welche entweder zur Erkennung der RNA dienen und/oder die Protein/Protein Interaktion regulieren (Barraud & Allain, 2013).

Obwohl die Kristallstruktur von UP1 nahelegt, dass es eine „inter-domain“ Interaktion zwischen RRM1 und RRM2 in der freien und in der gebundenen Form gibt, wurde diese Interaktion noch nie in Lösung nachgewiesen. Des Weiteren ist die relative Orientierung der hnRNPA1 RRMs in Abhängigkeit zur freien und zur gebundenen Kristallstruktur von UP1 unterschiedlich. Es konnte gezeigt werden, dass die hnRNPA1 RRMs in Lösung miteinander interagieren und sich die relative Orientierung in Lösung überraschenderweise von der in der Kristallstruktur des freien UP1 unterscheidet. In Lösung zeigt sich die gleiche relative Orientierung der RRMs wie jene der Kristallstruktur in der nukleinsäuregebundenen Form des Proteins (Barraud & Allain, 2013).

Proteine, die mehrere RRM Domänen tragen haben mehrere Möglichkeiten der Nukleinsäureerkennung. Da die Domänen asymmetrische Bindungsstellen sind, wird die Art der Nukleinsäurebindung stark durch die relative Orientierung der verschiedenen RRMs, welche durch die gebundenen Proteine entsteht, beeinflusst.

Im Fall von hnRNPA1 interagieren die RNA-erkennenden Motive derartig, dass sie eine diskontinuierliche antiparallele Plattform schaffen, welche in der proteingebundenen Form dieselbe relative Orientierung behält.

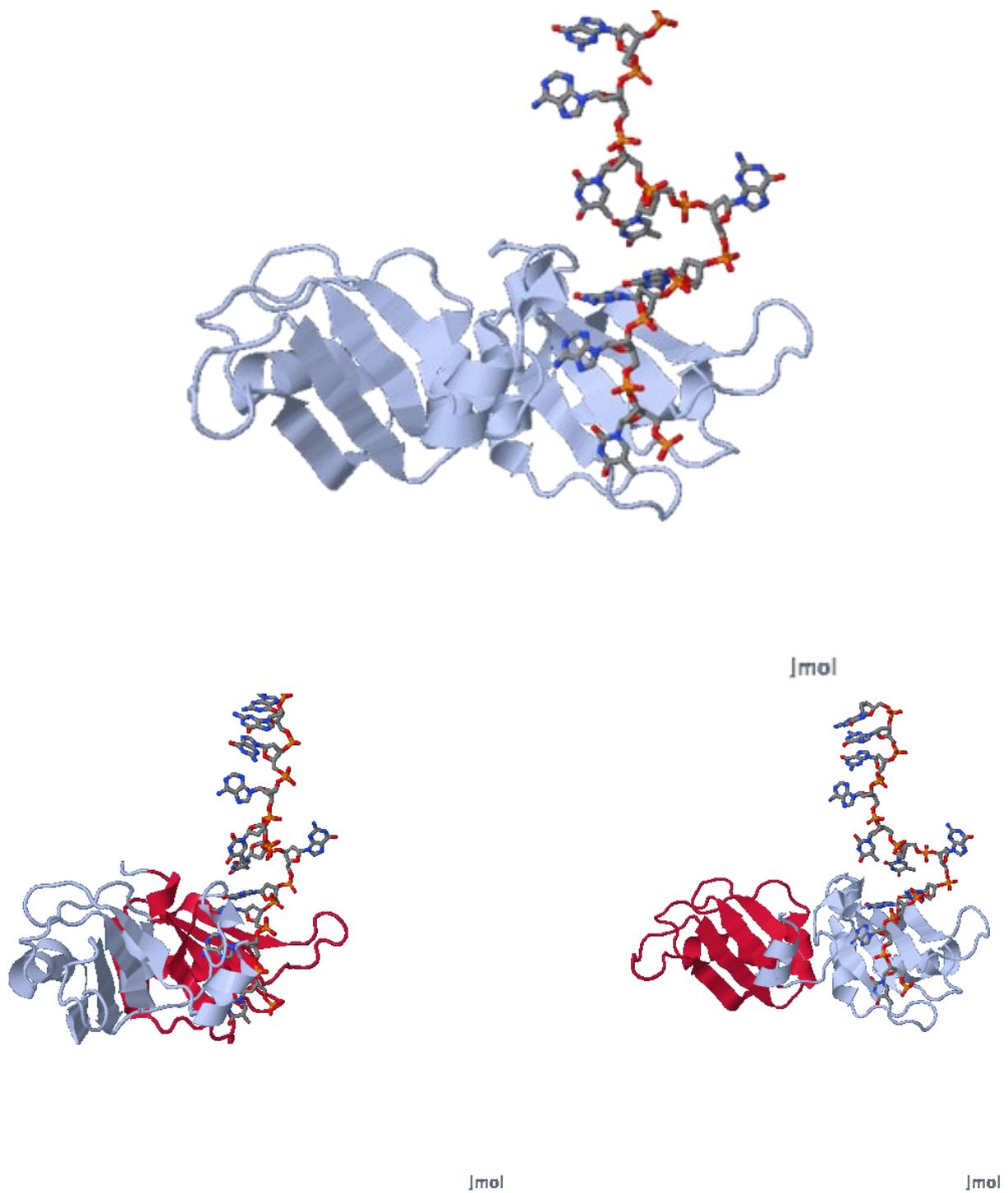


Abbildung 2 oben: Kristallstruktur des Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1; unten: graphische Darstellung von RRM1 links und RRM2 rechts (Barraud & Allain, 2013; Garrett et al., 1994),

Die Funktionen von hnRNPA1 sind vielfältig. HnRNPA1 ist an der Verpackung der prä-mRNA in hnRNP Partikel und dem Transport von Poly-A mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma beteiligt und könnte Auswirkungen auf die Auswahl der Splice Stelle haben (Paronetto et al., 2007).

Obwohl es vorwiegend nukleär vorkommt, wandert hnRNPA1 schnell zwischen Nukleus und dem Zytosol hin und her, und transportiert dabei die verankerte prä-mRNA zur weiteren Prozessierung. Das Translokationsprotein Transportin1 erleichtert hierbei die Translokation von hnRNPA1 zurück in den Nukleus. Transportin1 besitzt kurzes Peptidstück des C-terminalen Endes von hnRNPA1, an welches hnRNPA1 bindet (Roth & Khalaila, 2017).

Es gibt Hinweise darauf, dass hnRNPA1 an spezifische miRNA Haarnadelstrukturen bindet (Treiber et al., 2017) und dass es durch Bindung an die IRES die Translation des Apoptoseprotease-aktivierenden Faktors APAF1 inhibiert (Li et al., 2019).

Im Replikationszyklus des Hepatitis C Virus (HCV) zeigte sich bei einem Knockdown sowie einer Überexpression von hnRNPA1 eine verminderte HCV Replikation was auf eine wichtige Rolle der RNA-Protein Interaktion hinweist (Kim et al., 2007).

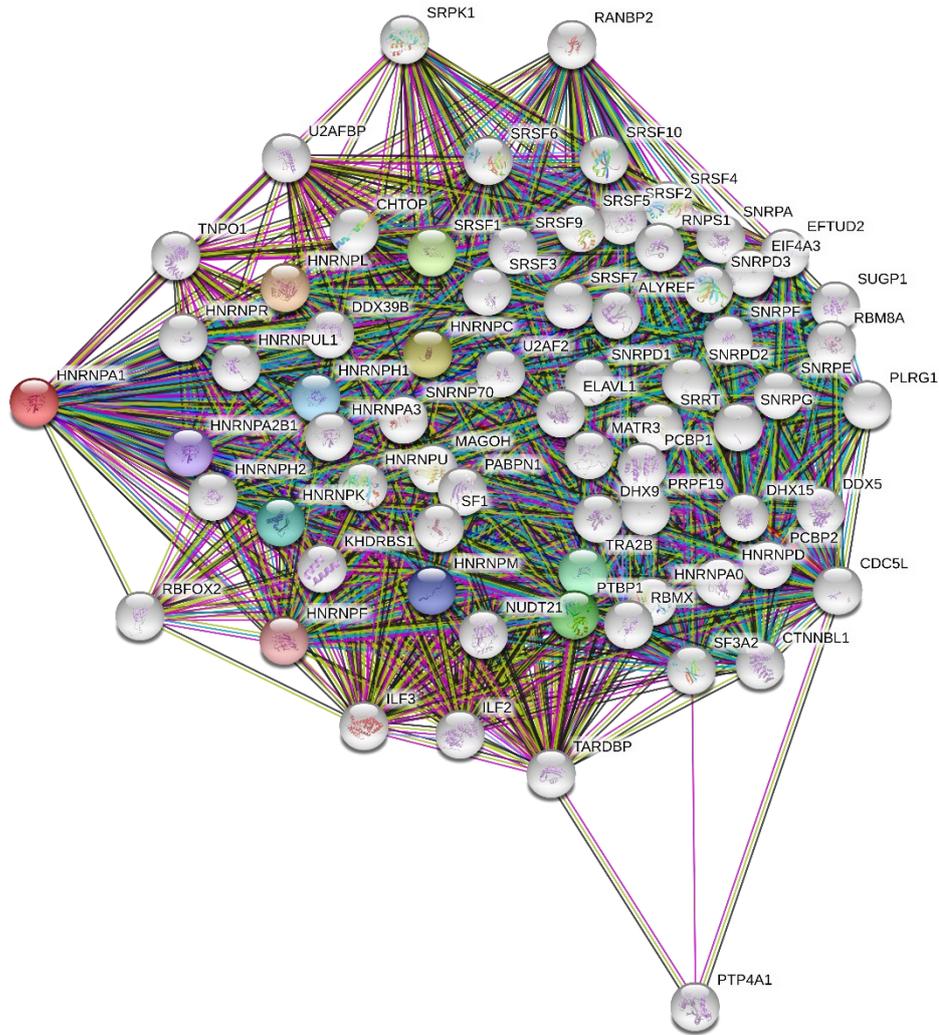


Abbildung 3 Ausschnitt aus den bekannten hnRNPA1-Interaktionen (Quelle: STRING Datenbank)

2 Zielsetzung

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von bislang nicht bekannten *HNRNPA1*-Mutationen, die zu einer verbesserten Diagnostik und Therapie von Multisystemproteinopathiepatienten führen sollen. Hierzu sollte die DNA von molekulargenetisch ungeklärten Patienten mit klinisch sorgfältig charakterisierter Multisystemproteinopathie auf neue krankheitsrelevante Genvariationen im bekannten Kandidatengen *HNRNPA1* mittels PCR und direkter Sequenzierung untersucht werden. Zur Charakterisierung der bisher nicht beschriebenen Mutationen, sollte anschließend deren Pathomechanismus durch *in vitro* vergleichende Gen- und Proteinexpressionsanalysen charakterisiert werden. Bestätigt sich ein Pathomechanismus, so können bisher bestehende Analysepanels erweitert und ggf. Ansätze für eine Therapie gefunden werden.

Funktionelle *in vitro* Experimente zur Untersuchung der Expression des mutierten Proteins und dessen Verbleib in der Zelle können eine Erklärung für die Pathogenität der Mutation liefern. Die Tragweite eines Defekts in einem Protein mit dieser Funktion könnte daran gut abgeschätzt werden. *HNRNPA1* kann dabei als Modell für die ubiquitär exprimierte Familie der hnRNPs gesehen werden und einen möglichen Erklärungsansatz unter vielen für die Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen Erkrankungen, die als Multisystemproteinopathien zusammengefasst werden, gesehen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Für die Identifizierung neuer krankheitsverursachende genetische Veränderungen des *HNRNPA1*-Gens wurde bei einer Kohorte von 196 Patienten mit Bezug zu einer Multisystemproteinopathie, sei es durch die klinische Symptomatik oder durch die histologische Untersuchung, jedoch noch ohne Klärung der definitiven Pathogenese der jeweiligen Patienten, eine molekulargenetische Analyse durchgeführt.

Für die genomische DNA wurde auf die MTCC-Biobank des Friedrich-Baur-Instituts des Klinikums der LMU München zurückgegriffen [mit schriftlichem Einverständnis der Patienten (Ethikvotum Projekt 045-14)]. Als Kontrolle dienten jeweils Wildtyp-DNA von gesunden Freiwilligen und ein Vektor mit dem Wildtyp des *HNRNPA1*-Gens.

3.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Kits entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten von den Firmen Thermo Scientific, New England BioLabs, Macherey-Nagel, Origene, Invitrogen, Macherey-Nagel, Lonza, Dako, Santa Cruz Biotechnology, Proteintech, Cell Signaling via New England Biolabs, Clontech, Bio-Rad und Qiagen.

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaktion)

3.3.1 Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1990 von Kary Mullis (Mullis & Faloona, 1987) erstmals beschrieben und ist heute die Standardmethode zur Vervielfältigung von DNA. Dabei werden drei Reaktionsschritte durchlaufen, welche in einer bestimmten Anzahl von Zyklen wiederholt werden. Es beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei ca. 95°C, anschließend wird die Temperatur wieder gesenkt, damit sich Oligonukleotide (Primer) anlagern können (Annealing), und im dritten Schritt wird die Temperatur wieder gesteigert, damit die Taq-Polymerase die Verlängerung der DNA-Einzelstränge (Extension) ausführen kann. Durch mehrere Zyklen kann ein spezifischer DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt werden.

3.3.2 Reaktionsbedingungen

PCR- Ansatz zur Vorbereitung einer Sequenzanalyse des *HNRNPA1*-Gens in 25 µl Gesamtmenge:

- 12,5 µl MasterMix (Maxima Hot Start Green PCR Master Mix Fa. Thermo Scientific)
- 1 µl DNA
- 0,5 µl Sens-Primer
- 0,5 µl Antisense-Primer
- 10,5 µl H₂O

Die PCRs wurden in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Fa. Eppendorf) durchgeführt. Ein typisches Amplifikationsprogramm war:

1. Initiale Denaturierung der DNA	95°C: 4 min	
2a. Denaturierung der DNA-Doppelstränge	95°C: 30 sek	40 Zyklen
2b. Anlagerung der Primer (Annealing)	55°C: 30 sek	
2c. DNA-Doppelstrangsynthese (Extension)	72°C: 1min	
3. Abschließende Extension	72°C: 7 min	

3.3.3 Primer

Für die Auswahl und das Design der Primer standen eine Reihe von Internetdatenbanken zur Verfügung. Aufgrund der routinemäßigen Erfahrung wurde hier das Tool des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verwendet, welches bisher gute Ergebnisse lieferte (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, 2020). Das Design von sense und antisense Primern erfolgte anhand der gängigen Empfehlungen sowie z.B. ähnlicher Schmelztemperatur, fehlender Komplementmentalität zueinander zur Verhinderung von Primerdimeren und Kontrolle auf GC-reiche Sequenzen am 3`-Ende.

Tabelle 2 Primersequenzen HNRNPA1-Gen

Primer	Primmersequenz	Temp [°C]	Zielregion	Fragmentlänge [bp]
RNPA1s	5'-GGGGAAGCGATTTCAAGTATCC-3'	55	Exon 1	278
RNPA1a	5'-ACGAAACCCAGCAGCATCTTAC-3'	55		
RNPA2s	5'-GCGACCTGAACGAACAATAAGTG-3'	55	Exon 2	358
RNPA2a	5'-TCCTTTGCCAACAAAGCTCTAAC-3'	53		
RNPA3s	5'-AGTTTCCTATTGCCCTATTCAAAG-3'	52	Exon 3	304
RNPA3a	5'-TCCCGAATCTTAAAGTTCATAGC-3'	51		
RNPA4-5s	5'-GAACTTAAGATTCGGGAGTTTTC-3'	52	Exon 4-5	727
RNPA4-5a	5'-AATCTTCATAGCAAAGATGGTGAG-3'	52		
RNPA6-7s	5'-ATCTGTATGGCATTCTAAACCCTG-3'	54	Exon 6-7	636
RNPA6-7a	5'-AAGTTGAGTTTGACATGCACCAG-3'	53		
RNPA8s	5'-GTCAAACCTCAACTTGGCCATAAC-3'	54	Exon 8	369
RNPA8a	5'-CAGTGTACCACACAATGCTTCAAC-3'	56		
RNPA9s	5'-GAATGAAATGCAAAGATTGGAGTC-3'	52	Exon 9	381
RNPA9a	5'-ATAGCAGTTAAAGGGCTTTCTTCC-3'	54		
RNPA10s	5'-ACCTCTTTACCACCTCCCTGTAG-3'	57	Exon 10	271
RNPA10a	5'-GCTCAGCTACATTAGGGTTATTGG-3'	56		

3.4 Gelelektrophorese und Amplifikatextraktion aus Agarosegel

Die Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Trennung unterschiedlicher DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen. Abhängig von der Länge der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-4% gewählt. Die Agarose (Fa. Invitrogen) wurde je nach gewünschter Konzentration (1-4%) in TAE-Puffer gegeben und unter Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µl/ml, Stammlösung 10 mg/ml) wurde die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer eingegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Anschließend wurde die Apparatur mit 1xTAE-Puffer bis knapp über das Gel gefüllt. Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenol-Blau, 0,03% Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60%

Glycerin) versetzt und in die Tasche hinein pipettiert. In regelmäßigen Abständen wurden separate Taschen jeweils mit einem Größenmarker (10 µl 100 bp Leiter, Fa. MBI Fermentas) gefüllt, der das Ablesen der Fragmentlänge erlaubte.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 120 V über ungefähr 45 Minuten. Anschließend wurden die PCR-Fragmentbanden aus dem Gel unter UV-Lichtkontrolle mit einem Skalpell herausgeschnitten. Danach erfolgte die Gelextraktion mit Nucleic Acid Purification Kit (Fa. Macherey-Nagel) gemäß Herstellerprotokoll.

3.5 Sequenzanalyse

Die in der PCR synthetisierten PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung zunächst im kodierenden Strang sequenziert. Bei einem Aminosäureaustausch wurde zur Kontrolle auch der Gegenstrang sequenziert. Die Sanger Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Die Firma verwendet für die Sequenzierung die Cycle Sequencing Technologie (dideoxy chain termination / cycle sequencing) auf ABI 3730XL-Sequenzern.

Die Sequenzen wurden anschließend mit den entsprechenden Datenbanksequenzen (GenBank-Zugangsnummer für *HNRNPA1* GenBank: **NM_002136.4**, Ensembl transcript ID: **ENST00000546500**) online über <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> verglichen und auf Mutationen untersucht.

3.6 Mutagenese und Klonierung

3.6.1 Einführen der Mutation Ex 9 c.784 G>A p.D262N in den Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK

Zur Analyse der Auswirkungen der bei einem Patienten gefundenen Mutation *HNRNPA1* p.D262N *in vitro* wurde diese in die Wildtyp-Sequenz eingeführt. Als Grundlage hierfür wurde ein hnRNPA1 (*HNRNPA1*) (NM_002136) Human Tagged ORF Clone aus einer HEK293T Zelllinie verwendet (Nr. RC203314, Fa. OriGene). Im Weiteren wird der neugeschaffene Vektor mit der Mutation D262N Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK genannt.

Um die Mutation D262N in den Wildtyp-Vektor einzuführen wurden im ersten Schritt zusammen mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, Fa. Thermo Fisher Scientific) und Mismatchprimern eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt (Ho et al., 1989). Die Primer besitzen jeweils eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym (BamHI und NotI) auf beiden Seiten der Mutation D262N. Es wurden jeweils eine PCR für den Sensestrang (PCR 1) und für den Antisensestrang (PCR 2) durchgeführt. Die beiden PCR Produkte PCR Produkt 1 und PCR Produkt 2 enthalten jetzt die gewünschte Mutation D262N. Es wurde eine dritte PCR (PCR 3) mit je 500ng der PCR Produkten 1 und 2 ohne Primer durchgeführt, um ein komplettes Insert mit Mutation D262N (PCR Produkt 3) für den Vektor zu erzeugen. Dieses Insert wurde in der PCR 4 mit den äußeren Primern amplifiziert (siehe Abbildung).

Die PCR 3 wurde in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Fa. Eppendorf) durchgeführt. Das Amplifikationsprogramm war:

1. Initiale Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C: 2 min	
2a. Denaturierung der DNA-Doppelstränge	95°C: 15 sek	25 Zyklen
2b. Anlagerung der Fragmente (Annealing)	65°C: 1 min	
2c. DNA-Doppelstrangsynthese (Extension)	72°C: 1 min	
3. Abschließende Extension	72°C: 7 min	

Die PCR 4 wurde in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Fa. Eppendorf) durchgeführt. Das Amplifikationsprogramm war:

1. Initiale Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	94°C: 5 min	
2a. Denaturierung der DNA-Doppelstränge	94°C: 1 min	20 Zyklen
2b. Anlagerung der Primer (Annealing)	60°C: 1 min	
2c. DNA-Doppelstrangsynthese (Extension)	68°C: 6 min	
3. Abschließende Extension	20°C: 7 min	

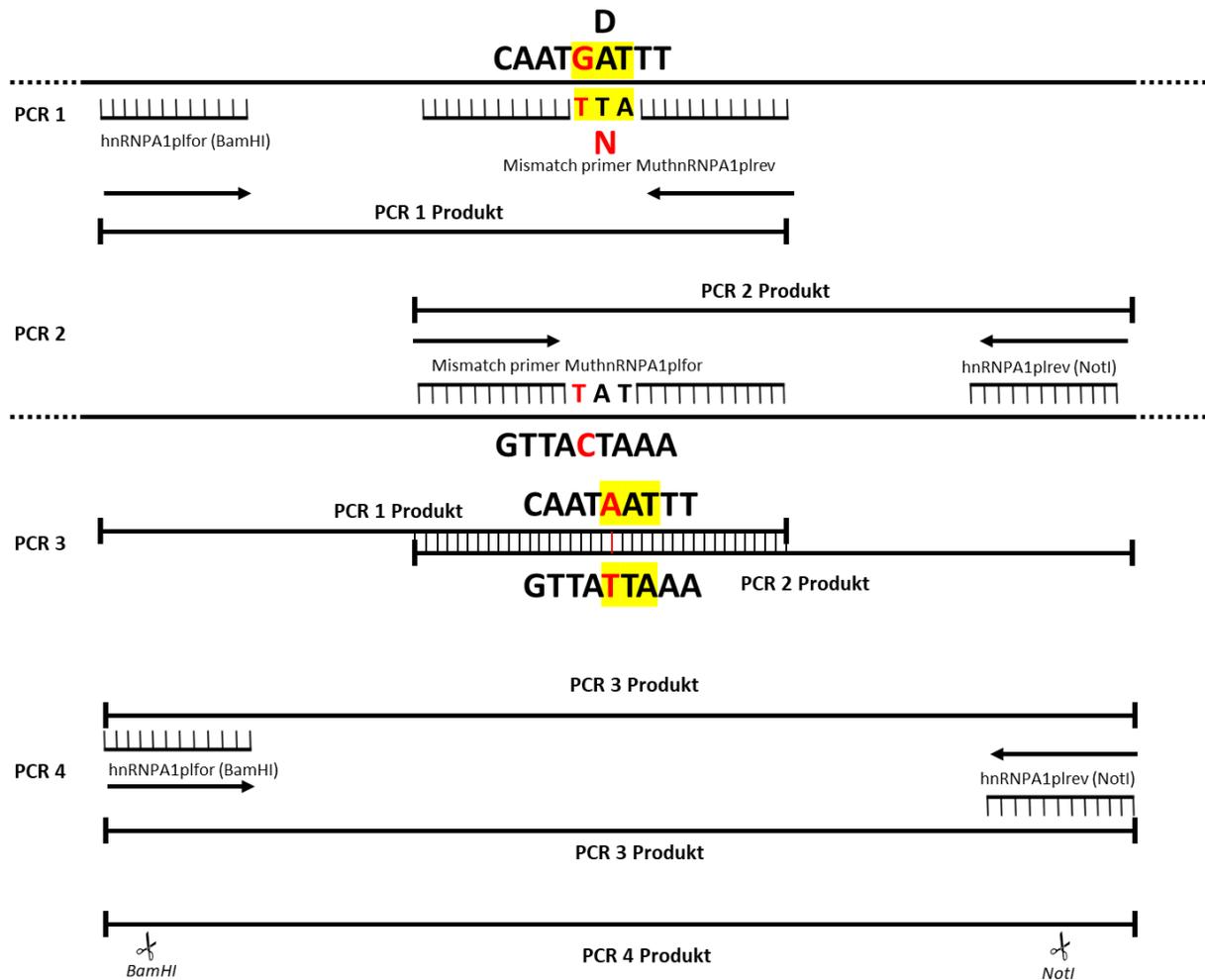


Abbildung 4 Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenesestrategie

Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenesestrategie zur Einführung der D262N Mutation in den Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK

Das Insert (Verdau 1) und der Wildtyp-Vektor (Verdau 2) wurden jeweils in eigenem Ansatz mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI verdaut. Der Verdauansatz wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 35 µl Insert (PCR Produkt 3)
- 2 µl NotI
- 2 µl BamHI
- 5 µl Puffer
- 6 µl H₂O

Der Verdau wurde jeweils in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Fa. Eppendorf) für 1 Stunde bei 37°C durchgeführt.

3.6.2 Primerdesign Mutagenese:

Tabelle 3 Sequenzen der Mutagenese-Primer

Primername	Primersequenz	Tm[°C]	Länge [bp]
MuthnRNPA1plev	GATTGTTGTAATTCCTAAAATTATTGTAGCTTCCACCACCTCC	73,2	43
MuthnRNPA1plfor	GGAGGTGGTGAAGCTACAATAATTTGGGAATTA- CAACAATC	72	43
hnRNPA1plfor (BamHI)	CCGGGAATTCGTCGACTGG	65,5	19
hnRNPA1plev (NotI)	TGCTGCCAGATCCTCTTCTG	64,7	20

3.6.3 Ligation

Um einen transfektionsfähigen Vektor zu erhalten wurde eine Ligation des verdauten Inserts mit Mutation D262N und des verdauten Wildtyp-Vektors pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK mit einer T4-DNA Ligase (Fa. Thermo Scientific) durchgeführt.

Der Ligationsansatz wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 0,5 µl Insert (Verdau 1)
- 1,13 µl Vektor (Verdau 2)
- 1 µl T4-Ligase
- 1 µl Puffer
- 6,37 µl H₂O

Die Ligation wurde nach Protokoll des Herstellers (T4-DNA Ligase, Fa. Thermo Scientific) jeweils für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz bis zur Transfektion auf Eis gestellt.

Die ortsspezifische Mutagenese der Mutation D262N im Exon 9 des *HNRNPA1*-Gens ist somit abgeschlossen. Eine Vektorkarte des entstandenen Vektors ist in nachfolgender Abbildung zu sehen.

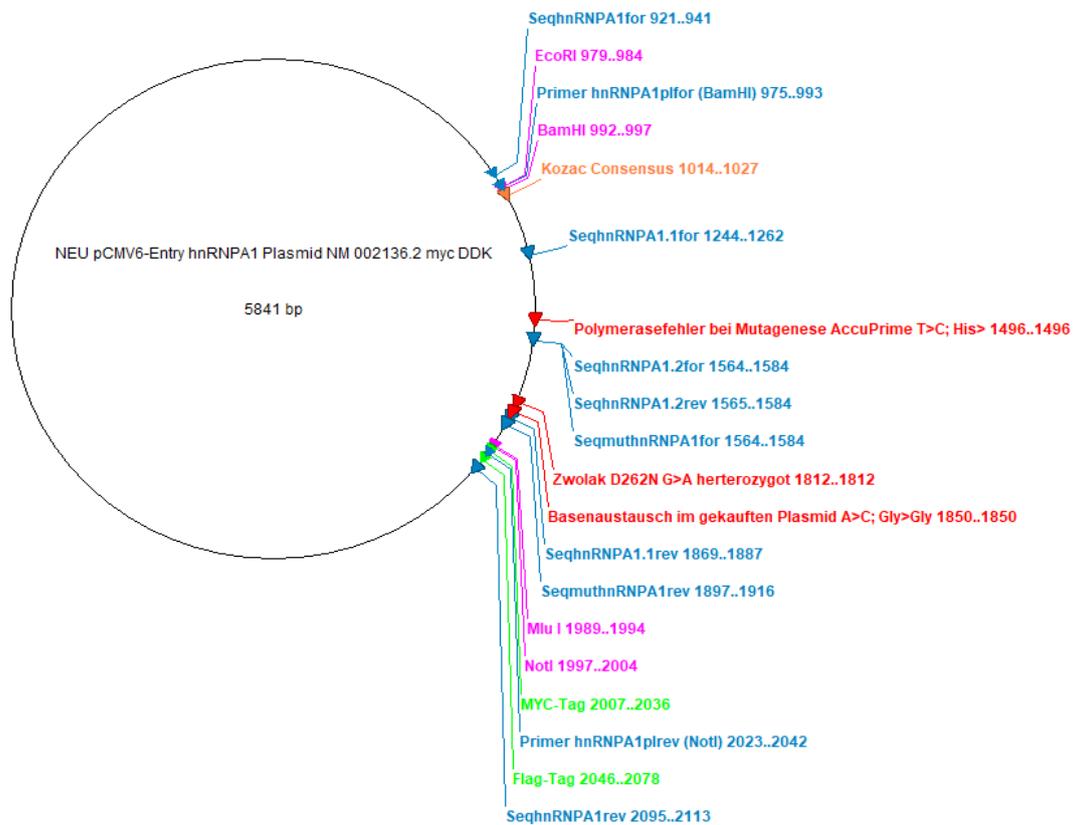


Abbildung 5 Vektorkarte des mutierten Vektors

Vektorkarte des verwendeten Vektors NEU pCMV6-Entry hnRNPA1 D262N Plasmid NM 002136.2 myc DDK, Fa. OriGene (TrueORF Gold) Cat. No. RC203314

3.7 Transformation von Plasmid DNA in *E. coli*

Der fertige Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 D262N Plasmid NM 002136.2 myc DDK wurde in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms DH5 α (Fa. Invitrogen) mit Hilfe der Hitzeschock-Methode transformiert und auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (30 μ g/ml) ausgestrichen.

Die Transfektion von *E. coli* (DH5 α) Bakterien mittels Hitzeschock-Methode wie folgt durchgeführt: Die Bakterienzellen wurden aus einem -80°C Gefrierschrank auf Eis aufgetaut (ohne die Zellen Raumtemperatur erreichen zu lassen). Es wurden 1,5 μ l Plasmid (50%) in ein Eppendorfgefäß (0,5 ml) vorgelegt und die kompetenten Zellen hinzu pipettiert (ca. 250 μ l). Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 35 sek bei 42°C in das Was-

serbad gestellt. Im Anschluss wurde das Eppendorfgefäß sofort für 2 min auf Eis (Eisbad) gestellt. Danach wurden 250 µl SOC-Medium zugeben und für 60 min bei 37°C auf einem Bakterienschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien mittels Rasenausstrich (ca. 100 – 150 µl) auf eine Agarplatte (Kanamycin) ausgestrichen und für ca. 15h bei 37°C bebrütet.

3.8 Bakterienkultur

Am Folgetag der Bakterientransformation und Bebrütung der LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C wurden einzelne Kolonien von der LB- Agarplatte abgenommen und in ein Reagenzglas mit 4 ml LB-Medium (Boullion) und 2 µl Kanamycin überführt und dieses beimpft. Diese Vorkulturen wurden ebenfalls bis zum Folgetag bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert.

3.8.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Aus den gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag Vorkulturen angelegt, aus welchen mittels Mini-Präparations-Kits (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA extrahiert wurde. Diese wurde zur Sequenzierung erneut an die Firma Eurofins MWG Operon verschickt, um die korrekte Sequenz der Mutagenese und des Plasmids zu kontrollieren. Die Sequenzierungen zeigten den gewünschten Basenaustausch c.784G>A (s. Abbildung unten). Mit einer Vorkultur eines korrekten Klons wurde zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid eine Vervielfältigung mittels eines größeren Bakterienkulturansatzes in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium (Boullion) und 4 µl Kanamycin durchgeführt. Dieser wurde über Nacht bei 37°C auf einem Bakterienschüttler inkubiert. Am Folgetag erfolgte eine Plasmidextraktion mit einem Maxi-Präparations-Kit NucleoBond PC 500 (Fa. Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben.

Tabelle 4 Primersequenzen zur Sequenzkontrolle des mutierten Vektors

Sequenzen der Sequenzierprimer des Vektors NEU pCMV6-Entry hnRNPA1 D262N Plasmid NM 002136.2 myc DDK

Primername	Primersequenz	Tm(°C)	Länge (bp)
SeqhnRNPA1for	AGAGCTCGTTTAGTGAACCGT	64,4	21
SeqhnRNPA1rev	AGGAAACAGCTATGACCGC	62,8	19
SeqmuthnRNPA1for	AAGCCCTGTCAAAGCAAGAGA	65,1	21
SeqmuthnRNPA1rev	AAAGTATTGGCCTCCACCGC	65,1	20

3.8.2 DNA-Mengenbestimmung

Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA-Proben wurden mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Fa. Thermo Scientific) bestimmt. Dazu wurden 1,5 µl der unverdünnten Probe auf den Detektor des Gerätes geladen. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), wobei der Quotient OD260/OD280 einen Rückschluss über die Reinheit der Probe gibt. Der Nullabgleich erfolgte mit dem Lösungsmittel der Nukleinsäureprobe (Elution buffer NE, Fa. Macherey-Nagel).

3.9 Zellkultur

Die Zelllinie C2C12 (immortalisierte Mausmyoblasten) wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Fa. Fisher Scientific), angereichert mit 4 mmol/L L-Glutamin, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (beide Fa. Fisher Scientific) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wurden die Zellen in DMEM mit 2% Pferdeserum (HS), 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert.

Zur Vorbereitung auf eine Transfektion der C2C12 Zellen wurden die Zellen in 15cm Kulturschalen unter den oben beschriebenen Bedingungen angezchtet. Für den Transfer in die Transfektionsküvetten wurden die C2C12 Zellen einmalig mit 3 ml Trypsin gespült, dieses wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden erneut 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, alle Zellen durch leichtes Klopfen gelöst und in 7 ml DMEM aufgenommen.

3.9.1 Transfektion

Die Transfektion wurde mit der Methode der Lipofektion durchgeführt. Dafür wurde das Transfektionskit Lipofectamine® 2000 Reagent (Fa. Invitrogen) benutzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die C2C12-Zellen wurden zur Transfektion in 6-Well Kulturschalen für die Proteinanalyse oder 8-Well Objektträger für die Immunfluoreszenz ausgesät. Die Zellernte bzw. die Immunfluoreszenzfärbung wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt.

3.9.2 Färbung und Immunfluoreszenz

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine und deren subzellulärer Lokalisation wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf Objektträgern mit acht Wells ausgesät und kultiviert. Die Umrandung der Wells konnte nach der Färbung zum Eindecken der Objektträger abgelöst werden.

Die Transfektion wurde nach aussäen der C2C12 Zellen Mit dem Transfektionskit Lipofectamine® 2000 Reagent (Fa. Invitrogen) durchgeführt. Nach 24 bis 48 Stunden wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Das Medium der Zellen wurde abgenommen, und die Zellen kurz in 1x PBS-Puffer (PAA Laboratories) gewaschen, in Cytoskelett-Puffer (CSK-Puffer: 20 mM Pipes, pH 6.8; 600 mM Sucrose; 200 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 2 mM EGTA) mit 3,7% Formaldehyd (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) 15 min auf Raumtemperatur fixiert und daraufhin in CSK-Puffer mit 0,1% Triton X-100 10 min permeabilisiert. Nach dreifachem Waschen in 1x PBS für je 5 min. wurden die unspezifischen Bindungsstellen eine Stunde lang bei Raumtemperatur in CSK-Puffer mit 5% Pferdeserum geblockt. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in 1x PBS mit 5% Pferdeserum über Nacht bei 4°C. Nach dreifachem Waschen in 1x PBS für je 5 min. wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI Bisbenzimid H 33258 (40 µg/ml) angefärbt, danach dreifach in 1x PBS für je 5 min. gewaschen, bevor die Deckgläschen mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträger aufgebracht wurden und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Digitalkamera durchgeführt. Für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Olympus FluoView FV1000 Confocal Microscope benutzt.

3.9.3 Proteinaufbereitung für Westernblot und Proteinbestimmung

Für die Analyse der Proteine (Mengenbestimmung und Westernblot) wurden die transfizierten C2C12 Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers (Rubber Policeman) aus der Kulturschale gewonnen, in PBS gewaschen und bei 4°C abzentrifugiert (20.000 x g, 5 min.). Das erzeugte Zellpellet wurde unter Verwendung eines SDS-Lyse-Puffers lysiert (10 mM Tris-Cl, pH 7,4, 1% SDS) und mittels Pipette homogenisiert. Das so entstandene Lysat wurde wiederum abzentrifugiert und der Überstand für die Westernblotexperimente bei -80°C asserviert.

Eine Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Fa. Thermo Scientific) durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µl der unverdünnten Probe auf den Detektor des Gerätes geladen. Die Messung erfolgte bei der Wellenlänge 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Bei einer hohen Proteinkonzentration wurde die Probe verdünnt.

3.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) und Westernblot

Nach Extraktion der Proteine aus den C2C12 Zellen wurde zur weiteren Analyse eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). Hier wurden die Proteine, nach Denaturierung und unter Ausschaltung ihrer Eigenladung durch SDS, ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Laufstrecke im elektrischen Feld korreliert mit der Größe des Proteins.

Es wurden kommerziell erhältliche Gele (Fa. Bio-Rad) verwendet. Den Proteinproben wurde Lysepuffer hinzu pipettiert und sie so auf die gewünschte Menge verdünnt. Anschließend wurden sie für 15 min bei 95°C denaturiert, mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 80V (10 mA konstant pro Gel in der Kammer) gestartet. Nach ca. 30 min hatten die Proben das Trenngel erreicht und die Spannung wurde auf 120 V (20 mA konstant pro Gel in der Kammer) erhöht. Die Elektrophorese wurde weiterlaufen gelassen, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Nach SDS-PAGE wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch das Wetblot-Verfahren im Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran immobilisiert die Proteine und macht sie für eine weitere Analyse mittels Antikörper zugänglich.

Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4°C (im Kühlraum) bei einer konstanten Spannung von 30 Volt in einer mit Blottingpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer („blotten“) zunächst 30 min in TBS-T gewaschen und anschließend über Nacht oder optional 2 Stunden in einer Blockierlösung bestehend aus TBS-T (Tris buffered saline mit 0,1% Tween-20) und in einer Proteinlösung (Blockierlösung = 5%iges Milchpulver) zur Bindung unspezifischer Epitope inkubiert. Danach wurde die Membran unter konstantem Schwenken mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C mit dem verdünnten primären Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären HRP (horse radish peroxidase)-gekoppelten Antikörper über eine Stunde erfolgte nach 5-maligem Waschen der Membran jeweils 5 min mit TBST. Die jeweilige Verdünnung war wiederum antikörper-spezifisch. Im Allgemeinen wurde der Sekundärantikörper in der Blockierlösung verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 5 mal 5 min mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis von spezifisch gebundenen Primärantikörpern mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“-ECL-Detektion wurde die Membran mit dem entsprechenden Volumen Detektionsreagenz inkubiert und anschließend die Lichtemission detektiert (Geldokumentationssystem, Fa. INTAS).

3.11 Antikörper

Die verwendeten primären Antikörper für die Immunfluoreszenz- und Westernblot-Experimente waren folgende: anti-myc (mouse, Fa. Clontech Immunfluoreszenz (IF): 1:100, Westernblot (WB): 1:1000 (in 5% Magermilch), anti-hnRNPA1 (K350) (rabbit, Fa. Cell Signaling, IF: 1:50, WB: 1:1000), anti-eIF4g (rabbit, Fa. Santa Cruz Biotechnology, IF: 1:100, WB: 1:1000) und anti-TDP-43 (rabbit, Fa. Proteintech, IF: 1:100, WB: 1:1000).

Für die Westernblot-Experimente wurden die folgenden sekundären Antikörper verwendet [alle konjugiert mit Horseradish Peroxidase (HRP)]: anti-rabbit HRP (goat, Fa. Cell Signaling via New England Biolabs, 1:10000), anti-mouse HRP (rabbit, Fa. Dako, 1:10000).

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Isotyp-spezifische sekundäre Antikörper verwendet, jeweils konjugiert mit Alexa488 (grün) und Alexa594 (rot) (beide Fa. Invitrogen; 1:200).

4 Ergebnisse

Es ist aktuell bekannt, dass einzelne oder eine Kombination an Mutationen in Spleißstellen, RNA-Bindeproteinen (hnRNPs, TDP-43), Enzymen (VCP, GNE), Transportproteine (SQSTM1) Ursachen von Multisystemproteinopathien mit amyotropher Lateralsklerose, Morbus Paget (PDB) oder Einschlusskörpermyositis (IBM) darstellen (Bekenstein & Soreq, 2013; Broccolini et al., 2009; Deshaies et al., 2018; Taylor, 2015; Wehl, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit ungeklärter, aber symptomatischer Multisystemproteinopathie analysiert und molekulargenetisch auf Mutationen insbesondere im Gen *hnRNPA1* untersucht. Die neu identifizierte Mutation wurde anschließend funktionell charakterisiert, um Hinweise auf den zugrundeliegenden Pathomechanismus zu erlangen.

4.1 Klinische und molekulargenetische Analyse des *HNRNPA1*-Gens

Im *hnRNPA1*-Gen wurde im Rahmen dieser Arbeit bei einem polnischen Patienten eine in Verbindung mit einer Multisystemproteinopathie, insbesondere der autosomal dominanten hereditären Einschlusskörpermyopathie bisher noch nicht in der Literatur beschriebene Mutation gefunden.

Bei unserem Patienten handelt es sich um einen heute 54-jährigen Mann. Er ist das zweite Kind polnischer, nicht-konsanguiner Eltern; sein Bruder und die Eltern zeigten keine Symptome einer neuromuskulären Erkrankung, jedoch sein Großvater und ein Cousin waren symptomatisch. Bei dem Patienten traten die Symptome ab dem 39. Lebensjahr auf. Es zeigten sich klinisch initial die Symptome Gangbildverschlechterung und Probleme beim Treppensteigen ohne Schmerzen oder Sensibilitätsverlust. Im weiteren Verlauf entwickelten sich ausgeprägte Atrophien der Becken- und Oberschenkelmuskulatur. Mit dem 43. Lebensjahr trat eine Muskelschwäche im LWS-Bereich, eine Schwäche der Handmuskulatur, welche die Fingerbeuger bisher nicht betraf, und eine beginnende beidseitige Scapula alata auf. Diese Symptomatik war kontinuierlich progredient. Eine Beteiligung der bulbären Muskulatur oder der Atemmuskulatur zeigte sich aktuell nicht. Die Diagnose autosomal dominante hereditäre Einschlusskörpermyopathie wurde im Alter von 46 Jahren gestellt. Eine kausale Therapie kann dem Patienten aktuell noch nicht angeboten werden. Er führt regelmäßig selbstständig sportliche Betätigung durch, was sich bisher möglicherweise verzögernd auf die Krankheitsprogression ausgewirkt hat.

Durch die Sequenzanalyse der kodierenden Regionen und angrenzender intronischer Bereiche des *hnRNPA1*-Gens, konnte in Exon 9 ein heterozygoter Basenaustausch (784G>A) identifiziert werden. Diese Veränderung der Sequenz führt zu dem Aminosäureaustausch D262N.

Bei dem Patienten konnten neben dieser bisher unbekanntem Mutation in einer Sequenzanalyse des *VCP*-Gens mehrere schon in der Literatur beschriebene SNVs nachgewiesen werden. So zeigte die IVS 7 die Einzelnukleotid-Variation (SNV) rs514492, die IVS11 den SNV rs2258240 und die IVS 13 den SNV rs684562. Diese wurden, nach dbSNP, alle als benigne Einzelnukleotid-Variationen eingestuft. In der Sequenzanalyse von *SQSTM1* zeigten sich bei dem Patienten keine Auffälligkeiten.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Sequenzvariationen der Introns des VCP-Gens bei dem Patienten

Referenzsequenz: NM_007126.5 und [ENSG00000165280](#). IVS: intervening sequence; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin. SNV1, SNV2 and SNV3 sind bereits publiziert (Donath et al., 2015; Wang et al., 2019). MAF Quelle: dbSNP auf Basis von gnomAD Daten.

Name	Sequenzvariation	Lokation	dbSNP ID	Minor allele frequency (MAF)	Literatur
SNV1	IVS7 NC_000009.12:35062974:C:T	Intron 7	rs514492	C=0.25	(Wang et al., 2019)
SNV2	IVS11 NC_000009.12:35060957:T:C NC_000009.12:35060957:T:G	Intron 11	rs2258240	T=0.25	(Donath et al., 2015)
SNV3	IVS13 NC_000009.12:35060304:T:A NC_000009.12:35060304:T:C	Intron 13	rs684562	T=0.41	(Donath et al., 2015)

In einem weiteren Screening wurden über 180 Patienten mit Verdacht auf eine Multisystemproteinopathie und Normalkontrollen auf diese Sequenzvariation hin untersucht. Bei keiner Probe konnte die Mutation D262N nachgewiesen werden.

4.1.1 Analyse der Indexfamilie

In der Familienanamnese des Patienten zeigen sich zwei weitere Personen mit neuromuskulären Erkrankungen. Der Großvater des Patienten verstarb im Alter von 63 Jahren an einer tetraparetischen hereditären Einschlusskörpermyositis (muskelbioptisch gesichert). Er war zum damaligen Zeitpunkt rollstuhladaptiert und tracheotomiert. Die Kreatinkinase-Werte zu diesem Zeitpunkt lagen unter 20 U/l. Es fand sich eine asymmetrische Hypertrophie des linken Herzens und in der Muskelbiopsie kamen „rimmed vacuoles“ mit Einschlüssen und ein myopathisches Gewebssyndrom zur Darstellung.

Der 8 Jahre jüngere Bruder des Patienten ist gesund, die Mutter verstarb ohne neuromuskuläre Symptome an einem Karzinom im Alter von 63 Jahren. Ein Cousin des Patienten ist ebenfalls erkrankt.

Der Patient selbst hat einen 11-jährigen Sohn und eine 17-jährige Tochter, welche beide bis dato neuromuskulär ohne Auffälligkeiten sind.

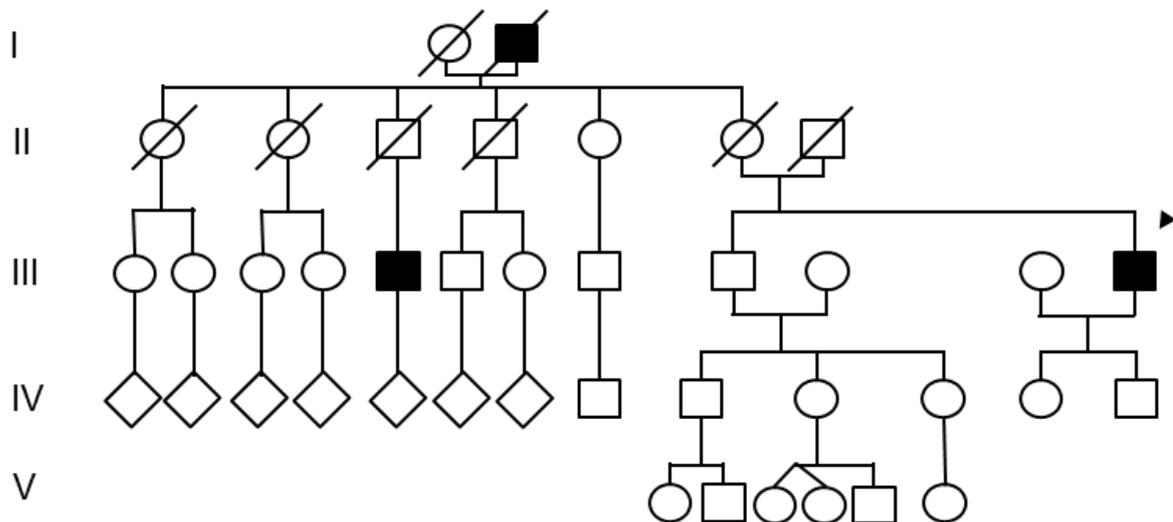


Abbildung 6 Stammbaum des Patienten

Stammbaum (Generationen I-V; Indexpatient: Pfeil ▶; normal männlich: □; normal weiblich: ○; Merkmalsträger/Erkrankte: ■ ●; Nachkommen unbekanntes Geschlechts: ◇; dizygote (nichtidentische) Zwillinge: ♂♂; V erstorben: ♂ ♀)

4.1.2 Klinische Untersuchungsbefunde

Im klinisch-neurologischen Status fand sich ein wacher, vollorientierter Patient. Im Bereich der Kopf- und Hirnnerven zeigen sich keine Auffälligkeiten, keine Parese des M. sternocleidomastoideus, keine Atrophien im Bereich der Hirnnerven-versorgten Muskulatur. Es fand sich eine mittelgradige beidseitige Scapula alata sowie eine M. biceps-brachii-Atrophie beidseits mit Kraftgrad 4/5, darüber hinaus volle Kraft der restlichen Oberarmmuskulatur beidseits.

Im Bereich der Unterarme und Hände war eine Fingerspreizerparese Kraftgrad 4/5 und eine Parese Fingerbeugemuskulatur Kraftgrad 5/5 sowie eine Parese der Fingerstrecker- und Fingerbeugemuskulatur Kraftgrad 4/5 nachweisbar.

Im Bereich der unteren Extremitäten zeigte sich eine deutliche M. vastus lateralis- und M. vastus medialis- Parese mit Atrophie Kraftgrad 3/5 bei relativ kompensatorisch gut erhaltendem M. rectus femoris Kraftgrad 4/5 und Adduktorenmuskulatur mit Kraftgrad 4/5. Es fand sich eine Fußheberparese Kraftgrad 4/5, eine Großzehenheberparese Kraftgrad 4/5, M. biceps femoris Kraftgrad 4/5, M. gastrocnemius Kraftgrad 4/5.

Der Tricepssehnenreflex war beidseits schwach seitengleich auslösbar, ebenso die übrigen Muskeldehnungsreflexe seitengleich schwach lebhaft erhältlich. Die Sensibilität war zu allen Modalitäten intakt. Der Patient bot ein paretisch hinkendes Gangbild mit Trendelenburg-Zeichen beidseits. Es bestand eine lumbal betonte Atrophie der autochthonen Rückenmuskulatur.

4.1.3 Laborchemische Befunde

Tabelle 6 Laborchemische Befunde des Indexpatienten

				2013		2011
				Di 07.05 15:00	2J	Fr 14.01 14:10
				Richtwerte (Therap.B.)		
				Mat.		
Klinische Chemie						
Natrium	mmol/l	PS	135 – 145	139		
Kalium	mmol/l	PS	3.5 – 5.0	4,3		
Chlorid	mmol/l	PS	95 – 110	104		
Blutzucker	mg/dl	PS	60 – 99	88		

Harnstoff-N	mg/dl	PS	7 – 23	11		
Kreatinin	mg/dl	PS	0.5 – 1.2	0,4		
GFR pro 1,73 qm (Mabb)	ml/min	U	≥ 60.0	> 60,0		
Calcium mg/dl						
Harnsäure	mmol/l	PS	2.10 – 2.60	2,39		
Calcium (EW-korr.)	mmol/l	PS	2.10 – 2.60	2,41		
Eisen	µg/dl	PS	80 – 180	88		
Ferritin	µg/l	PS	30 – 300	429		
Transferrin	g/l	PS	2.0 – 3.6	2,4		
Transferrinsättigung	%	PS	15.0 – 45.0	25,9		
C-reakt. Protein	mg/dl	PS	≤ 0.50	0,16		
Eiweiß, gesamt	g/dl	PS	6.0 – 8.5	7,6		
IgG	mg/dl	PS	800.0 – 1800.0	1154		
IgA	mg/dl	PS	90.0 – 450.0	186		
IgM	mg/dl	PS	60.0 – 250.0	91,3		
Bilirubin direktmg/dl						
Bilirubin gesamt	mg/dl	PS	≤ 0.3	entf.		
GOT [AST] (37°)	U/l	PS	≤ 50	62		
GPT [ALT] (37°)	U/l	PS	≤ 50	96		
GLDH (37°)	U/l	PS	≤ 7.0	30,2		
Cholinesterase (37°)	kU/l	PS	5.00 – 13.30	9,85		
Gamma-GT (37°)	U/l	PS	≤ 60	168		
Alk. Phosphatase (37°)	U/l	PS	40 – 130	73		
Amylase	U/l	PS	≤ 110	52		
Lipase	U/l	PS	≤ 60	31		
LDH (37°)	U/l	PS	≤ 250	269		
CK-Gesamt (37°)	U/l	PS	≤ 190	1482		
CK-Gesamt (37°)	U/l	PS	≤ 180			1831
% MB (bezgl. CK)U/l	%	PS	≤ 6.0	3,8		

CK-MB-Aktivität (37°)						
Myoglobin (Plasma)	ng/ml	PS	≤ 70	255		
Troponin T (hs)	ng/ml	PS	≤ 0.014	0,043		
Cholesterin	mg/dl	PS	120 – 240	271		
Triglyzeride	mg/dl	PS	50 – 200	163		
LDL-Cholesterin	mg/dl	PS	189			
HDL-Cholesterin	mg/dl	PS	35 – 75	56		
HbA1c (NGSP)	%	B	4.0 – 6.0	5		
HbA1c (IFCC)	mmol/mol	B	20.2 – 42.1	31,1		
Fructosamin	µmol/l	PS	≤ 285	196		
Fructosamin (EW-korrigiert)	µmol/l	PS	≤ 285	185		
Glycation Ratio		PS	80 – 120	82		
Hämatologie						
Blutbild		B				
Leukozyten	G/l	B	4.0 – 11.0	7,2		
Erythrozyten				T/l	B	4.50 – 6.30
Hämoglobin	g/dl	B	14.0 – 18.0	15,3		
Hämatokrit		B	0.380 – 0.520	0,448		
MCV	fl	B	78.0 – 98.0	92,3		
MCH	pg	B	26.0 – 32.0	31,4		
MCHC	g/dl	B	32.0 – 36.0	34		
Thrombozyten	G/l	B	150 – 400	296		
Diff.-BB		B		Gerät		
Segmentierte	%	B	40 – 70	68		
Eosinophile	%	B	2 – 4	1		
Basophile	%	B	0 – 2	0		
Monozyten	%	B	4 – 10	5		

Lymphozyten	%	B	25 – 40	26		
Gerinnung (Spezial)						
TPZ (Quickwert)	%	P	70 – 120	89		
INR		P	0.8 – 1.2	1,1		
PTT	sec	P	25 – 42	30		
Endokrinologie, Spezialanalytik						
TSH	µU/ml	P	0.30 – 4.00	1,61		
pro-BNP	pg/ml	PS	≤ 83.9	20,5		
				Di 07.05		Fr 14.01
Troponin I (TnI Ultra)	ng/ml	PS	≤ 0.05	< 0,05		
Pyridinolin im Urin				280		
	µg/g Krea.	U	160-280			
Desoxypyridinolin im Urin				57		
	µg/g Krea.	U	26 - 65			
Creatinin im Urin				142		
	mg/dl	U	40 – 200			

4.1.4 Befunde apparativer Untersuchungen

Myosonographie

M. gastrocnemius und M. tibialis anterior rechts: Deutlicher Umbau der Muskulatur (TA >> GA) mit vermehrt Bindegewebeinlagerung, im M-MODE kein Nachweis von Faszikulationen.

Ganzkörper-MRT

Gehirn: Normalbefund: keine frontotemporale oder sonstige Hirnatrophie. Keine okkulten Mikroblutungen.

Herz: Normalbefund

Muskeln: deutlich auffällig. Hier zeigten sich ausgedehnte Atrophien mit fettiger Degeneration, wobei die verschiedenen Muskelgruppen unterschiedlich stark betroffen waren.

Skelettszintigraphie

Mineralisationsphase (spätstatisch): Fokale Mehrbelegung in Projektion auf das Sternum, Übergang Manubrium/Corpus sterni. Darüber hinaus Mehrbelegung der SC- und AC-Gelenke beidseits sowie diskrete Mehrbelegung der Tuberositas tibiae links. Etwas inhomogene Erhöhung des Knochenstoffwechsels der Wirbelsäule; in den zur weiteren Abklärung angefertigten SPECT/CT-Aufnahmen waren die Mehrspeicherungen überwiegend exzentrisch im Bereich der Wirbelkörper-Randleisten bzw. im Bereich der kleinen Wirbelgelenke lokalisiert. Ansonsten physiologische und altersentsprechende Radionuklidanreicherung. Kein Hinweis auf M. Paget.

Neurophysiologie:

EMG:

M. tibialis anterior rechtsseitig: Eindeutig pathologische Spontanaktivität in Form von positiv scharfen Wellen, Fibrillationspotentialen und einzelnen Faszikulationen, zusätzlich myopathisch veränderte Potentiale im Sinne einer deutlich vermehrten Polyphasie, zum Teil etwas verkürzt und amplitudenreduziert, bei amplitudenreduziertem, aber nicht gelichtetem Interferenzmuster der Muskelaktionspotentiale.

Tabelle 7 Neurographie

Muskel	DML [ms]		NLG [m/s]		Amplitude	
		Norm		Norm		Norm
N. medianus rechts	3,5	2,6-4,3	52	49-70	8 mV	7-40 mV
N. tibialis rechts	4,5	3,0-5,2	40	41-55	5 mV	5-22 mV
N. suralis rechts (orthodrom)			42	45-68	5 µV	10-26 µV

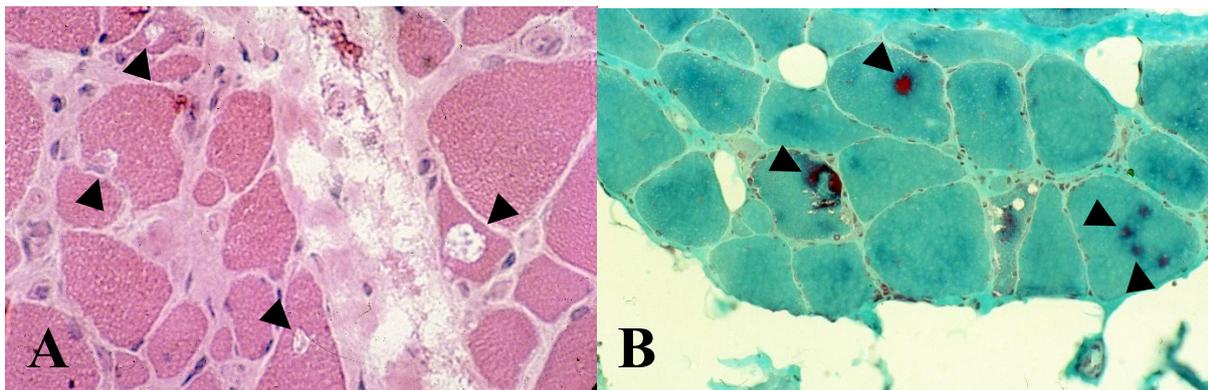
4.1.5 Histologische Charakterisierung

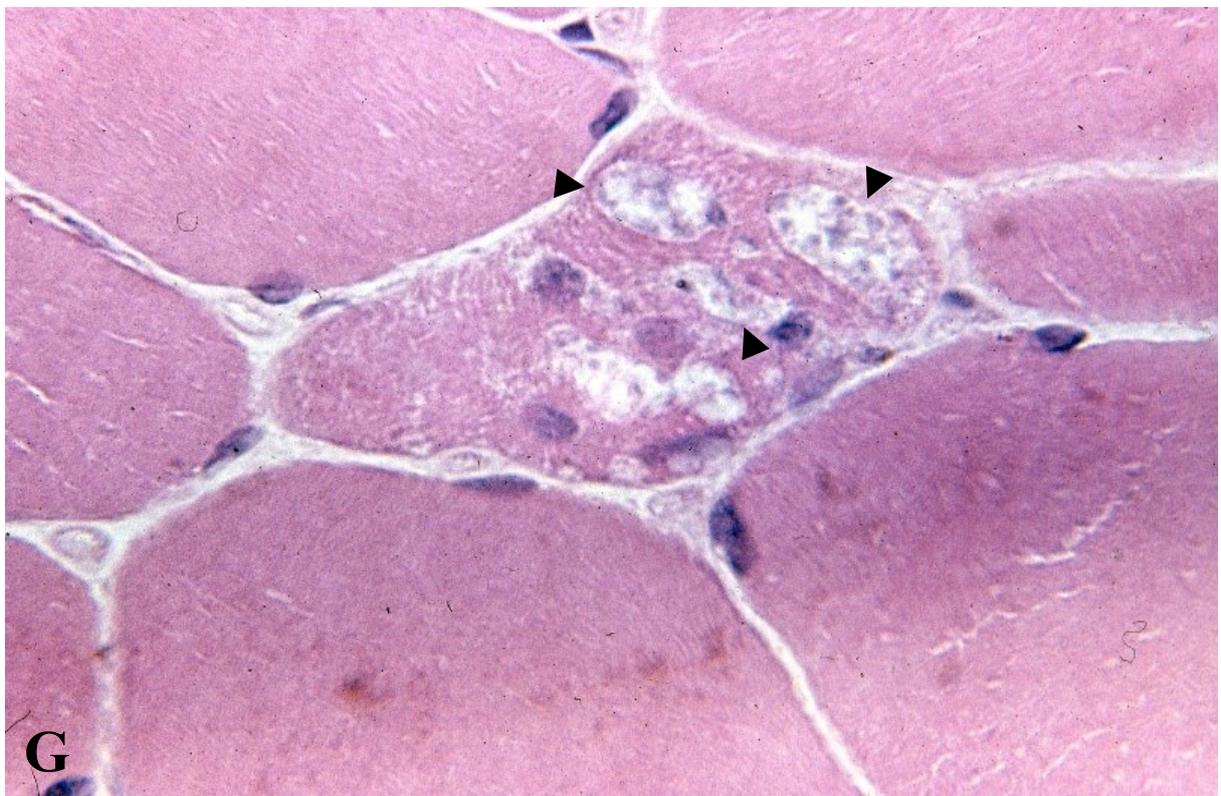
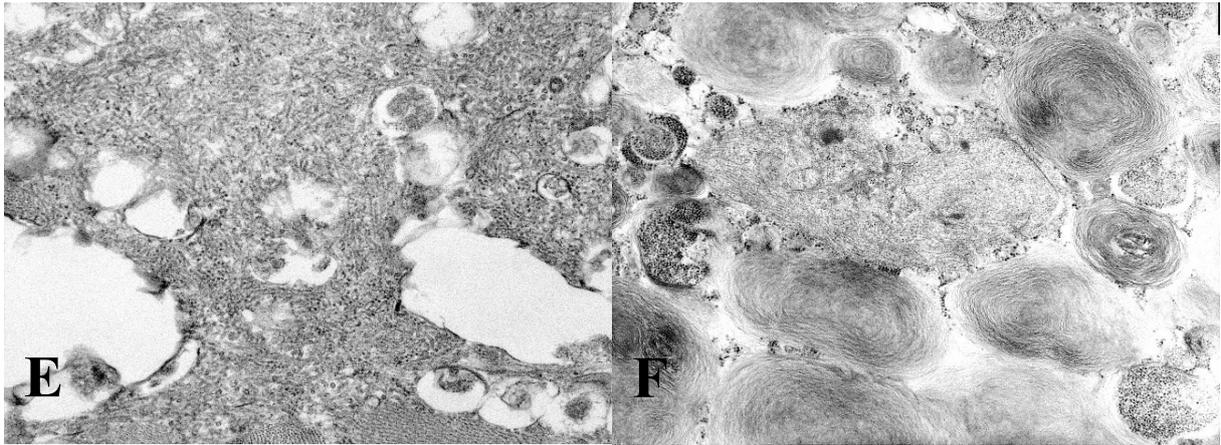
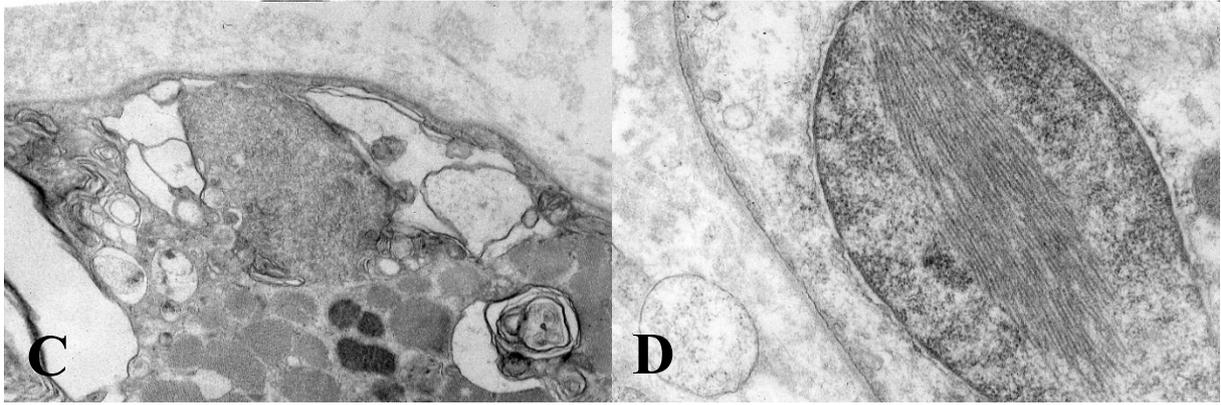
Ein weiterer wichtiger Schritt in der Diagnosefindung ist die histologische Untersuchung des Muskels des Patienten. Hierfür wird meist eine offene Biopsie (Hautschnitt, Darstellung des Muskels und Gewebeentnahme) unter Lokalanästhesie eines von der Erkrankung besonders betroffenen Muskels durchgeführt. Es ist auch möglich, eine weniger invasive Stanzbiopsie mittels Biopsienadel zu entnehmen, wobei hier nur relativ geringe Mengen an Muskelzellen entnommen werden können.

Eine Muskelbiopsie ist immer beim Verdacht auf eine Myositis indiziert. Andere Indikationen sind die histologische Sicherung metabolischer Myopathien und mitochondrialer Erkrankungen. Myopathien, die genetisch aus EDTA-Blut gesichert werden können, sollen nicht primär über eine Muskelbiopsie diagnostiziert werden.

Nachfolgend ist die histologische Charakterisierung des Patienten-Muskels mit verschiedenen Techniken und Färbungen dargestellt. Es zeigten sich neben sogenannten „rimmed vacuoles“ in verschiedenen Größen, zytoplasmatische Einschlüsse und multiple Vakuolen in der Muskelfaser in der Lichtmikroskopie sowie immunhistochemisch β -Amyloid- und Tauprotein-Einschlüsse.

In der Elektronenmikroskopie zeigten sich Myelin-ähnliche Strukturen um tubulofilamentäre Einschlüsse, ein verflochtenes Netzwerk an Tubulofilamenten sowie deren Einschlüsse in der Zellkernmatrix und autophagozytäre Vakuolen mit Tubulofilamenten innerhalb des Nukleus (siehe Bilder).





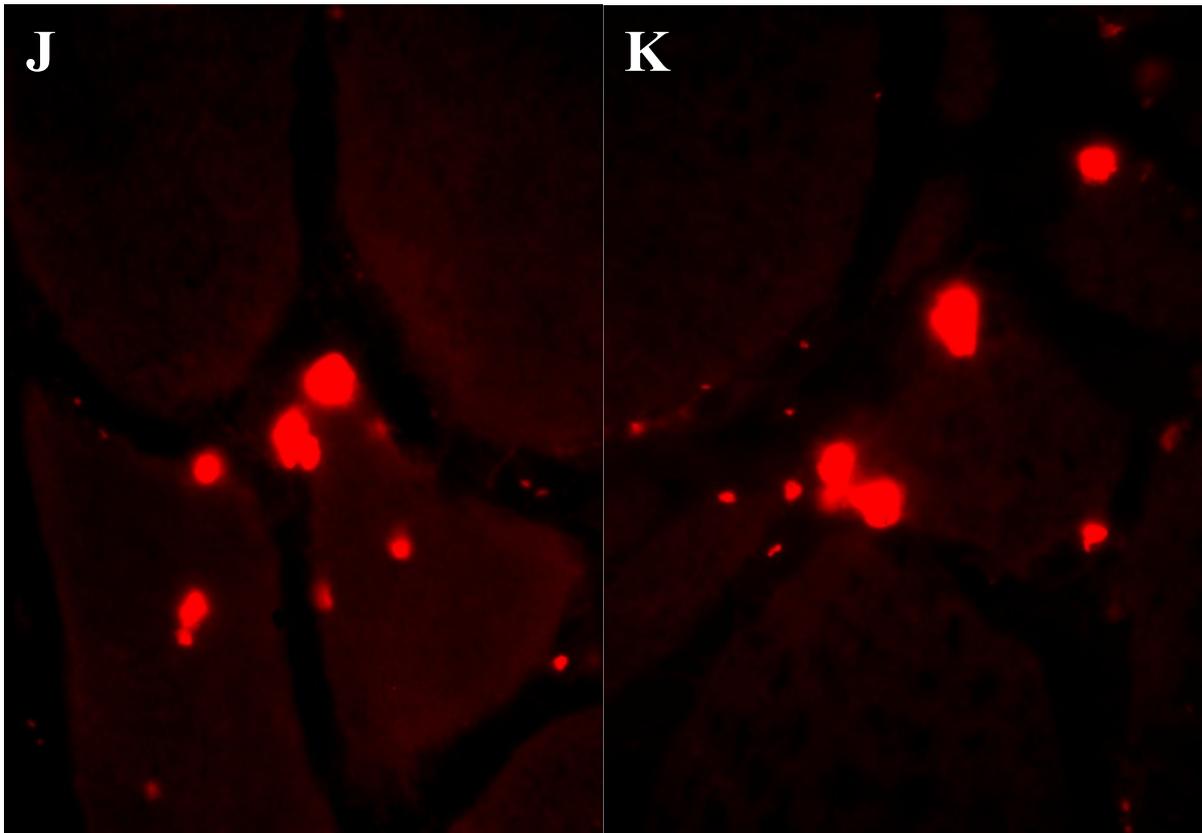
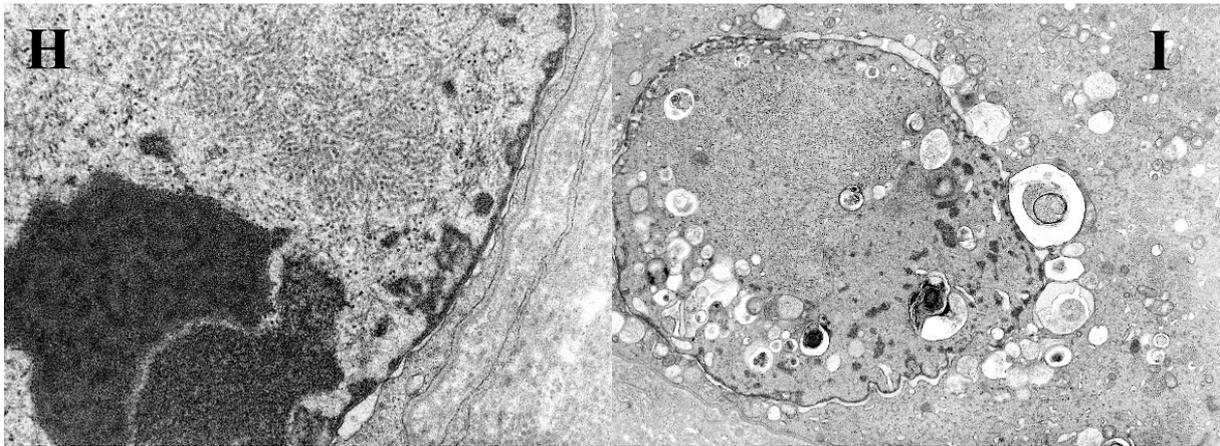


Abbildung 7 Histologische Charakterisierung des Patienten mit Mutation D262N

Histologische Charakterisierung des Patienten mit Mutation D262N mit verschiedenen Techniken und Färbungen

(A) Muskelfasern mit verschiedenen Größen mit „rimmed vacuoles“ zentral und peripher lokalisiert (◄), HE, Vergrößerung: 224x; (B): rotgefärbte zytoplasmatische Einschlüsse (◄), Gomori Trichrom, Vergrößerung: 224x; (C): Myelin-ähnliche Strukturen um tubulofilamentäre Einschlüsse (◄), EM, Vergrößerung: 9.000x; (D): mit Tubulofilamenten bedeckte nukleäre Matrix, EM, Vergrößerung: 30.000x; (E): verflochtenes Netzwerk an Tubulofilamenten, EM, Vergrößerung: 6.000x; (F): Konglomerat aus Myelin-ähnlichen Wirbel mit zentral lokalisierten

tubulofilamentären Einschlüssen, EM, Vergrößerung: 36.000x; **(G)**: multiple Vakuolen innerhalb einer Muskelfaser (**◀**), HE, Vergrößerung: 448x; **(H)**: tubulofilamentäre Einschlüsse innerhalb der nukleären Matrix, EM, Vergrößerung 6.000x; **(I)**: autophagozytäre Vakuolen mit Tubulofilamenten innerhalb eines degenerierten Nukleus, EM, Vergrößerung 18.000x; Immunhistologische Analyse **(J)**: zytoplasmatische β -Amyloid Einschlüsse, Vergrößerung 448x; **(K)**: phosphoryliertes Tau-Protein, Vergrößerung 448x

4.1.6 Sequenzanalyse

Bei 196 Patienten wurde mittels Sanger Sequenzierung des *HNRNPA1*-Gens (GenBank: **NM_002136.4**, Ensembl Gene ID: **ENSG00000135486**, Ensembl transcript ID: **ENST00000546500**) auf Mutationen untersucht. Bei einem Patienten konnte eine heterozygote Punktmutation c.784 G>A im Exon 9 als Ursache für eine autosomal dominante hereditäre Einschlusskörpermyopathie gesichert werden.

Die Punktmutation c.784 G>A (NM_002136.2:c.784G>A) führt zu einem Aminosäureaustausch p.D262N, in dem Asparaginsäure (D) gegen Asparagin (N) ausgetauscht wird. Die Mutation, welche zu einer Missense-Variante **rs397518453** von *hnRNPA1* führt, ist in Zusammenhang mit amyotropher Lateralsklerose beschrieben (Kim et al., 2013), als Ursache für eine hereditäre Einschlusskörpermyopathie ist dies die Erstbeschreibung. Die Position liegt bei chr12:54283844 (GRCh38.p12) und die kanonische SPID lautet **NC_000012.12:54283843:G:A**. In den Datenbanken ExAC und gnomAD konnte sowohl unter dem Gennamen *HNRNPA1* also auch unter der Ensembl transcript ID: **ENST00000546500** und der Ensembl protein ID: [ENSP00000448617.1:p.Asp262Asn](#) jeweils nur eine Minor allele frequency (MAF) von 0,00 gefunden werden. Auch die dbSNP Analyse bei NCBI ergab sich eine Minor allele frequency von A=0.00 in allen verfügbaren Daten (PAGE_STUDY und ALFA).

Tabelle 8 Frequenzen der HNRNPA1 Gen Variante in Kontrolldatensätzen

	Anzahl an Proben	c.784 G>A (p.Asp262Asn)
gnomAD¹⁾	141.456	0
ESP²⁾	6.503	0
1000G³⁾	3.202	0

¹⁾gnomAD: im Rahmen von verschiedenen erkrankungsspezifischen und populationsgenetischen Studien sequenzierte Exome oder Genome von unverwandten Individuen (Lek et al., 2016)

²⁾ESP: Exome von Individuen mit Herz-, Lungen- und Bluterkrankungen (Fu et al., 2013)

³⁾1000G: Genome von Individuen, welche sich selbst zum Zeitpunkt der Probenentnahme als gesund beschrieben haben (Sudmant et al., 2015)

Sequenzvariante im *HNRNPA1*-Gen

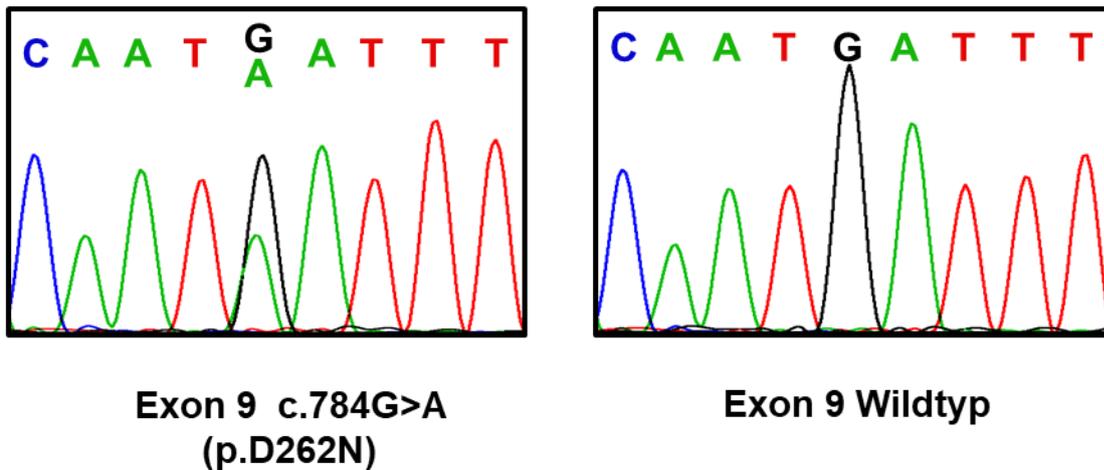


Abbildung 8 Chromatogramm der Mutation c.784G>A

Schematische Darstellung der heterozygoten Ex 9 c.784G>A p.D262N Mutante (linkes Chromatogramm) und des Wildtyps (rechtes Chromatogramm).

Die Mutation D262N liegt innerhalb der Prion-like Domäne (PrLD), welche eine Domäne geringer Komplexität ist und ihren Namen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Hefeprionen trägt. Die meisten RNA-bindenden Proteine mit einer Prion-like Domäne sind mit menschlichen Erkrankungen vergesellschaftet, insbesondere neuromuskulären Erkrankungen. Die Prion-like Domäne ist essenziell für die Bildung der RNA-Granula. Durch Mutationen in diesem Bereich wird die Bildung von Stressgranula durch deren zytoplasmatische Fehllokalisierung und beschleunigte Fibrillen-Bildung des mutierten Proteins verändert (Picchiarelli & Dupuis, 2020).

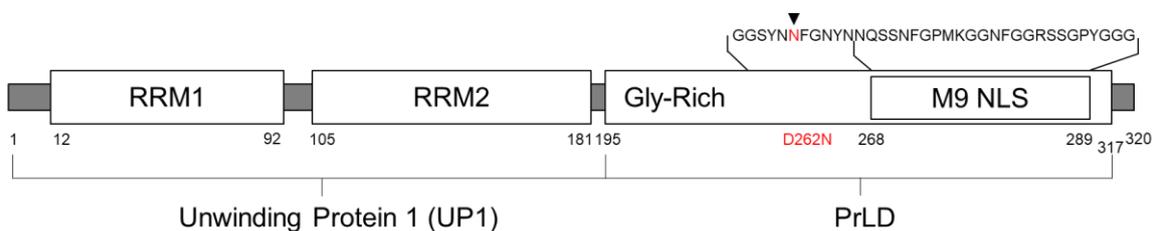


Abbildung 9 Lokalisation der D262N-Mutante des Patienten

Lokalisation der D262N-Mutante des Patienten (Pfeil ►) im heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a [Homo sapiens], NP_002127.1; RRM = RNA recognition motif, Gly-Rich = glycin-reiche Domäne, PrLD = „prion-like domain“, NLS = Nuclear localization signal

Um die phylogenetische Relevanz der hier beschriebenen Mutation D262N zu beurteilen, wurde eine datenbankgestützte Analyse bei verschiedenen Organismen durchgeführt. Im Allgemeinen gilt, je konservierter eine bestimmte DNA-Sequenz bei Organismen verschiedener Spezies ist, desto mehr wurde sie durch natürliche Selektion beibehalten und umso essenzieller scheint sie für die Funktion der Zelle zu sein. Die Aminosäure Asparaginsäure ist an Position 262 der Prion-like Domäne innerhalb verschiedener Spezies und ebenso in der menschlichen Prion-like Domäne hochkonserviert (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Alignment der Aminosäuresequenz des hnRNPA1 Proteins verschiedener Spezies

Prion-like Domain (PrLD)

		D262N	
Mutated	GGGGSYN	▼ N	FGNYNNQSSNF
Human	GGGGSYN	D	FGNYNNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYF
<i>Pan troglodytes</i>	GGGGSYN	D	FGNYNNQSSNF
<i>Macaca mulatta</i>	GGGGSYN	D	FGNYNNQSSNF
<i>Mus musculus</i>	GGGGSYN	D	FGNYNNQSSNF
<i>Xenopus tropicalis</i>	GGGGSYN	D	FGNYNQ
black flying fox	GGSGSYN	D	FGN-YN-NQSSDFGPMKG---ENFRG-RSSG-PYSSG
african savanna elephant	GGG-SYN	D	FGN-YN-QQPSNYGPMKS---GNFGGSRNMGgPYggg
zebrafish	GGGNYN	D	FGN-YN-SQQSNYGPMKG---NFGGGgRNSG-PYGGG
red-bellied piranha	GGGNGYS	D	FGSgYG-QQSSGYGPMKGg--NTYGG-RSGA-PYPRG

Die Aminosäure D262 ist über Speziesgrenzen hinweg in allen Prion-like Domänen hoch konserviert, sowie auch im menschlichen Proteinabschnitt. Die Proteinsequenzen wurden der NCBI-Datenbank und der Analyse der MutationTaster Applikation entnommen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam11627> (<http://www.mutationtaster.org>)).

4.2 Funktionelle Analyse der Mutation *hnRNPA1* D262N

Unter der Annahme die Punktmutation c.784G>A sei die pathogenetische Ursache der autosomalen hereditären Einschlusskörpermyopathie, wurde eine Analyse der Sequenz mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Algorithmen, u. a. der MutationTaster-Applikation (<http://www.mutationtaster.org>) durchgeführt, und *in silico* datenbankgestützt eine Pathogenitätsprognose berechnet (Grundlage war auch hier die Ensembl protein ID:

[ENSP00000448617.1:p.Asp262Asn](#)). Die automatische Vorevaluation der Sequenzvariationen kann für die darauffolgende tatsächliche Analyse im „Wet lab“ entscheidende Hinweise für einen Erfolg des Nachweises geben und so Zeit und Ressourcen sparen. In die Berechnung des Pathogenitätspotentials fließt hier die phylogenetische Konservierung, die möglichen Änderungen der Spleißstellen, der Verlust von Eigenschaften des Proteins und Veränderungen, die eine Auswirkung auf die Menge der mRNA haben könnten, mit ein (Schwarz et al., 2010). Die Analyse für die Mutation 784G>A ergab die Vorhersage „disease causing“. Es wurde ebenfalls eine Änderung der Spleißstelle und eine (mögliche) Änderung der Proteineigenschaften vorhergesagt.

Tabelle 10 Ergebnisse der bioinformatischen Analyse mit verschiedenen Algorithmen für den p.Asp262Asn-Aminosäureaustausch

	c.784 G>A (p.Asp262Asn)
PROVEAN prediction (score) ¹⁾	Deleterious (-2,63)
SIFT prediction (score) ²⁾	Tolerated (0,116)
PolyPhen-2 prediction (score) ³⁾	Benigne (0,007)
CADD prediction (phred-like score) ⁴⁾	Damaging (24)
SNAP2 prediction (score) ⁵⁾	Effect (31)
MutationAssessor prediction (score) ⁶⁾	Low (0,482)
VEST3 (score) ⁷⁾	Pathogenic (0,4)
MutationTaster2 prediction (score) ⁸⁾	Disease causing (0,993)
PMut prediction (score) ⁹⁾	Disease (0,63)
GERP++ score ¹⁰⁾	4,06
PhastCons100way score ¹¹⁾	1,00

¹⁾PROVEAN ein Score gleich oder kleiner -2,5 wird als „deleterious“ betrachtet (Choi et al., 2012)

²⁾bei Scores $\geq 0,05$ wurde die Prognose „Tolerated“ vergeben, $< 0,05$ wurde der Score als „Damaging“ klassifiziert (Kumar et al., 2009)

³⁾PolyPhen-2 Scores $\leq 0,446$ werden als „Benign“ eingestuft (Adzhubei et al., 2010)

⁴⁾CADD (1.6 Score) phred-like rank scores über 15 (für eine etwas konservativere Einschätzung über 20) werden als „damaging“ betrachtet (Kircher et al., 2014)

- ⁵⁾Der SNAP2 Score liegt zwischen -100 mit starker neutralen Vorhersage und +100 mit starker Effekt (Hecht et al., 2015)
- ⁶⁾ Der MutationAssessor hat einen Score zwischen -5,14 und 6,49, wobei höhere Scores eine höher Wahrscheinlichkeit eines funktionellen Effekts der Variante anzeigen, Die Cutoff-Werte von Vorhersagen mit der Klassifikation „neutral“, „low“, „medium“ und „high“ sind 0,8, 1,94 und 3,50 (Reva et al., 2011)
- ⁷⁾Der VEST3 Score liegt zwischen 0 und 1. Je höher der Score ist umso wahrscheinlicher wird die Variante eine funktionelle Veränderung verursachen (Carter et al., 2013)
- ⁸⁾Der Wahrscheinlichkeitswert des MutationTasters2 ist die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage, d. h. Werte nahe bei 1 geben eine hohe „Sicherheit“ der Vorhersage an (Schwarz et al., 2010)
- ⁹⁾ Der PMut Algorithmus gibt einen Vorhersagescore zwischen 0 und 1 an; Varianten zwischen 0 und <0,5 werden als „neutral“, zwischen 0,5 und 1 als „disease“ klassifiziert (Lopez-Ferrando et al., 2017)
- ¹⁰⁾GERP++ schätzt den evolutionären Druck auf spezifische Positionen in 36 Säugetierspezies. Der Score liegt zwischen -12,36 und 6,18 wobei höhere Scores eine eher konservierte Stelle anzeigen (Hecht et al., 2015)
- ¹¹⁾Der PhastCons Conservation Score basiert auf multiplen Alignments von 100 Genomen von Wirbeltieren. Die Scores liegen zwischen 0 und 1, wobei höhere Werte bedeutet, dass die Stelle stärker konserviert ist (Pollard et al., 2010)

Um die Mutation D262N funktionell zu charakterisieren, wurde sie kloniert (Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1) und das mutierte Konstrukt in C2C12 Zellen exprimiert. Dafür wurde zuerst die Mutation durch eine ortsgerichtete Mutagenese in den Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 eingeführt. Die Mutagenese-strategie ist in Kapitel 3.7 ausführlich beschrieben. Die neueingeführte Punktmutation 784G>A wurde mit direkter Sequenzierung bestätigt. Der entstandene Vektor wurde mittels Sequenzierung auf die vorhandene Mutation untersucht und wies diese wie gewünscht auf (siehe Abbildung).

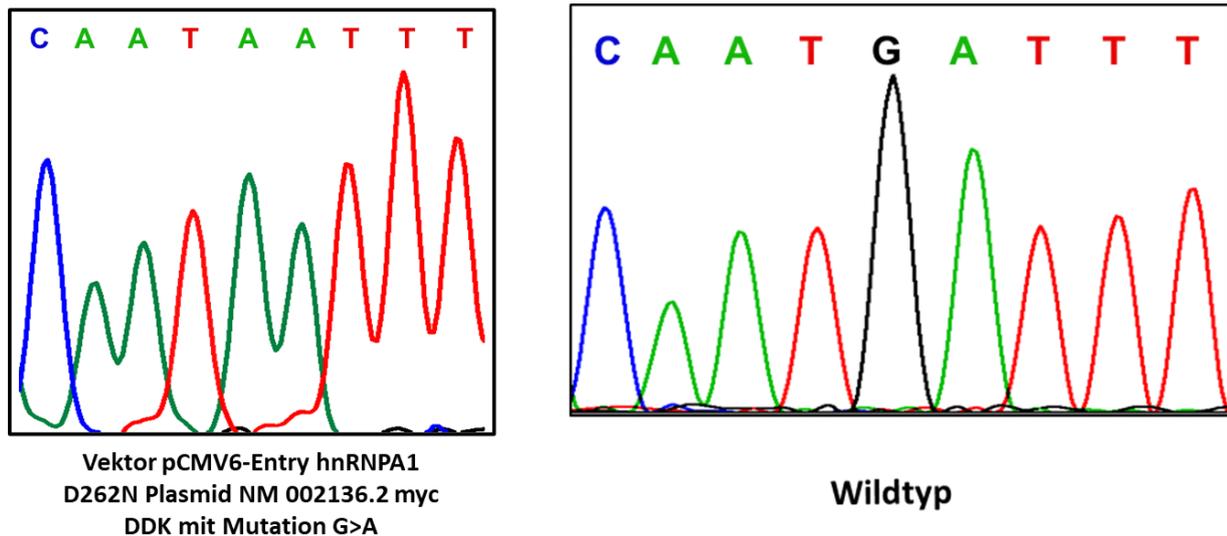


Abbildung 10 Sequenz des Plasmids mit eingeführter Mutation

Sequenz des Plasmids an der Stelle der eingeführten Mutation c.784G>A verglichen mit dem Wildtyp

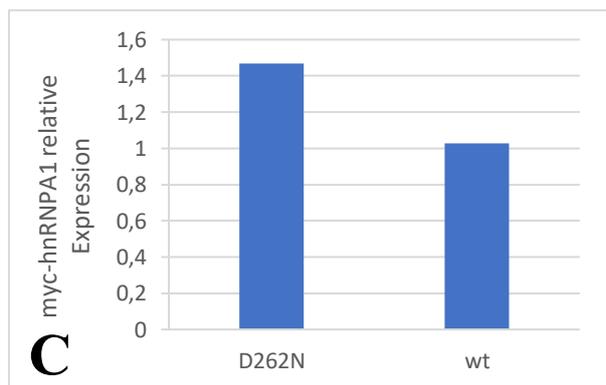
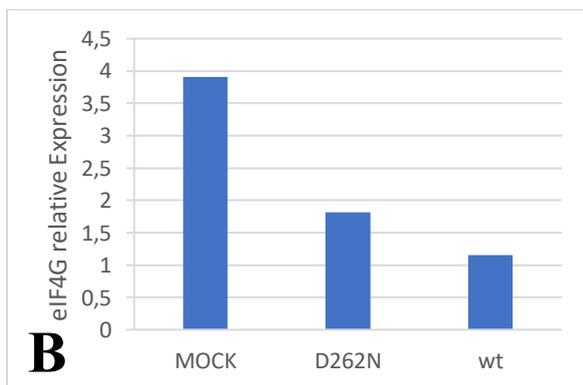
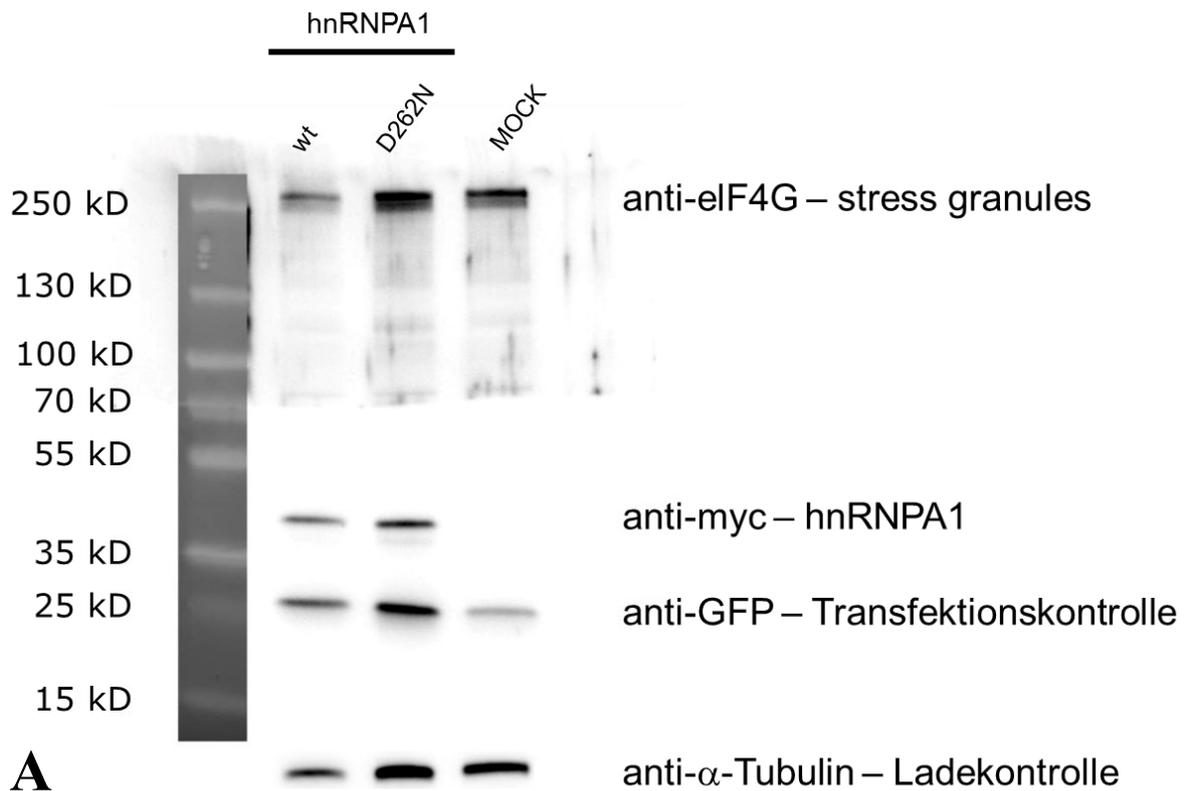
4.2.1 Westernblotanalyse

Anschließend wurden der Vektor mit Protein mit und ohne Mutation in C2C12 Zellen transfiziert, und mit MOCK-C2C12 Zellen (Transfektion mit Leervektor), welche als Kontrolle dienen, verglichen. Das hieraus gewonnene Protein wurde weiter im Westernblot untersucht.

Aufgrund eines fehlenden zuverlässigen Antikörpers gegen hnRNPA1 wurde, sowohl für den Westernblot als auch für die Immunfluoreszenz, der sehr zuverlässige und etablierte anti-myc-Tag Antikörper verwendet. Der zuerst verwendete kommerzielle anti-hnRNPA1 (K350) Antikörper zeigte keine Bindung, weder im Westernblot noch in der Immunfluoreszenz-Färbung. Die Transfektion gestaltete sich als weniger effizient als bei bisherigen Transfektionen, was der Größe des Vektors (5841 bp) zugeschrieben wurde.

Die Analyse im Westernblot ergab trotzdem ein zufriedenstellendes Transfektionsergebnis bei der Zellernte nach 24 Stunden. Als Marker für die Transfektionskontrolle wurde GFP, für die MOCK C2C12 Zellen der Leervektor und zum Nachweis für die Anwesenheit von Stressgranula eIF4G als Marker-Färbung verwendet (Gonzalez-Almela et al., 2018; Kedersha et al., 2005). Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Auswertung des Westernblots ergab in Bezug auf die Bildung von Stressgranula die höchste relative Expression in den MOCK Zellen, gefolgt von den Zellen mit der Mutante D262N und dem Wildtyp. Die Transfektionsrate zeigte sich anhand des GFPs in den Zellen mit der Mutante D262N am stärksten, gefolgt von den Wildtypzellen und von den MOCK Zellen. Die relative Expression des transfizierten Proteins war in den Zellen mit der Mutante D262N ein Drittel höher als in den Wildtypzellen (siehe Abbildung).



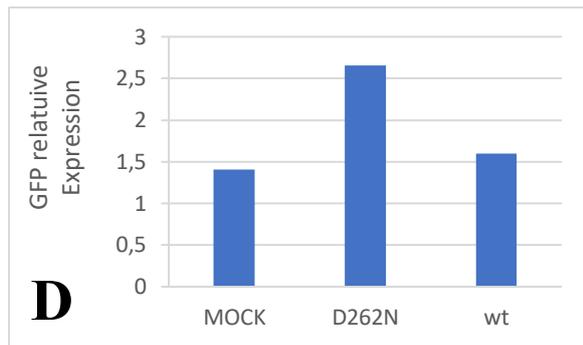


Abbildung 11 Westernblotanalyse

Westernblot der C2C12 Zellen 24 h nach Transfektion, 10 µg Gesamtprotein/Lane (A), mit Auswertung der relativen Expression von eIF4G (B), myc-hnRNPA1 (C) und GFP (D); die relative Expression wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt (Schneider et al., 2012).

4.2.2 Immunfluoreszenzanalyse

Nach den Westernblotanalysen des hnRNPA1 wurde eine Immunfluoreszenzanalyse der mit dem Vektor pCMV6-Entry hnRNPA1 Plasmid NM 002136.2 myc DDK transfizierten C2C12 Mausmyoblasten durchgeführt (Kim et al., 2007). Hier lag das Augenmerk auf der intrazellulären Lokalisation von hnRNPA1. Für die immunzytochemische Analyse von hnRNPA1 wurde ein anti-myc-Tag Antikörper, für eIF4G als Marker für Stressgranula ein anti-eIF4G Antikörper und zur Färbung des Zellkerns DAPI verwendet. Die Zellen wurden auf 8-well Objektträgern ausgesät und 24 h nach Transfektion mit dem Wildtyp und der Mutante D262N immunfluoreszenzgefärbt. Nach den bisherigen Ergebnissen sollte die Mutante die Bildung von Stressgranula in den betroffenen Zellen steigern. Es konnte hier bei der Mutante D262N im Vergleich mit dem Wildtyp eine größere Anzahl an Stressgranula, sowie ein größerer Durchmesser der Stressgranula nachgewiesen werden. Außerdem zeigt sich eine größere Menge an hnRNPA1 D262N Mutante innerhalb der Stressgranula als bei Zellen mit Transfektion des Wildtyps (siehe Abbildung).

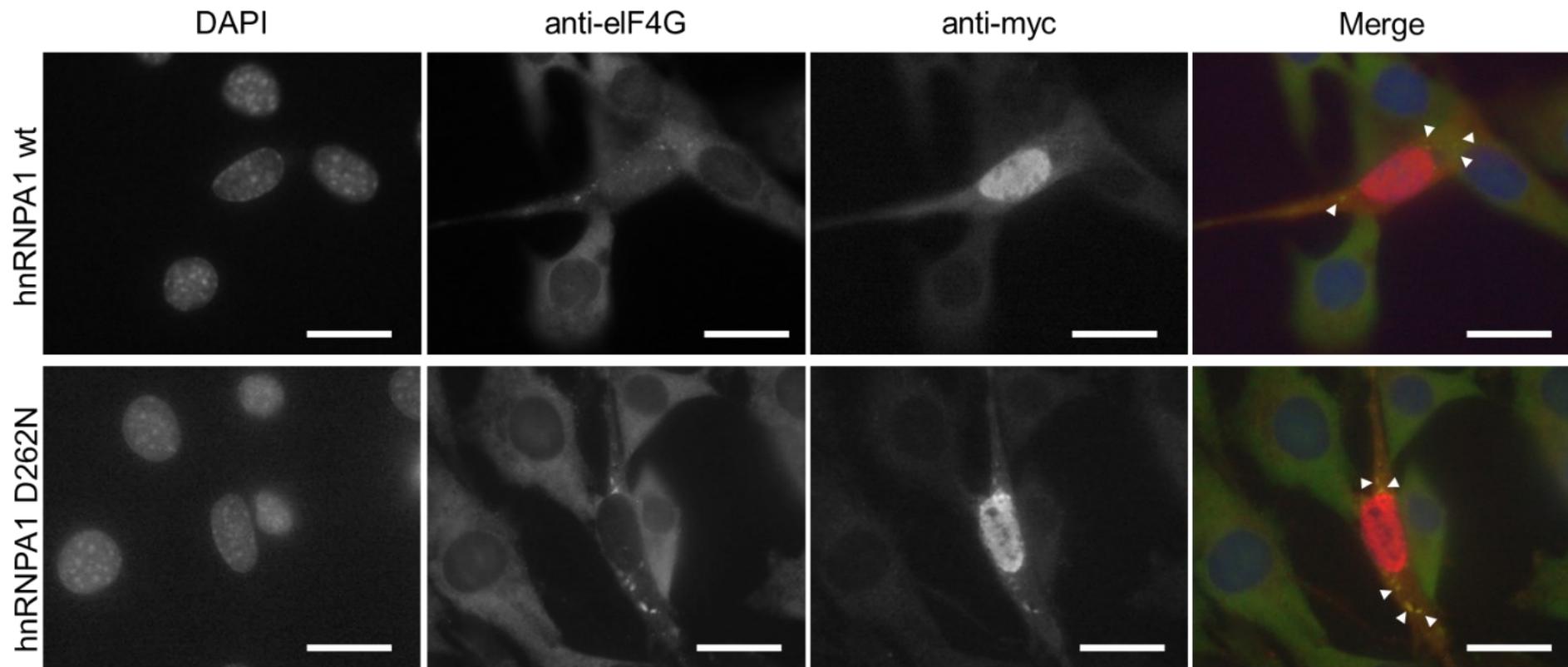


Abbildung 12 Konfokalmikroskopische Analyse der transfizierten C2C12 Zellen

Die mit der hnRNPA1(D262N)-Mutante transfizierten Zellen akkumulierten verstärkt *in vitro* eIF4G positiven Aggregate (Stressgranula), Maßstabsbalken 20 μm .

Tabelle 11 Übersicht einer Analyse der transfizierten C2C12 Zellen

	Wildtyp	D262N
Transfektionseffizienz	30-40%	20-30%
Granula pro myc-positiver Zelle	5-10	15-20
Größe der Granula (μm)	7-15	10-18
Zeitverlauf/Dynamik der Proteinakkumulation	24 h	24 h

Des Weiteren wurde bei transfizierten C2C12-Zellen (MOCK, Wildtyp und D262N-Mutante) untersucht, ob ein Hitzeschock von 42°C für eine Stunde, den in Abbildung 12 gezeigten Proteinakkumulationsphänotyp der D262N-Mutante verstärkt. Im Vergleich zu den in Abbildung 12 gezeigten Zellen, konnte beim Hitzeschock keine weitere Zunahme von Größe und Anzahl an Stressgranula beim Wildtyp und der D262N-Mutante festgestellt werden. Die Morphologie der Zellen ließ zudem nicht auf einen zytotoxischen Effekt des Hitzeschocks schließen.

5 Diskussion

5.1 Genotypen der Multisystemproteinopathie

Für das breite Spektrum der möglichen Pathomechanismen bei den Multisystemproteinopathien ist eine fortwährende Forschung im Hinblick auf weitere Pathomechanismen, mögliche neue Therapieansätze und nicht zuletzt die schnelle Diagnostik und die diagnostische Gewissheit für die Patienten, ein essenzieller Bestandteil der heutigen Routine des Faches Neurologie (Korb et al., 2021). Es ist bereits nachgewiesen, dass Mutationen in Prion-like Domänen von hnRNPs neurodegenerativen Erkrankungen ätiologisch zugrunde liegen, insbesondere verursachen Mutationen in hnRNPA2B1 eine Multisystemproteinopathie und Mutationen in hnRNPA1 eine amyotrophe Lateralsklerose (Kim et al., 2013).

Nach molekulargenetischem Screening von über 200 Patienten mit degenerativen neuromuskulären Syndromen und Erweiterung des Genotyp-Phänotyp-Spektrums konnte ein Patient mit pathogener *HNRNPA1*-Mutation identifiziert werden (Abbildung 8). Die bisher beschriebenen Mutationen scheinen sehr selten zu sein, weshalb manche Arbeitsgruppen auch bei groß angelegten Screenings von Patienten mit Multisystemproteinopathien und amyotropher Lateralsklerose sowie Frontotemporaler Demenz keine dieser beschriebenen Mutationen nachweisen konnten (Seelen et al., 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei einer größeren Kohorte nur eine der beschriebenen Mutationen gefunden werden. Dies ist, neben einer schnelleren Routinediagnostik und einer (falls möglichen) therapeutischen Expertise, ein weiteres Argument, um besonders diagnostisch schwierige Patienten mit möglichen Erkrankungen aus diesem Formenkreis an speziellen Zentren zu bündeln. Hier sind die Voraussetzungen mit entsprechender Infrastruktur und standardisierten Abläufen für die Diagnostik auch seltener Fälle besonders gegeben.

Im vorliegenden Fall konnte nur anhand einer ausführlichen und sehr zeitaufwendigen Anamnese, invasiver und nicht-invasiver Diagnostik sowie durch aktuelle Forschungsergebnisse eine Diagnose und die zugrundeliegende Ursache gefunden werden. So ergab der Stammbaum des Patienten den Anhaltspunkt eines autosomalen Erbgangs (Abbildung 6), wobei die erbliche Einschlusskörpermyopathie als Untergruppe der Multisystemproteinopathie mit autosomal-rezessiven oder autosomal-dominanten Erbgängen vorkommt (Broccolini & Mirabella, 2015). Es liegen in dieser Arbeit leider keine Proben der anderen Familienmitglieder zur Analyse vor,

sodass sich die Bestimmung des autosomal dominanten Erbgangs auf den Stammbaum und die Sequenzanalyse des Patienten stützt.

Die bisher bekannten Gene zur Diagnostik bei Multisystemproteinopathie sind Valosin-containing Protein (*VCP*) (Watts et al., 2004), heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A2B1 und A1 (*HNRNPA2B1* und *HNRNPA1*) (Kim et al., 2013), Sequestosome 1 (*SQSTM1*) (Bucelli et al., 2015; Hocking et al., 2002), Matrin 3 (*MATR3*) (Zhang et al., 2019), T-cell restricted intracellular antigen 1 (*TIA1*) (Hackman et al., 2013) und Optineurin (*OPTN*) (Obaid et al., 2015). 2013 wurde die Gruppierung der genetischen Erkrankungen der Multisystemproteinopathien unter den Aspekten der *VCP*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPA1* Mutationen als MSP 1-3 (Benatar et al., 2013) klassifiziert. Diesbezüglich kamen später für *SQSTM1* Mutationen die MSP 4 und für *MATR3* Mutationen die MSP 5 hinzu (Bucelli et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Aktuell wird geschätzt, dass Missense-Mutationen in *VCP* ungefähr bei der Hälfte der Multisystemproteinopathie Familien vorliegen (Le Ber et al., 2014). In der Analyse des *VCP*-Gens zeigten sich bei dem Patienten eine Reihe von Einzelnukleotid-Variationen (SNV) (Tabelle 8), welche in der Literatur bereits beschrieben wurden (Donath et al., 2015; Wang et al., 2019), und in dbSNP als benigne eingestuft werden. Deshalb wurden diese SNVs nicht in den Pathomechanismus bei diesem Patienten miteinbezogen.

5.2 Klinische Symptomatik bei Multisystemproteinopathie

5.2.1 Körperliche Untersuchung

In der Literatur ist das beschriebene Bild einer Multisystemproteinopathie nicht einheitlich. Es kristallisiert sich jedoch ein Symptomkomplex heraus, wobei insbesondere das Durchschnittsmanifestationsalter von 43 Jahren (Al-Obeidi et al., 2018; Mehta et al., 2013), Verlust der Gehfähigkeit (Evangelista et al., 2016), Atrophie der proximalen Muskulatur, und der intrinsischen Handmuskulatur, eine Fußheberschwäche und eine Scapula alata sowie die gelegentliche Beteiligung der Gesichtsmuskulatur zu nennen sind (Chan et al., 2012; Figueroa-Bonaparte et al., 2016; Hubbers et al., 2007; Kimonis et al., 2000; Kimonis et al., 2008; Mehta et al., 2013; Miller et al., 2009). Klinisch präsentierte sich der Patient mit den Symptomen des Manifestationsalters mit 43 Jahren, der Atrophie sowie Parese der proximalen Muskulatur von Armen (*M. biceps brachii*-Atrophie beidseits) und Beinen (deutliche *M. vastus lateralis*- und *M. vastus medialis*-Parese mit Atrophie) sowie der intrinsischen Handmuskulatur, der Fußheberparese, der Scapula

alata und einem paretisch hinkenden Gangbild mit Trendelenburgzeichen beidseits. Die Symptome einer Atrophie der tiefen autochthonen Rückenmuskulatur, einer Parese der Fingerstrecker- und Streckermuskulatur Kraftgrad 4/5 nach Janda, einer Großzehenheberparese und volle Kraft der restlichen Oberarmmuskulatur beidseits beschreiben hier nicht das klassische Bild einer Multisystemproteinopathie, wobei fehlende Atrophien im Bereich der Hirnnerven-versorgten Muskulatur keine eindeutige Aussage zulassen.

5.2.2 Laboranalyse

Die Laborwerte zeigen eine mit 1482 U/l mäßig erhöhte (3- bis 10-fach) Gesamt-CK (Creatinkinase) nach körperlicher Schonung über einen Zeitraum von zwei Jahren und erhöhtes Myoglobin 255 ng/ml sowie eine leicht erhöhte LDH (Laktatdehydrogenase) von 269 U/l was primär auf den Untergang von Skelettmuskulatur hindeutet (Chahin & Sorenson, 2009). Ein leicht erhöhtes Troponin I von 0,043 ng/ml ohne Symptomatik eines akuten Koronarsyndroms könnte zusätzlich auf eine Herzmuskelbeteiligung hindeuten, wurde jedoch durch Messung des Troponin I Ultra, also mit einer noch sensitiveren Methode, mit dem Ergebnis <0,05 ng/ml und dem Normalbefund des Herz-MRTs eher widerlegt. Das TSH und die Elektrolyte zeigen sich bei dem Patienten normwertig, was eine endokrine Myopathie unwahrscheinlich macht (Tabelle 6).

5.2.3 Apparative Diagnostik

Die Myosonographie in Multisystemproteinopathien ist eine verlässliche Methode, um eine Diagnose zu stellen. Trotz der hohen Untersucherabhängigkeit dieser Technik wurde in Bezug auf z. B. die Einschlusskörpermyositis eine hohe Spezifität nachgewiesen (Karvelas et al., 2019). Die Myosonographie bei dem Patienten zeigte einen deutlichen Umbau der Muskulatur mit vermehrter Bindegewebeinlagerung im M. tibialis anterior im Vergleich zum M. gastrocnemius.

Dieses Untersuchungsergebnis entspricht den bisher publizierten Ergebnissen, welche eine höhere Echogenität und reduzierte Muskeldicke beschreiben. Demgegenüber steht die Auswahl der untersuchten Muskeln. Der vornehmlich untersuchte Muskel für die Multisystemproteinopathie mit der besten beschriebenen Diskrimination ist der M. flexor digitorum profundus (Karvelas et al., 2019; Leeuwenberg et al., 2020; Vu & Cartwright, 2016), welcher hier nicht

untersucht wurde. In der Literatur ist beschrieben, dass der Muskeldurchmesser bei IBM Patienten verglichen mit Polymyositis- und Dermatomyositispatienten sowie gesunden Kontrollen in allen Muskeln signifikant reduziert ist (Leeuwenberg et al., 2020). Deshalb ist davon auszugehen, dass die Untersuchung des Patienten an den entsprechenden Muskeln M. tibialis anterior und M. gastrocnemius einen aussagekräftigen Befund ergibt.

Die Kernspintomographie ist das wichtigste bildgebende Verfahren bei Muskelkrankheiten (Pipitone, 2016). Der normale Muskel besitzt im MRT eine intermediäre Signalintensität, welche niedriger ist als die von Fett und Knochenmark, allerdings höher als die von Knochen in einer T1-gewichteten Sequenz (Murphy et al., 1986). Die verschiedenen Besonderheiten und Charakteristika der Muskelerkrankungen können mit speziellen Sequenzen gut erfasst und differenziert dargestellt werden. Man erkennt z. B. ein Muskelödem mittels STIR-Sequenz bei Myositiden oder Muskeldystrophien am besten, da die STIR Sequenzen das Fettsignal unterdrücken können und nur Wasser als Quelle der Hyperintensität des Muskels bestehen bleibt. Den fettigen Umbau bei chronischen Muskelerkrankungen erkennt man am besten mittels einer T1-Wichtung (Maurer & Walker, 2015). Eine zusätzliche Gabe von Kontrastmittel kann ergänzende Informationen liefern, z. B. bei Myositiden.

Das MRT ersetzt nicht die Muskelbiopsie, aber es ist besonders hilfreich, wenn klinisch die Auswahl des Biopsieortes schwierig ist (Pipitone, 2016). Die Biopsie sollte aus einem betroffenen Muskel erfolgen, bei dem aber noch kein vollständiger fettiger Umbau erfolgt ist. Weiterhin kann durch das MRT das Verteilungsmuster von Myopathien gut erfasst werden, was zur Eingrenzung mancher hereditärer Myopathien zusätzliche Informationen liefern kann.

Der oben beschriebene Befund des Patienten einer deutlich umgebauten Muskulatur mit vermehrten Bindegewebeinlagerungen in der Myosonographie bestätigte sich in einem durchgeführten MRT, in dem sich ausgedehnte Atrophien mit fettiger Degeneration in verschiedenen Muskelgruppen zeigte. Demgegenüber konnte eine kardiale Beteiligung und eine frontotemporale cerebrale Atrophie ausgeschlossen werden. Somit bestehen zwei weitere Argumente in der Diagnosefindung bei dem Patienten für eine autosomal dominante hereditäre Einschlusskörpermyopathie und gegen eine Einschlusskörpermyositis mit Morbus Paget und frontotemporaler Demenz (IBMPFD).

Bei Patienten mit dem Verdacht auf einen Morbus Paget sollte im Rahmen der Diagnostik eine Szintigraphie mit einem radioaktiv markierten Bisphosphonat (^{99m}Tc) zur Lokalisation weiterer Herde durchgeführt werden, da mit diesem Verfahren bis zu 50% mehr befallene

Areale entdeckt werden können als mit konventionellem Röntgen (Wellman et al., 1977). Betroffene Areale imponieren dann als fokale Mehrspeicherungen, wobei dann allerdings jede Mehrspeicherung zur Bestätigung röntgenologisch als Paget-Befall identifiziert werden muss. Die Skelettszintigraphie wurde bei dem Patienten ohne Hinweis auf einen Morbus Paget (PDB) befundet, obwohl es fokale Mehrbelegungen in den Bereichen des Sternums, am Übergang Manubrium/Corpus sterni, der SC- und AC-Gelenke beidseits, der linken Tuberositas tibiae und der Wirbelsäule gab. In der Wirbelsäule konnten die Mehrspeicherungen durch SPECT/CT-Aufnahmen überwiegend exzentrisch im Bereich der Wirbelkörper-Randleisten bzw. im Bereich der kleinen Wirbelgelenke lokalisiert werden. Die Verteilung der Stellen mit Manifestation des Morbus Paget sind in mehreren Publikationen in absteigender Häufigkeit mit Becken, (lumbaler) Wirbelsäule, Femur, Schädel, Humerus und Tibia beschrieben (Fogelman & Carr, 1980; Guyer, 1981; Khairi et al., 1974; Meunier et al., 1987; Shirazi et al., 1974; Wellman et al., 1977). Herauszustellen ist hier der Befall der kleinen Wirbelgelenke (Facettengelenke) (Altman et al., 1987), welche bei dem Patienten möglicherweise aufgrund des noch jungen Alters als Beginn eines Morbus Paget und noch nicht als manifeste Form zu sehen ist. In der Literatur wird eine Prävalenz 2,3 – 5,4% in der Altersgruppe ab 40 Jahren beschrieben, welche mit zunehmendem Alter ansteigt (Barker et al., 1977).

Die Elektromyographie (EMG) und die Neurographie spielen in der Basisdiagnostik im klinischen Alltag und bei der Entscheidung, ob eine Muskelbiopsie durchgeführt werden sollte, eine wichtige Rolle, indem sie zur Unterscheidung zwischen einer akuten oder chronischen Myopathie sowie zum Ausschluss eines neuropathischen Prozesses beitragen (Blijham et al., 2004; Dalakas, 2015; Nojszewska et al., 2018). Nach den aktuellen Richtlinien zur Diagnostik der Einschlusskörpermyopathie des Europäischen Neuromuskulären Zentrums (ENMC) ist das EMG nicht enthalten (Rose & Group, 2013). Dem gegenüber steht aktuell die nationale S1-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie zur Diagnostik von Myopathien, nach der bei jedem Patienten mit Verdacht auf eine Myopathie eine quantitative EMG-Untersuchung mit Nadelelektroden erfolgen sollte, um neurogene von myopathischen Prozessen zu unterscheiden. Der Nachweis von pathologischer Spontanaktivität, insbesondere den myotonen Entladungen ist hier von großer Bedeutung. Des Weiteren können der pathologischen Spontanaktivität die Fibrillationspotentiale, positiv scharfe Wellen und komplexe repetitive Entladungen zugerechnet werden (Nojszewska et al., 2018). Die bisherigen Studien zeigten eine hohe Inzidenz (56-

100%) von pathologischer Spontanaktivität, d. h. Fibrillationspotentiale, positiv scharfe Wellen, komplexe repetitive Entladungen und myotone Entladungen in den betroffenen Muskeln bei Patienten mit Einschlusskörpermyositis (Brannagan et al., 1997; Julien et al., 1982). Diesen Mustern der pathologischen Spontanaktivität kommen noch polyphasische Aktionspotentiale der motorischen Einheit (Polyphasie) in 32-56% der Patienten hinzu (Needham & Mastaglia, 2016).

In der Elektromyographie des Index-Patienten zeigte sich im M. tibialis anterior eine pathologische Spontanaktivität in Form von positiv scharfen Wellen, Fibrillationspotentialen und einzelnen Faszikulationen. Zusätzlich fanden sich myopathisch veränderte Potentiale im Sinne einer deutlich vermehrten Polyphasie. Diese und die oben beschriebenen Befunde sind zwar unspezifisch, jedoch sind sie typisch für die Einschlusskörpermyopathie und sollten entsprechend gewürdigt werden (Needham & Mastaglia, 2016).

Bei dem Patienten zeigte sich in der Untersuchung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) (Tabelle 7) keine Abweichung der distalen motorischen Latenz (DML), der Nervenleitgeschwindigkeit oder der Reizantwortamplitude der gemischt motorisch-sensiblen Nerven N. medianus und N. tibialis. Bei dem rein sensiblen Nerven N. suralis fand sich eine leicht reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit und Amplitude. Die gleichen Befunde von pathologischen Nervenleitgeschwindigkeiten, insbesondere von sensorischen Aktionspotentialen mit niedriger Amplitude und erniedrigter motorischer Nervenleitgeschwindigkeit wurden in Studien in bis zu 32% der Patienten gefunden (Dimachkie & Barohn, 2014), allerdings waren diese Veränderungen für gewöhnlich subklinisch. In der Literatur wurden bereits Fallserien von sIBM Patienten mit elektrophysiologischen und nervenbiopsisch gesicherten axonaler Neuropathie beschrieben (Lindberg et al., 1990). Es ist, nimmt man fortgeschrittenes Alter und begleitend auftretende neurogene Störungen bei sIBM Patienten hinzu, bislang unklar, ob die Neuropathie in diesen Fällen Teil der Grunderkrankung oder nur ein Zufallsbefund ist.

5.2.4 Histologische Analyse

Der primäre Pathomechanismus der Multisystemproteinopathie und insbesondere der Einschlusskörpermyopathie ist weiterhin ungeklärt, weshalb es für die Diagnose keinen „Goldstandard“ gibt. Die ursprünglich vorgeschlagenen Diagnosekriterien für die gesicherte Einschlusskörpermyopathie waren primär über die Histologie ohne Bezug zu klinischen Symptomen definiert. Wenn in der Muskelbiopsie alle Hauptkriterien wie mononukleäre Zelleinwanderung in nichtnekrotische Muskelfasern, Vakuolen in Muskelfasern und eine der Möglichkeiten, entweder intrazelluläre Amyloid Ablagerungen oder 15-18 nm Tubulofilamente in der Elektronenmikroskopie, vorliegen, ist hier die Diagnose als definitiv gesichert anzusehen (Griggs et al., 1995). Allerdings zeigt die klinische Erfahrung seit dieser Publikation, dass in Fällen, in denen ein langer Verlauf ohne bisherige Diagnose die klinische Symptomatik der Einschlusskörpermyopathie zeigt, und damit auf diese Diagnose eindeutig hindeutet, jedoch eines oder mehrere dieser histologischen Kriterien in der ersten oder einer folgenden Biopsie fehlen kann (Chahin & Engel, 2008). Somit kann es vorkommen, dass manche pathologischen Kriterien erst später im Krankheitsverlauf auftreten, und dass ein zu strenges Festhalten daran, Patienten mit frühen Formen der Erkrankungen, die vielleicht eher auf eine Therapie ansprechen würden, ausschließt. In dem hier vorliegenden Fall zeigten sich lichtmikroskopisch „rimmed vacuoles“ zentral und peripher lokalisiert, zytoplasmatische Einschlüsse, multiple Vakuolen innerhalb einer Muskelfaser, elektronenmikroskopisch mit Tubulofilamenten bedeckte nukleäre Matrix, tubulofilamentäre Einschlüsse innerhalb der nukleären Matrix sowie Myelin-ähnliche Strukturen um tubulofilamentäre Einschlüsse, autophagozytäre Vakuolen mit Tubulofilamenten innerhalb eines degenerierten Nukleus und ein verflochtenes Netzwerk an Tubulofilamenten (Abbildung 7). Immunhistochemisch konnten bei dem Patienten β -Amyloid Einschlüsse und eine Tau-Protein Ablagerung nachgewiesen werden. Nach den oben genannten Hauptkriterien fehlte zur gesicherten Diagnose nur die mononukleäre Zelleinwanderung in nichtnekrotische Muskelfasern, was histologisch eine Herabstufung auf die diagnostische Kategorie „mögliche Einschlusskörpermyopathie“ bedeutet. Die Diagnose kann selbst nach Griggs' Kriterien aufgrund der klinischen und laborchemischen Symptomatik trotzdem gestellt werden. Nach der aktuellen Empfehlung der ENMC ist eine Diagnose ebenfalls als „klinisch-pathologisch definierte IBM“ möglich, wobei im Gegensatz zu Griggs' Kriterien ein passendes klinisches Bild ebenfalls als Diagnose IBM gewertet wird (Rose & Group, 2013).

5.3 Einordnung der molekulargenetischen und zellbiologischen Untersuchung des *HNRNPA1*-Gens

5.3.1 Mutationen im *HNRNPA1*-Gen

Bei dem Patienten konnte ein heterozygoter Basenaustausch Guanin zu Adenin in Position 784 des Exon 9 mit genomischer Nomenklatur chr12:54283844 (GRCh38.p12) identifiziert werden, der im hnRNPA1 Protein an der Position 262 zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Asparagin führt. Die Mutation in der Prion-like Domäne (Abbildung 9) wurde erstmals 2013 von Kim et al. im Rahmen mehrerer vorher unbekanntener Krankheitsmutationen der Multisystemproteinopathie, speziell bei einer Familie im Zusammenhang mit familiärer Amyotropher Lateralsklerose (ALS) beschrieben (Kim et al., 2013). Die Mutation ist im Zusammenhang mit einer Einschlusskörpermyopathie noch nicht beschrieben, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass die Mutation sehr selten vorkommt. Mehrere Algorithmen der Bioinformatik wurden zur Vorhersage des Effektes der Mutation herangezogen (Tabelle 10). Dabei klassifizierte eine Mehrheit der Algorithmen die Mutation als pathologisch. Eine Analyse der phylogenetischen Konservierung ergab, dass die Aminosäure Asparaginsäure an der Stelle 262 des hnRNPA1 Proteins hoch konserviert ist (Tabelle 9). Demzufolge äußert sich eine Mutation an dieser Stelle aus evolutionärer Sicht sehr kritisch hinsichtlich der Proteinfunktion. Bestätigt wurde das bereits in Zusammenhang mit der direkten Interaktion von hnRNPA1 mit TDP-43 zur Regulation des RNA Metabolismus (Buratti et al., 2005), einer bereits im Multisystemproteinopathie-Drosophila-Tiermodell nachgewiesenen Funktion von TDP-43, hnRNPA1 und hnRNPA2B1 als Suppressoren der VCP-vermittelten Degeneration (Ritson et al., 2010) und der vorbekannten Beteiligung der hnRNPs an neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. dem X-associated tremor ataxia Syndrom (FXTAS) (Iwahashi et al., 2006; Sofola et al., 2007).

5.3.2 Westernblot-Ergebnisse und Immunfluoreszenzfärbung zeigen eine Bildung von Stressgranula

Um auf die Fragestellung dieser Arbeit hier weiter einzugehen, ob die Mutation D262N, wie es schon für andere Mutationen in hnRNPs beschrieben ist, Einfluss auf die vermehrte Bildung von Stressgranula hat (Kim et al., 2013) und somit generell eine Multisystemproteinopathie, und im Speziellen eine autosomal dominante hereditäre Einschlusskörpermyopathie auslösen kann, wurde eine Charakterisierung mittels Westernblot Analyse und Immunfluoreszenz durchgeführt (Abbildung 11, Abbildung 12).

Die GFP-Expression der C2C12 Zellen mit MOCK und Wildtyp im Westernblot sind nahezu auf dem gleichen Niveau, wohingegen die Expression bei den C2C12 Zellen mit der D262N Mutante eine um mindestens ein Drittel höher ist. Dies lässt den Rückschluss auf eine vermehrte Produktion von hnRNPA1 in der Zelle zu. Die Erklärung für den Anstieg der Expression könnte der Funktionsdefekt des hnRNPA1 Proteins sein, welchen die Zelle durch vermehrte Produktion oder einen verzögerten Abbau auszugleichen versucht. Dies zeigt sich ebenfalls in der Expressionsanalyse des hnRNPA1 Proteins, bei der die D262N Mutante ebenfalls um ein Drittel stärker exprimiert wird als der Wildtyp. Die eIF4G Expression war in den MOCK Zellen am höchsten, gefolgt von den Zellen mit der D262N Mutante und dem Wildtyp. Die Erklärung findet sich möglicherweise darin, dass während der Translation der größte Teil der mRNAs durch die Bindung von eIF4G am 5'Ende und von poly(A)-binding protein (PABP) an ihrem 3' poly(A)-Strang zirkulär vorliegt und die Translation durch die Interaktion zwischen eIF4G und PABP stimuliert wird (Imataka et al., 1998; Wakiyama et al., 2000). Es ist bekannt, dass sowohl eIF4G, PABP als auch das 5' und 3' Ende der mRNA als Initiationsfaktoren wirken (Kahvejian et al., 2005; Tarun & Sachs, 1995).

Die Entstehung der Stressgranula korreliert mit dem Stillstand der Initiation der Translation, welcher von einem Polysomenzerfall begleitet wird und welcher die Konzentration der zytosolischen mRNA ansteigen lässt (Panas et al., 2016). Durch einen Anstieg von zytosolischer mRNA, welche durch positive Rückkopplung aufgrund fehlender Proteine gebildet wird, wird eine Schwelle der Sättigung der Konzentration von einem nukleären Protein-RNA Interaktionsnetzwerk erreicht, welches über das „Schalterprotein“ G3BP1 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) eine Bildung von Stressgranula auslöst. G3BP1 ist ein Enzym, welches ATP-abhängig zum einen die DNA entwinden und zum anderen RNA/DNA- und RNA/RNA-Duplexe trennen kann. Dabei gibt es positive und negative Rückkopplungsmechanismen, die die Zusammensetzung und Bildung von Stressgranula regulieren (Gallouzi et al., 1998; Yang et al., 2020). Dies liefert eine sehr gute mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Expressionsunterschiede von eIF4G im Westernblot in den verschiedenen transfizierten Zellen (Abbildung 11).

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte für eIF4G in der Wildtyp-Variante eine gleichmäßige Verteilung in Zytoplasma und Nukleus, wohingegen die Verteilung bei der D262N Mutante stark im Zytoplasma und darin in den Stressgranula konzentriert ist. hnRNPA1 zeigte mit der D262N Mutante eine ebenfalls ausgeprägte Verteilung im Zytoplasma im Vergleich zur Wildtyp-Variante (Abbildung 12). HnRNPA1 und eIF4G finden sich in den gleichen Stressgranula,

sowohl im Wildtyp als auch in der D262N Mutante. Diese Beobachtungen deuten ebenfalls auf eine funktionelle Beeinträchtigung des hnRNPA1-Proteins hin.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikant höhere Einbindung der D262N Mutante in Stressgranula erfolgt, als es beim Wildtyp der Fall ist. Für hnRNPA2B1 konnte bereits die gleiche Reaktion bei ALS Patienten beobachtet werden (Kim et al., 2013). Hierbei hatte sich gezeigt, dass die Bildung der Granula nach Hitzeschock der Zellen bei Mutanten schneller verläuft als bei Wildtypen, dass jedoch nach gewisser Zeit in allen Zellen die gleiche Menge an Stressgranula vorliegt (Yang et al., 2020). In den hier vorliegenden Ergebnissen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Es zeigte sich sowohl ohne als auch mit Hitzeschock immer eine unterschiedliche Menge und Größe an Stressgranula bei Wildtyp und D262N-Mutante. Eine mögliche Ursache für diese abweichende Beobachtung könnte in der unterschiedlichen Zeit des Hitzeschocks liegen. Im Vergleich zu diesem Paper wurde in dieser Arbeit jedoch kein Zeitverlauf, sondern nur ein Hitzeschock bei einer Temperatur und einer Zeitdauer durchgeführt.

Die Zusammensetzung der Stressgranula hat ebenfalls einen Einfluss auf den Metabolismus und das Überleben der Zelle (Panas et al., 2016). Allerdings ist trotzdem nicht sicher, ob die Stressgranula Ausdruck einer Krankheit der Zelle, also ein Symptom, sind oder selbst die Funktionseinschränkung verursachen.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein seltenes Auftreten einer Genvariation im *HNRNPA1*-Gen maßgeblich in die Pathogenese eingebunden ist, da hierdurch die Bildung von Stressgranula *in vitro* ohne zusätzlichen Zellstress ausgelöst wird. Durch Funktionsanalysen der Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp wurde, nach transienter Expression im Zellkulturmodell, die pathologische aberrante Proteinaggregation bestätigt. Die Pathogenität konnte sowohl qualitativ mittels Immunfluoreszenz als auch quantitativ mittels Westernblot bestätigt werden.

Der in der Kohorte gefundene und von einer autosomal dominanten hereditären Einschlusskörpermyopathie betroffene Patient trug eine heterozygote Mutante des *HNRNPA1* Gens. Die zellbiologischen Transfektions-Analysen zeigten trotz des Vorliegens von Wildtypprotein zahlreiche pathologische Veränderungen *in vivo* und die klonierte Mutante *in vitro*, sodass die pathogenetische Ursache bei diesem Patienten in dieser Missense-Mutation zu sehen ist.

Trotz neuer Methoden und Forschungsergebnisse werden viele weitere Experimente erforderlich sein, um ein tieferes Verständnis der Multisystemproteinopathien zu erlangen. So soll eine experimentelle Etablierung neuer Wege der Proteinaggregatauflösung z. B. mittels 1,6-hexanediol (Kroschwald et al., 2015) oder mittels Natrium-4-phenylbutyrat (Chaperon und Enzyminhibitor) erfolgen. Natrium-4-phenylbutyrat hat bei Plectin-defizienten Myoblasten und Mäusen zu erheblicher Funktionsverbesserung geführt, insbesondere Desminaggregatauflösung und Verbesserung der Muskelstärke bis zu voller Kraft (Winter et al., 2014).

Ohne eine dezidierte molekulargenetische Untersuchung wäre keine genaue Differentialdiagnose möglich. Aufgrund der heute gut verfügbaren und eher wirtschaftlichen Methode des Next Generation Sequencing ist der diagnostische Weg kein langwieriges Unterfangen mehr, wie es bei einer manuellen Einzelgen-Analyse in vergangenen Jahren der Fall war. Das bedeutet in der Regel eine frühere Diagnose und gegebenenfalls gezielte, spezifische Therapieeinleitung für die Patienten.

6 Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Al-Obeidi, E., Al-Tahan, S., Surampalli, A., Goyal, N., Wang, A. K., Hermann, A., Omizo, M., Smith, C., Mozaffar, T., & Kimonis, V. (2018). Genotype-phenotype study in patients with valosin-containing protein mutations associated with multisystem proteinopathy. *Clinical Genetics*, 93(1), 119-125. <https://doi.org/10.1111/cge.13095>
- Altman, R. D., Brown, M., & Gargano, F. (1987). Low back pain in Paget's disease of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(217), 152-161.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2951047>
- Barker, D. J., Clough, P. W., Guyer, P. B., & Gardner, M. J. (1977). Paget's disease of bone in 14 British towns. *British Medical Journal*, 1(6070), 1181-1183.
<https://doi.org/10.1136/bmj.1.6070.1181>
- Barraud, P., & Allain, F. H. (2013). Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: how the relative orientation between RRM s influences the nucleic acid binding topology. *Journal of Biomolecular NMR*, 55(1), 119-138. <https://doi.org/10.1007/s10858-012-9696-4>
- Bekenstein, U., & Soreq, H. (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: from structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 56, 436-446.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.12.002>
- Benatar, M., Wu, J., Fernandez, C., Weihl, C. C., Katzen, H., Steele, J., Oskarsson, B., & Taylor, J. P. (2013). Motor neuron involvement in multisystem proteinopathy:

implications for ALS. *Neurology*, 80(20), 1874-1880.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182929fc3>

Berson, A., Barbash, S., Shaltiel, G., Goll, Y., Hanin, G., Greenberg, D. S., Ketzef, M., Becker, A. J., Friedman, A., & Soreq, H. (2012). Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Molecular Medicine*, 4(8), 730-742.

<https://doi.org/10.1002/emmm.201100995>

Blijham, P. J., Hengstman, G. J., Ter Laak, H. J., Van Engelen, B. G., & Zwarts, M. J. (2004). Muscle-fiber conduction velocity and electromyography as diagnostic tools in patients with suspected inflammatory myopathy: a prospective study. *Muscle and Nerve*, 29(1), 46-50. <https://doi.org/10.1002/mus.10519>

Brannagan, T. H., Hays, A. P., Lange, D. J., & Trojaborg, W. (1997). The role of quantitative electromyography in inclusion body myositis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 63(6), 776-779. <https://doi.org/10.1136/jnmp.63.6.776>

Broccolini, A., Gidaro, T., Morosetti, R., & Mirabella, M. (2009). Hereditary inclusion-body myopathy: clues on pathogenesis and possible therapy. *Muscle and Nerve*, 40(3), 340-349. <https://doi.org/10.1002/mus.21385>

Broccolini, A., & Mirabella, M. (2015). Hereditary inclusion-body myopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(4), 644-650. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.08.007>

Bucelli, R. C., Arhzaouy, K., Pestronk, A., Pittman, S. K., Rojas, L., Sue, C. M., Evila, A., Hackman, P., Udd, B., Harms, M. B., & Weihl, C. C. (2015). SQSTM1 splice site mutation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neurology*, 85(8), 665-674.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001864>

Buratti, E., Brindisi, A., Giombi, M., Tisminetzky, S., Ayala, Y. M., & Baralle, F. E. (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37572-37584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505557200>

- Carter, H., Douville, C., Stenson, P. D., Cooper, D. N., & Karchin, R. (2013). Identifying Mendelian disease genes with the variant effect scoring tool. *BMC Genomics*, *14 Suppl 3*, S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S3-S3>
- Chahin, N., & Engel, A. G. (2008). Correlation of muscle biopsy, clinical course, and outcome in PM and sporadic IBM. *Neurology*, *70*(6), 418-424. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277527.69388.fe>
- Chahin, N., & Sorenson, E. J. (2009). Serum creatine kinase levels in spinobulbar muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *40*(1), 126-129. <https://doi.org/10.1002/mus.21310>
- Chan, N., Le, C., Shieh, P., Mozaffar, T., Khare, M., Bronstein, J., & Kimonis, V. (2012). Valosin-containing protein mutation and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *18*(1), 107-109. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.07.006>
- Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS One*, *7*(10), e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
- Dalakas, M. C. (2015). Inflammatory Muscle Diseases. *New England Journal of Medicine*, *373*(4), 393-394. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1506827>
- Deshaiies, J. E., Shkreta, L., Moszczynski, A. J., Sidibe, H., Semmler, S., Fouillen, A., Bennett, E. R., Bekenstein, U., Destroismaisons, L., Toutant, J., Delmotte, Q., Volkening, K., Stabile, S., Aulas, A., Khalfallah, Y., Soreq, H., Nanci, A., Strong, M. J., Chabot, B., & Vande Velde, C. (2018). TDP-43 regulates the alternative splicing of hnRNP A1 to yield an aggregation-prone variant in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *141*(5), 1320-1333. <https://doi.org/10.1093/brain/awy062>
- Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2014). Inclusion body myositis. *Neurologic Clinics*, *32*(3), 629-646, vii. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.001>
- Donath, J., Speer, G., Kosa, J. P., Arvai, K., Balla, B., Juhasz, P., Lakatos, P., & Poor, G. (2015). Polymorphisms of CSF1 and TM7SF4 genes in a case of mild juvenile Paget's

- disease found using next-generation sequencing. *Croatian Medical Journal*, 56(2), 145-151. <https://doi.org/10.3325/cmj.2015.56.145>
- Evangelista, T., Weihl, C. C., Kimonis, V., Lochmuller, H., & Consortium, V. C. P. r. d. (2016). 215th ENMC International Workshop VCP-related multi-system proteinopathy (IBMPFD) 13-15 November 2015, Heemskerk, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 26(8), 535-547. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.05.017>
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szigyarto, C. A., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., . . . Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(2), 397-406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Figuroa-Bonaparte, S., Hudson, J., Barresi, R., Polvikoski, T., Williams, T., Topf, A., Harris, E., Hilton-Jones, D., Petty, R., Willis, T. A., Longman, C., Dougan, C. F., Parton, M. J., Hanna, M. G., Quinlivan, R., Farrugia, M. E., Guglieri, M., Bushby, K., Straub, V., . . . Evangelista, T. (2016). Mutational spectrum and phenotypic variability of VCP-related neurological disease in the UK. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 87(6), 680-681. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-310362>
- Fogelman, I., & Carr, D. (1980). A comparison of bone scanning and radiology in the assessment of patients with symptomatic Paget's disease. *European Journal of Nuclear Medicine*, 5(5), 417-421. <https://doi.org/10.1007/BF00261784>
- Fu, W., O'Connor, T. D., Jun, G., Kang, H. M., Abecasis, G., Leal, S. M., Gabriel, S., Rieder, M. J., Altshuler, D., Shendure, J., Nickerson, D. A., Bamshad, M. J., Project, N. E. S., & Akey, J. M. (2013). Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature*, 493(7431), 216-220. <https://doi.org/10.1038/nature11690>
- Gallouzi, I. E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., Capony, J. P., Tocque, B., & Tazi, J. (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of

- GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), 3956-3965.
<https://doi.org/10.1128/mcb.18.7.3956>
- Garrett, D. S., Lodi, P. J., Shamoo, Y., Williams, K. R., Clore, G. M., & Gronenborn, A. M. (1994). Determination of the secondary structure and folding topology of an RNA binding domain of mammalian hnRNP A1 protein using three-dimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 33(10), 2852-2858.
<https://doi.org/10.1021/bi00176a015>
- Gonzalez-Almela, E., Williams, H., Sanz, M. A., & Carrasco, L. (2018). The Initiation Factors eIF2, eIF2A, eIF2D, eIF4A, and eIF4G Are Not Involved in Translation Driven by Hepatitis C Virus IRES in Human Cells. *Frontiers in Microbiology*, 9, 207.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00207>
- Griggs, R. C., Askanas, V., DiMauro, S., Engel, A., Karpati, G., Mendell, J. R., & Rowland, L. P. (1995). Inclusion body myositis and myopathies. *Annals of Neurology*, 38(5), 705-713. <https://doi.org/10.1002/ana.410380504>
- Guyer, P. B. (1981). Paget's disease of bone: the anatomical distribution. *Metabolic Bone Disease and Related Research*, 3(4-5), 239-241. [https://doi.org/10.1016/0221-8747\(81\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0221-8747(81)90039-4)
- Hackman, P., Sarparanta, J., Lehtinen, S., Vihola, A., Evila, A., Jonson, P. H., Luque, H., Kere, J., Screen, M., Chinnery, P. F., Ahlberg, G., Edstrom, L., & Udd, B. (2013). WELANDER distal myopathy is caused by a mutation in the RNA-binding protein TIA1. *Annals of Neurology*, 73(4), 500-509. <https://doi.org/10.1002/ana.23831>
- Hecht, M., Bromberg, Y., & Rost, B. (2015). Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics*, 16 Suppl 8, S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S8-S1>
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51-59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)

- Hocking, L. J., Lucas, G. J., Daroszewska, A., Mangion, J., Olavesen, M., Cundy, T., Nicholson, G. C., Ward, L., Bennett, S. T., Wuyts, W., Van Hul, W., & Ralston, S. H. (2002). Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease. *Human Molecular Genetics*, *11*(22), 2735-2739. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.22.2735>
- Hubbers, C. U., Clemen, C. S., Kesper, K., Boddich, A., Hofmann, A., Kamarainen, O., Tolksdorf, K., Stumpf, M., Reichelt, J., Roth, U., Krause, S., Watts, G., Kimonis, V., Wattjes, M. P., Reimann, J., Thal, D. R., Biermann, K., Evert, B. O., Lochmuller, H., . . . Schroder, R. (2007). Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain*, *130*(Pt 2), 381-393. <https://doi.org/10.1093/brain/awl238>
- Imataka, H., Gradi, A., & Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO Journal*, *17*(24), 7480-7489. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>
- Iwahashi, C. K., Yasui, D. H., An, H. J., Greco, C. M., Tassone, F., Nannen, K., Babineau, B., Lebrilla, C. B., Hagerman, R. J., & Hagerman, P. J. (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain*, *129*(Pt 1), 256-271. <https://doi.org/10.1093/brain/awh650>
- Julien, J., Vital, C., Vallat, J. M., Lagueny, A., & Sapina, D. (1982). Inclusion body myositis. Clinical, biological and ultrastructural study. *Journal of the Neurological Sciences*, *55*(1), 15-24. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(82\)90166-6](https://doi.org/10.1016/0022-510x(82)90166-6)
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., & Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes and Development*, *19*(1), 104-113. <https://doi.org/10.1101/gad.1262905>
- Karvelas, K. R., Xiao, T., Langefeld, C. D., Walker, F. O., Pathak, S., Caress, J. B., Baute, V., & Cartwright, M. S. (2019). Assessing the accuracy of neuromuscular ultrasound for inclusion body myositis. *Muscle and Nerve*, *59*(4), 478-481. <https://doi.org/10.1002/mus.26411>

- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *Journal of Cell Biology*, 169(6), 871-884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502088>
- Khairi, M. R., Robb, J. A., Wellman, H. N., & Johnston, C. C., Jr. (1974). Radiographs and scans in diagnosing symptomatic lesions of Paget's disease of bone (osteitis deformans). *Geriatrics*, 29(12), 49-54.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4426511>
- Kim, C. S., Seol, S. K., Song, O. K., Park, J. H., & Jang, S. K. (2007). An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *Journal of Virology*, 81(8), 3852-3865. <https://doi.org/10.1128/JVI.01311-06>
- Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y. D., Scarborough, E. A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K. S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., Kanagaraj, A. P., Carter, R., Boylan, K. B., Wojtas, A. M., Rademakers, R., Pinkus, J. L., Greenberg, S. A., Trojanowski, J. Q., Traynor, B. J., . . . Taylor, J. P. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 495(7442), 467-473.
<https://doi.org/10.1038/nature11922>
- Kimonis, V. E., Kovach, M. J., Waggoner, B., Leal, S., Salam, A., Rimer, L., Davis, K., Khardori, R., & Gelber, D. (2000). Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone. *Genetics in Medicine*, 2(4), 232-241. <https://doi.org/10.1097/00125817-200007000-00006>
- Kimonis, V. E., Mehta, S. G., Fulchiero, E. C., Thomasova, D., Pasquali, M., Boycott, K., Neilan, E. G., Kartashov, A., Forman, M. S., Tucker, S., Kimonis, K., Mumm, S., Whyte, M. P., Smith, C. D., & Watts, G. D. (2008). Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 146A(6), 745-757.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31862>

- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, 46(3), 310-315. <https://doi.org/10.1038/ng.2892>
- Korb, M. K., Kimonis, V. E., & Mozaffar, T. (2021). Multisystem proteinopathy: Where myopathy and motor neuron disease converge. *Muscle and Nerve*, 63(4), 442-454. <https://doi.org/10.1002/mus.27097>
- Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nuske, E., Poser, I., Richter, D., & Alberti, S. (2015). Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife*, 4, e06807. <https://doi.org/10.7554/eLife.06807>
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073-1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Le Ber, I., Van Bortel, I., Nicolas, G., Bouya-Ahmed, K., Camuzat, A., Wallon, D., De Septenville, A., Latouche, M., Lattante, S., Kabashi, E., Jornea, L., Hannequin, D., Brice, A., & French research Network on, F. F.-A. (2014). hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations are rare in patients with "multisystem proteinopathy" and frontotemporal lobar degeneration phenotypes. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 934 e935-936. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.016>
- Lee, S., Xu, L., Shin, Y., Gardner, L., Hartzes, A., Dohan, F. C., Raine, C., Homayouni, R., & Levin, M. C. (2011). A potential link between autoimmunity and neurodegeneration in immune-mediated neurological disease. *Journal of Neuroimmunology*, 235(1-2), 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.02.007>
- Leeuwenberg, K. E., van Alfen, N., Christopher-Stine, L., Paik, J. J., Tiniakou, E., Mecoli, C., Doorduyn, J., Saris, C. G. J., & Albayda, J. (2020). Ultrasound can differentiate

- inclusion body myositis from disease mimics. *Muscle and Nerve*, 61(6), 783-788.
<https://doi.org/10.1002/mus.26875>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., . . . Exome Aggregation, C. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291.
<https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Li, M. L., Lin, J. Y., Chen, B. S., Weng, K. F., Shih, S. R., Calderon, J. D., Tolbert, B. S., & Brewer, G. (2019). EV71 3C protease induces apoptosis by cleavage of hnRNP A1 to promote apaf-1 translation. *PloS One*, 14(9), e0221048.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221048>
- Lindberg, C., Oldfors, A., & Hedstrom, A. (1990). Inclusion body myositis: peripheral nerve involvement. Combined morphological and electrophysiological studies on peripheral nerves. *Journal of the Neurological Sciences*, 99(2-3), 327-338.
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(90\)90167-1](https://doi.org/10.1016/0022-510x(90)90167-1)
- Lopez-Ferrando, V., Gazzo, A., de la Cruz, X., Orozco, M., & Gelpi, J. L. (2017). PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W222-W228. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx313>
- Maurer, B., & Walker, U. A. (2015). Role of MRI in diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Reports*, 17(11), 67.
<https://doi.org/10.1007/s11926-015-0544-x>
- Mehta, S. G., Khare, M., Ramani, R., Watts, G. D., Simon, M., Osann, K. E., Donkervoort, S., Dec, E., Nalbandian, A., Platt, J., Pasquali, M., Wang, A., Mozaffar, T., Smith, C. D., & Kimonis, V. E. (2013). Genotype-phenotype studies of VCP-associated inclusion body myopathy with Paget disease of bone and/or frontotemporal dementia. *Clinical Genetics*, 83(5), 422-431. <https://doi.org/10.1111/cge.12000>

- Meunier, P. J., Salson, C., Mathieu, L., Chapuy, M. C., Delmas, P., Alexandre, C., & Charhon, S. (1987). Skeletal distribution and biochemical parameters of Paget's disease. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(217), 37-44.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3103964>
- Miller, T. D., Jackson, A. P., Barresi, R., Smart, C. M., Eugenicos, M., Summers, D., Clegg, S., Straub, V., & Stone, J. (2009). Inclusion body myopathy with Paget disease and frontotemporal dementia (IBMPFD): clinical features including sphincter disturbance in a large pedigree. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 80(5), 583-584. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.148676>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Murphy, W. A., Totty, W. G., & Carroll, J. E. (1986). MRI of normal and pathologic skeletal muscle. *AJR: American Journal of Roentgenology*, 146(3), 565-574.
<https://doi.org/10.2214/ajr.146.3.565>
- Needham, M., & Mastaglia, F. L. (2016). Sporadic inclusion body myositis: A review of recent clinical advances and current approaches to diagnosis and treatment. *Clinical Neurophysiology*, 127(3), 1764-1773. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.12.011>
- Nojszewska, M., Gawel, M., Kierdaszuk, B., Sierdzinski, J., Szmidt-Salkowska, E., Seroka, A., Kaminska, A. M., & Kostera-Pruszczyk, A. (2018). Electromyographic findings in sporadic inclusion body myositis. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, 39, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.jelekin.2018.02.003>
- Obaid, R., Wani, S. E., Azfer, A., Hurd, T., Jones, R., Cohen, P., Ralston, S. H., & Albagha, O. M. E. (2015). Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF-kappaB and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell Reports*, 13(6), 1096-1102. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.071>

- Panas, M. D., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *Journal of Cell Biology*, 215(3), 313-323.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201609081>
- Paronetto, M. P., Achsel, T., Massiello, A., Chalfant, C. E., & Sette, C. (2007). The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *Journal of Cell Biology*, 176(7), 929-939. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701005>
- Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R., & Chabot, B. (2003). Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Research*, 63(22), 7679-7688.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633690>
- Picchiarelli, G., & Dupuis, L. (2020). Role of RNA Binding Proteins with prion-like domains in muscle and neuromuscular diseases. *Cell Stress*, 4(4), 76-91.
<https://doi.org/10.15698/cst2020.04.217>
- Pipitone, N. (2016). Value of MRI in diagnostics and evaluation of myositis. *Current Opinion in Rheumatology*, 28(6), 625-630. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000326>
- Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R., & Siepel, A. (2010). Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Research*, 20(1), 110-121. <https://doi.org/10.1101/gr.097857.109>
- Rebane, A., Aab, A., & Steitz, J. A. (2004). Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA*, 10(4), 590-599.
<https://doi.org/10.1261/rna.5224304>
- Reva, B., Antipin, Y., & Sander, C. (2011). Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research*, 39(17), e118.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr407>
- Ritson, G. P., Custer, S. K., Freibaum, B. D., Guinto, J. B., Geffel, D., Moore, J., Tang, W., Winton, M. J., Neumann, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Forman, M. S., &

- Taylor, J. P. (2010). TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7729-7739. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5894-09.2010>
- Rose, M. R., & Group, E. I. W. (2013). 188th ENMC International Workshop: Inclusion Body Myositis, 2-4 December 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, 23(12), 1044-1055. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.08.007>
- Roth, S., & Khalaila, I. (2017). The effect of O-GlcNAcylation on hnRNP A1 translocation and interaction with transportin1. *Experimental Cell Research*, 350(1), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.023>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schwarz, J. M., Rodelsperger, C., Schuelke, M., & Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, 7(8), 575-576. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>
- Seelen, M., Visser, A. E., Overste, D. J., Kim, H. J., Palud, A., Wong, T. H., van Swieten, J. C., Scheltens, P., Voermans, N. C., Baas, F., de Jong, J. M., van der Kooi, A. J., de Visser, M., Veldink, J. H., Taylor, J. P., Van Es, M. A., & van den Berg, L. H. (2014). No mutations in hnRNPA1 and hnRNPA2B1 in Dutch patients with amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, and inclusion body myopathy. *Neurobiology of Aging*, 35(8), 1956 e1959-1956 e1911. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.152>
- Shirazi, P. H., Ryan, W. G., & Fordham, E. W. (1974). Bone scanning in evaluation of Paget's disease of bone. *CRC Critical Reviews in Clinical Radiology and Nuclear Medicine*, 5(4), 523-558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4279805>
- Singh, A. K., & Lakhota, S. C. (2012). The hnRNP A1 homolog Hrp36 is essential for normal development, female fecundity, omega speckle formation and stress tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biosciences*, 37(4), 659-678. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9239-x>

- Sofola, O. A., Jin, P., Qin, Y., Duan, R., Liu, H., de Haro, M., Nelson, D. L., & Botas, J. (2007). RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron*, 55(4), 565-571. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.021>
- Sudmant, P. H., Rausch, T., Gardner, E. J., Handsaker, R. E., Abyzov, A., Huddleston, J., Zhang, Y., Ye, K., Jun, G., Fritz, M. H., Konkel, M. K., Malhotra, A., Stutz, A. M., Shi, X., Casale, F. P., Chen, J., Hormozdiari, F., Dayama, G., Chen, K., . . . Korbel, J. O. (2015). An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 526(7571), 75-81. <https://doi.org/10.1038/nature15394>
- Tarun, S. Z., Jr., & Sachs, A. B. (1995). A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes and Development*, 9(23), 2997-3007. <https://doi.org/10.1101/gad.9.23.2997>
- Taylor, J. P. (2015). Multisystem proteinopathy: intersecting genetics in muscle, bone, and brain degeneration. *Neurology*, 85(8), 658-660. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001862>
- Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiss, J. L., Eichner, N., Lehmann, G., Schall, K., Urlaub, H., & Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, 66(2), 270-284 e213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>
- Vu, Q., & Cartwright, M. (2016). Neuromuscular ultrasound in the evaluation of inclusion body myositis. *BMJ Case Reports*, 2016. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-217440>
- Wakiyama, M., Imataka, H., & Sonenberg, N. (2000). Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Current Biology*, 10(18), 1147-1150. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00701-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00701-6)
- Wang, G., Zhang, D. F., Jiang, H. Y., Fan, Y., Ma, L., Shen, Z., Bi, R., Xu, M., Tan, L., Shan, B., Yao, Y. G., & Feng, T. (2019). Mutation and association analyses of dementia-causal genes in Han Chinese patients with early-onset and familial Alzheimer's

- disease. *Journal of Psychiatric Research*, 113, 141-147.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.03.026>
- Watts, G. D., Thomasova, D., Ramdeen, S. K., Fulchiero, E. C., Mehta, S. G., Drachman, D. A., Weihl, C. C., Jamrozik, Z., Kwiecinski, H., Kaminska, A., & Kimonis, V. E. (2007). Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clinical Genetics*, 72(5), 420-426.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00887.x>
- Watts, G. D., Wymer, J., Kovach, M. J., Mehta, S. G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M. P., & Kimonis, V. E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature Genetics*, 36(4), 377-381. <https://doi.org/10.1038/ng1332>
- Weihl, C. C. (2011). Valosin containing protein associated fronto-temporal lobar degeneration: clinical presentation, pathologic features and pathogenesis. *Curr Alzheimer Res*, 8(3), 252-260. <https://doi.org/10.2174/156720511795563773>
- Wellman, H. N., Schauwecker, D., Robb, J. A., Khairi, M. R., & Johnston, C. C. (1977). Skeletal scintigraphy and radiography in the diagnosis and management of Paget's disease. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(127), 55-62.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/410575>
- Winter, L., Staszewska, I., Mihailovska, E., Fischer, I., Goldmann, W. H., Schroder, R., & Wiche, G. (2014). Chemical chaperone ameliorates pathological protein aggregation in plectin-deficient muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1144-1157.
<https://doi.org/10.1172/JCI71919>
- Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R. M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., Yang, Z., Wu, J., Li, Y., Pan, Q., Yu, J., Martin, E. W., Mittag, T., Kim, H. J., & Taylor, J. P. (2020). G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules. *Cell*, 181(2), 325-345 e328. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>
- Zhang, X., Yamashita, S., Hara, K., Doki, T., Tawara, N., Ikeda, T., Misumi, Y., Zhang, Z., Matsuo, Y., Nagai, M., Kurashige, T., Maruyama, H., & Ando, Y. (2019). A mutant

MATR3 mouse model to explain multisystem proteinopathy. *Journal of Pathology*, 249(2), 182-192. <https://doi.org/10.1002/path.5289>

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur des HNRNPA1-Gens (Barraud & Allain, 2013; Kim et al., 2013)	4
Abbildung 2 oben: Kristallstruktur des Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1; unten: graphische Darstellung von RRM1 links und RRM2 rechts (Barraud & Allain, 2013; Garrett et al., 1994),	7
Abbildung 3 Ausschnitt aus den bekannten hnRNPA1-Interaktionen (Quelle: STRING Datenbank)	9
Abbildung 4 Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenesestrategie	16
Abbildung 5 Vektorkarte des mutierten Vektors	18
Abbildung 6 Stammbaum des Patienten.....	26
Abbildung 7 Histologische Charakterisierung des Patienten mit Mutation D262N	34
Abbildung 8 Chromatogramm der Mutation c.784G>A	37
Abbildung 9 Lokalisation der D262N-Mutante des Patienten.....	37
Abbildung 10 Sequenz des Plasmids mit eingeführter Mutation.....	41
Abbildung 11 Westernblotanalyse	43
Abbildung 12 Konfokalmikroskopische Analyse der transfizierten C2C12 Zellen	44

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Multisystemproteinopathien mit vergesellschafteten Genen und die assoziierten Erkrankungen (Taylor, 2015).....	2
Tabelle 2 Primersequenzen HNRNPA1-Gen.....	13
Tabelle 3 Sequenzen der Mutagenese-Primer.....	17
Tabelle 4 Primersequenzen zur Sequenzkontrolle des mutierten Vektors	20
Tabelle 5 Zusammenfassung der Sequenzvariationen der Introns des VCP-Gens bei dem Patienten.....	25
Tabelle 6 Laborchemische Befunde des Indexpatienten	27
Tabelle 7 Neurographie	31
Tabelle 8 Frequenzen der HNRNPA1 Gen Variante in Kontrolldatensätzen	36
Tabelle 9 Alignment der Aminosäuresequenz des hnRNPA1 Proteins verschiedener Spezies	38

Tabelle 10 Ergebnisse der bioinformatischen Analyse mit verschiedenen Algorithmen für den p.Asp262Asn-Aminosäureaustausch.....	39
Tabelle 11 Übersicht einer Analyse der transfizierten C2C12 Zellen.....	45

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Da	Dalton – ein anderer Name für die atomare Masseneinheit (Einheitenzeichen: u = unit)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DML	Distale motorische Latenz
eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4 G
EM	Elektronenmikroskopie
ESP	NHLBI Exome Sequencing Project
FTD	Frontotemporal dementia
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
GFP	green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
HE	Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung
hIBM	hereditäre Inclusion Body Myopathy
hIBM	Hereditäre Inclusion Body Myopathy
hnRNPA1	Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A1
IBM	Inclusion Body Myopathy
IBMPFD	Inclusion body myopathy with M. Paget and frontotemporal dementia

IVS	Intron variant sequence
MAF	Minor allele frequency
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NLS	Nuclear localization signal
NPC	Nuclear pore complex
PABP	poly(A)-binding protein
PDB	Paget's disease of bone / Morbus Paget / M. Paget
PrLD	Prion-like domain
RRM	RNA recognition motif
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sIBM	sporadische Inclusion Body Myopathy
SNV	Single nucleotide variation
SPID	Sequence Position Deletion Insertion
STIR	Short-Tau Inversion Recovery Sequenz

7.4 GenBank Zugangsnummern

Gen	Daten- bank	Genomische Sequenz	mRNA-Sequenz	Protein
<i>HNRNPA1</i>	NCBI	NG_033830.1	NM_002136.4	NP_002127.1
	Ensembl	ENSG00000135486	ENST00000546500.5	ENSP00000448617.1
<i>VCP</i>	NCBI	7415	NM_007126.5	NP_009057.1
	Ensembl	ENSG00000165280	ENST00000358901.11	ENSP00000351777.6

Danksagung

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

Ich danke besonders meiner Doktormutter, Frau Privatdozentin Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause, für ihre umfassende Betreuung und ihre unschätzbare Hilfe beim Erstellen dieser Doktorarbeit. Ihrer engagierten fachlichen und persönlichen Unterstützung konnte ich mir immer sicher sein. Ohne ihre Hilfe hätte sich diese Arbeit nicht realisieren lassen.

Herrn Prof. Dr. med. Benedikt Schoser und Herrn Prof. Dr. med. Jan Senderek danke ich für anregende Diskussionen, ihre Unterstützung und ihre freundliche Bereitschaft auch Projekte mit größerem Zeitaufwand zu unterstützen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität angefertigt und gefördert. Für die Möglichkeit in diesem Programm mitzuwirken, zusätzliche Fähigkeiten zu erwerben und Unterstützung in vielen Bereichen zu erhalten danke ich der Fakultät ganz besonders.

Für die schöne Zeit und die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Laborarbeiten, möchte ich mich herzlich bei allen Labormitarbeitenden (auch die Ehemaligen) bedanken. Ganz besonders gilt dies für Manuela Wiessner, Dr. rer. nat. Rolf Stucka, Dr. rer. biol. hum. Sarah Linner, Dr. rer. biol. hum. Peter Meinke, Dr. rer. nat. Stefan Hintze, Christiana Kubny und Dr. rer. biol. hum. Irene Kammermeier, die mich damals gut aufgenommen haben und mittlerweile vielmehr Freunde als Arbeitskolleginnen sind.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Frau Dr. rer. nat. Marina Vogel und meinen Eltern Irene und Gerhard Vogel für ihre Geduld, die Ermutigungen und die Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Eidesstattliche Versicherung

Vogel, Johannes Gerhard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Die Funktion des hnRNPA1-Proteins bei der hereditären Multisystemproteinopathie“

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, 01.10.2022

Ort, Datum

Johannes Vogel

Unterschrift Doktorand

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Vogel, Johannes Gerhard

Name, Vorname

Straße, Hausnummer

PLZ, Ort

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

„Die Funktion des hnRNPA1-Proteins bei der hereditären
Multisystemproteinopathie“

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 01.10.2022

Ort, Datum

Johannes Vogel

Unterschrift Doktorand