

Aus dem Friedrich-Baur-Institut
(Leitender Arzt: Prof. Dr. med. Dieter Pongratz)
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Klinische und molekulare Charakterisierung von Patienten mit
Gliedergürteldystrophie 2I (LGMD 2I)**

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

vorgelegt von
Jens Alexander Petersen
aus
Pinneberg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Steinlein
Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Brehm
Prof. Dr. E. Albert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Margarete C. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2005

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. **Petersen JA**, Walter MC, Stucka R, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Müller-Felber W, Pongratz D, Müller JS, Auerswald EA, Lochmüller H. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet.* 2004; 41:50.
2. Fischer D, Walter MC, Kesper K, **Petersen JA**, Aurino S, Nigro V, Kubisch C, Meindl T, Lochmüller H, Wilhelm K, Urbach H, Schröder R. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J. Neurol* (2004 zur Publikation angenommen)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Muskeldystrophien	7
1.1.1	Gliedergürteldystrophien	8
1.1.1.1	LGMD 2I	10
1.2	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC)	10
1.3	FKRP-Gen	12
1.3.1	Phänotypisches Spektrum bei Mutationen im FKRP-Gen	14
1.3.2	Phänotyp bei LGMD 2I	14
1.4.	Gliedergürteldystrophie: Diagnostik	15
1.4.1	Magnetresonanztomographie bei LGMD 2I	16
1.4.2	Muskelbiopsische Befunde bei LGMD 2I	17
1.4.3	Molekulargenetik	17
1.5.	Differentialdiagnosen der LGMD	18
1.6	Therapie der LGMD	19
1.6.1	Künftige Therapieformen	20
1.7	Kongenitale Muskeldystrophien (MDC)	21
1.7.1	MDC bei Mutationen im FKRP-Gen	21
2	Zielsetzung	23
3	Material, Methoden	24
3.1	Patienten	24
3.2	Immunhistochemie	24
3.3	Analyse von Mutationen im FKRP-Gen	25
3.3.1	Chemikalien	26
3.3.2	DNA-Extraktion	26
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.4.1	PCR-Reaktionsbedingungen / Standardprotokoll	27
3.3.4.2	Primer	27
3.3.4.2.1	Exon 4 des FKRP-Gens	28
3.3.4.2.2	Mismatch-Primer	29

3.3.4.2.3	Promotor	29
3.3.4.3	Aufreinigung der PCR	30
3.3.4	Verdau von PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen	30
3.3.5	Sequenzanalyse	31
3.4	Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher Spezies	32
3.5	Frequenz intragenischer Polymorphismen	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Klinische Daten	33
4.1.1	Symptome	34
4.1.2	Phänotyp	35
4.2	Laborbefunde	38
4.3	Befunde apparativer Untersuchungen	38
4.4	Immunhistochemie	38
4.5	Genetische Analyse	39
4.5.1	Mutationen	39
4.5.2	Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher Spezies	40
4.5.3	Polymorphismen, Founder-Effekt	40
4.5.4	FKRP 826C>A in Normalkontrollen	41
5	Diskussion	43
5.1	Phänotyp	43
5.2	Symptomatik	44
5.3	Narkosezwischenfall	44
5.4	Mutationen	44
5.5	Founder-Allel	45
5.6	Epidemiologie	47
5.7	Diagnostik	47
6	Ausblick	49
7	Zusammenfassung	51
8	Literaturverzeichnis	53

Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen	60
Danksagung	63
Lebenslauf	64
Ehrenwörtliche Erklärung	65

1 Einleitung

In den letzten zwanzig Jahren gelang es, die genetische Basis vieler erblicher Myopathien und Muskeldystrophien aufzudecken [Wagner 2002]: Es fanden sich Funktionsverluste struktureller Komponenten der muskulären Basallamina (z.B. Kongenitale Muskeldystrophie 1A), des Sarkolemms (z.B. Sarkoglykanopathien), der Zellkerne (z.B. Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie) sowie der Sarkomere (z.B. Nemaline-Myopathie).

Erst kürzlich zeigte sich, dass in der Pathogenese der Muskeldystrophien auch die posttranslationale Prozessierung muskulärer Proteine eine wichtige Rolle spielt [Muntoni et al. 2002].

1.1 Muskeldystrophien

Muskeldystrophien sind erbliche Erkrankungen mit progressiven De- und Regenerationsvorgängen der Muskelfasern. Klinische Klassifikationen basieren im Wesentlichen auf der Verteilung der Muskelschwäche im frühen Krankheitsverlauf sowie auf dem Alter des Patienten bei Erkrankungsbeginn. Zur Diagnose „Muskeldystrophie“ führt in vielen Fällen schon die Zusammenschau klinischer und histologischer Befunde. Hingegen sind Zuordnungen zu den einzelnen Formen der Muskeldystrophie, für die inzwischen mehr als 30 Genloki gefunden wurden [Walter et al. 2001], aufgrund phänotypischer Überschneidungen nicht ohne weiteres möglich [Zatz et al. 2003]. Pathophysiologische und genetische Klassifikationen gewinnen zunehmend an Bedeutung: Erkrankungen, die in klinischer Hinsicht verschieden scheinen, werden zum Teil durch Defekte im gleichen Gen verursacht [Mathews u. Moore 2003].

1.1.1 Gliedergürteldystrophien

Die zu den Muskeldystrophien zählenden Gliedergürteldystrophien (engl. limb girdle muscular dystrophies, LGMD) bilden eine Gruppe genetisch determinierter Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine progrediente Schwäche der Schultergürtel- und Beckenmuskulatur ist. Ihr klinischer Verlauf ist äußerst variabel: Es finden sich milde Formen, die mit normaler Lebenserwartung einhergehen und den Betroffenen normale Aktivitäten im Alltag erlauben, bis hin zu schweren Formen mit frühem Krankheitsbeginn, verminderter Lebenserwartung und hochgradiger Behinderung [Nigro 2003].

Je nach historischen, geographischen und kulturellen Einflüssen scheint die Prävalenz der Gliedergürteldystrophien in verschiedenen Populationen sehr unterschiedlich zu sein. Autosomal-dominante Formen (LGMD 1) haben in der kaukasischen Bevölkerung einen Anteil von 14%; der Anteil autosomal-rezessiver Formen (LGMD 2) beträgt 34%, während 52% aller Fälle sporadisch sind [Mahjneh et al. 1996.] Die autosomal-rezessiven Formen sind am besten charakterisiert, da die zugrunde liegenden Gene als erste kloniert wurden und Tiermodelle Untersuchungen zur Pathophysiologie erlauben [Straub 2004].

Die Genprodukte der Gliedergürteldystrophien können den Strukturen der Plasmamembran, des Sarkomers, dem Golgi-Apparat und der nukleären Lamina zugeordnet werden. Die meisten dieser Genprodukte sind an Zusammensetzung und Modifikation des Zytoskeletts beteiligt und erfüllen damit strukturelle Aufgaben in der Muskelzelle. Zwar werden viele dieser Genprodukte ubiquitär exprimiert, ihre Defekte kommen jedoch besonders in Herz- und Skelettmuskelzellen zur Geltung, da diese aufgrund ihrer Kontraktilität besonderen mechanischen und strukturellen Anforderungen ausgesetzt sind [Straub 2004]. Viele Patienten mit Gliedergürteldystrophie weisen erhöhte Kreatinkinase (CK)-Werte im Serum auf, was auf eine Schädigung der Zellmembran schließen lässt. Allerdings ist noch nicht geklärt, warum einander phänotypisch ähnlichen Formen der Gliedergürteldystrophie unterschiedliche Genotypen zugrunde liegen können, während in anderen Fällen identische Genotypen zu Phänotypen führen, die substantiell verschieden sind [Wicklund u. Hilton-Jones 2003]. Wahrscheinlich ist die Muskelfaserdegeneration

nur das gemeinsame Ergebnis mehrerer komplexer pathogenetischer Kaskaden [Straub 2004].

Krankheit	Linkage (Chromosom)	Genprodukt	Alter (in Jahren) bei Beginn der Erkrankung
<i>Autosomal dominant</i>			
LGMD 1A	5q22.3-31.3	Myotilin	20-40
LGMD 1B	1q11-21	Lamin A/C	<10
LGMD 1C	3p25	Caveolin-3	<10
LGMD 1D	6q23	unbekannt	15-50
LGMD 1E	7q	unbekannt	30-50
<i>Autosomal rezessiv</i>			
LGMD 2A	15q15.1	Calpain-3	5-40
LGMD 2B	2p13	Dysferlin	10-30
LGMD 2C-F	13q, 17q, 4q, 5q	γ -, α -, β -, δ -Sarkoglykan	3-20
LGMD 2G	17q11-q12	Telethonin	2-15
LGMD 2H	9q31-q34	TRIM32	5-30
LGMD 2I	19q13.3	Fukutin related protein	1-40
LGMD 2J	2q31	Titin	5-20

Tabelle 1. Die verschiedenen Gliedergürteldystrophien [Wicklund u. Hilton-Jones, 2003].

Bei etwa 60% der Patienten mit Gliedergürteldystrophie kann die Diagnose mittlerweile auf genetischer Grundlage gestellt werden [Straub 2004]. Bislang wurden für die verschiedenen Formen der LGMD 16 Genloki und 14 Genprodukte beschrieben (Tabelle 1).

Entsprechend ihrem Vererbungsmodus werden die einzelnen Gliedergürteldystrophien durch Ziffern unterschieden: LGMD 1 bezeichnet dominante, LGMD 2 rezessive Formen. Gemäß der Reihenfolge ihrer Entdeckung tritt ein Buchstabe hinzu. Sechs der bekannten Formen werden autosomal-dominant, zehn hingegen autosomal-rezessiv vererbt [Wicklund u. Hilton-Jones 2003]. Die dominanten Formen verlaufen eher milde und machen weniger als 10% aller LGMD-Fälle aus. Die rezessiven Formen hingegen sind mit einer kumulativen Prävalenz von 1:15.000 deutlich häufiger [Nigro 2003].

1.1.1.1 LGMD 2I

Im Jahr 2000 beschrieb die Gruppe um Driss bei einer Familie aus Tunesien erstmals Chromosom 19q13.3 als Locus einer autosomal-rezessiven Gliedergürteldystrophie, zu deren klinischen Merkmalen eine proximal beckenbetonte Muskelschwäche, ein variables Patiententalter bei Erkrankungsbeginn und unterschiedliche Verläufe bei betroffenen Geschwistern zählen [Driss et al. 2000]. Entsprechend der Nomenklatur wurde die Erkrankung LGMD 2I genannt. Brockington und seine Gruppe beschrieben im Jahr darauf Chromosom 19q13.3. als Sitz des Fukutin-Related Protein Gens (siehe unten). Mutationen in diesem Gen führen zur Kongenitalen Muskeldystrophie 1C [Brockington et al. 2001a] und sind, wie wenig später bekannt wurde, auch für die LGMD 2I verantwortlich [Brockington et al. 2001b]. Schließlich konnte die Gruppe um Driss Mutationen im FKRP-Gen auch bei ihrer tunesischen Familie identifizieren [Driss et al. 2003].

1.2 Dystrophin-Glykoprotein Komplex (DGC)

Besonders gut charakterisiert sind Gliedergürteldystrophien, die mit dem so genannten Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC) assoziiert sind, einem Komplex aus membranassozierten Proteinen und Glykoproteinen, der die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbindet [Straub u. Campbell 1997]. Ihm werden mechanische und strukturelle Funktionen [Mathews u. Moore 2003], aber auch Einflüsse auf andere zelluläre Aktivitäten wie die Signaltransduktion im Rahmen der Muskelzellreifung zugeschrieben [Brown et al. 1999]. Störungen dieser Achse können mit verschiedenen Formen von Muskeldystrophie einhergehen [Campbell 1993; Michele et al. 2002].

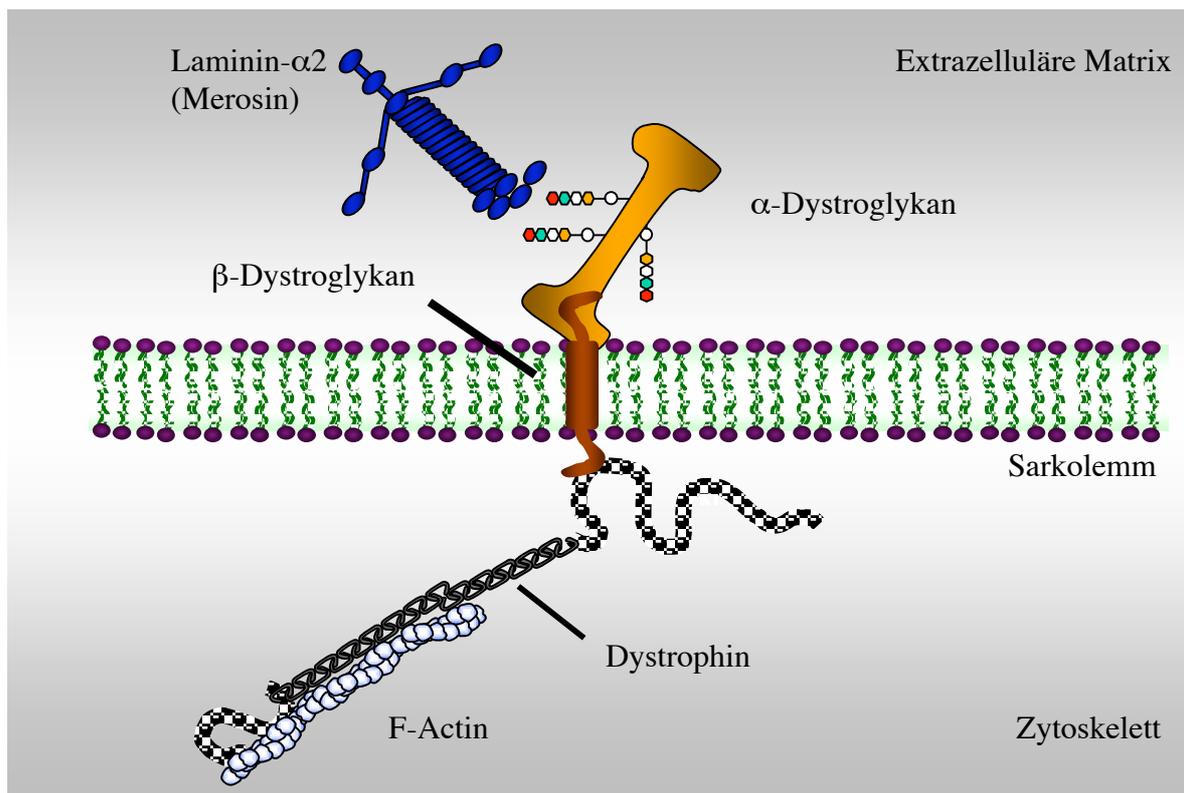


Abbildung 1. α -Dystroglykan im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC), vereinfacht (Sarkoglykane u.a. nicht dargestellt). α -Dystroglykan und Laminin- α 2 sind durch Zuckerketten (bunte Sechsecke) verbunden.

Als Schlüsselement des DGC gilt Dystroglykan (Abbildung 1). Dieses Protein besteht aus dem transmembranären β -Dystroglykan sowie aus α -Dystroglykan, einem peripheren Membranprotein. Beide werden von einem gemeinsamen Gen transkribiert [Holt et al. 2000], posttranslational modifiziert und ubiquitär exprimiert: α -Dystroglykan wird nach der Translation stark glykosyliert und dient dann als Rezeptor verschiedener Basalmembranproteine wie Laminin- α 1, Laminin- α 2 und Perlecan [Henry u. Campbell 1999] sowie als extrazellulärer Rezeptor für *Mycobacterium leprae* [Spear 1998], das Lymphozytische Choriomeningitis-Virus und verschiedene Arenaviren inklusive des Lassa-Virus [Cao et al. 1998]. β -Dystroglykan stellt als transmembranäres Protein die Verbindung zum intrazellulären Dystrophin her [Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992]. Insgesamt spielt Dystroglykan eine wesentliche Rolle beim Aufbau der Basalmembran respektive der Verknüpfung

des Aktin-assoziierten Zytoskeletts mit Komponenten der extrazellulären Matrix [Ervasti et al. 1991, Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992] und in der Pathogenese der Gliedergürteldystrophien, aber auch der Kongenitalen Muskeldystrophien (engl. muscular dystrophy congenital = MDC). Zum Beispiel verknüpft Laminin $\alpha 2$, das zusammen mit zwei anderen Lamininketten ($\beta 1$, $\gamma 1$) Bestandteil von Merosin ist, α -Dystroglykan mit der Basallamina [Henry u. Campbell 1999]. Mutationen im LAMA2-Gen, das für Laminin- $\alpha 2$ codiert, können sowohl zur Kongenitalen Muskeldystrophie [Helbling-Leclerc et al. 1995] als auch, seltener, zur Gliedergürteldystrophie führen [Naom et al. 1998].

1.3 FKR-Gen

Mehrere Formen der MDC sowie die LGMD 2I zählen zu einer wachsenden Gruppe von Muskeldystrophien, bei denen eine fehlerhafte Glykosylierung von α -Dystroglykan beschrieben wurde. Dadurch wird die Verbindung zwischen Dystroglykan und Laminin unterbrochen [Michele et al. 2002].

Es zeigte sich, dass sowohl der kürzlich entdeckten MDC 1C als auch der LGMD 2I Defekte im Fukutin Related Protein (FKRP)-Gen zugrunde liegen [Brockington et al., 2001a; Brockington et al. 2001b; Muntoni et al. 2002; Brockington et al. 2002; Karpati et al. 2002]. Dieses Gen ist erst seit kurzer Zeit bekannt und wurde aufgrund seiner Sequenzhomologie zum Fukutin-Gen, dem für die kongenitale Muskeldystrophie Typ Fukuyama verantwortlichen Gen, identifiziert [Brockington et al. 2001a].

Das FKR-Gen liegt auf Chromosom 19q13.3. Es ist 12.411 Basenpaare lang und besteht aus vier Exons, wobei Exon 4 neben Teilen der 5' UTR-Sequenz und der gesamten 3' UTR-Sequenz auch die komplette kodierende Sequenz enthält. Die anderen drei Exone enthalten lediglich 5' UTR-Sequenzen (Tabelle 2).

Exon	Exonlänge (bp)	Intronlänge (bp)	Bemerkungen
1	>33	1,936	5' UTR
2	62	426	5' UTR
3	141	6,746	5' UTR
4	3067	-	39 bp 5' UTR, 1488 bp kodierende Sequenz, 1540 bp 3' UTR

Tabelle 2 Daten zum FKRP-Gen.

bp = Basenpaare

Am stärksten wird FKRP in Skelettmuskel, Plazenta und Herz exprimiert [Bushby u. Beckmann 2003]. Das Produkt des FKRP-Gens, ein Protein aus 495 Aminosäuren, ist eine putative Glykosyltransferase: Wie Fukutin [Aravind u. Koonin 1999] weist es ein konserviertes DxD-Motiv auf, das für alle Glykosyltransferasen typisch ist [Breton u. Imberty 1999]. Das Fukutin-related Protein scheint eine wichtige Rolle bei der O-Glykosylierung von Glykoproteinen im Golgi-Apparat zu spielen [Esapa et al. 2002]; wie andere Glykosyltransferasen dieser Lokalisation verfügt es über eine transmembranäre Typ-2-Domäne [Bushby u. Beckmann 2003]. Mutationen im FKRP-Gen bedingen eine selektive α -Dystroglykan-Defizienz im Skelettmuskel - wahrscheinlich aufgrund des veränderten Glykosylierungsmusters, das für die Pathologie der Patienten essentiell ist [Brockington et al. 2001b]. In Abhängigkeit von der Glykoform des α -Dystroglykans variieren die jeweiligen Bindungspartner [Leschziner et al. 2000, Henry u. Campbell 1999]. Mangelhafte Glykosylierung hat eine Unterbrechung der Verbindung zwischen α -Dystroglykan und Laminin- α 2 zur Folge [Muntoni et al. 2002] (Abbildung 1).

1.3.1 Phänotypisches Spektrum bei Mutationen im FKRP-Gen

Das phänotypische Spektrum der Mutationen im FKRP-Gen ist breiter als das der meisten anderen Muskeldystrophien. Es reicht von der Gliedergürteldystrophie (LGMD) 2I bis zur Kongenitalen Muskeldystrophie (MDC) 1C. Die homozygote Punktmutation 826C>A führt zu einem Aminosäureaustausch (Leu276Ile) und ist nach bisherigen Erkenntnissen mit einem relativ milden klinischen Phänotyp assoziiert [Poppe et al. 2003, Mercuri et al. 2003]; teils bleiben die Patienten bis ins sechste Lebensjahrzehnt symptomfrei. Patienten mit derselben Mutation (826C>A) in zusammengesetzt heterozygoter Form weisen in der Regel einen schwereren bzw. „Duchenne-like“ Phänotyp mit früherem Erkrankungsbeginn auf [Mercuri et al. 2003]. Die am schwersten betroffenen Patienten sind schon als Kinder nicht in der Lage, ohne Hilfe zu laufen; im ersten oder zweiten Jahrzehnt ihres Lebens entwickeln sie respiratorische und kardiale Komplikationen. Bei ihnen findet man selten die Mutation C826A, sondern meist zwei andere zusammengesetzt heterozygote Missense-Mutationen oder eine Missense- und eine Stopmutation [Bushby u. Beckmann 2003].

Patienten mit zwei Null-Allelen wurden bislang nicht beschrieben; dieser Zustand ist wahrscheinlich mit dem Leben nicht vereinbar [Bushby u. Beckmann 2003].

1.3.2 Phänotyp bei LGMD 2I

Den Gliedergürteldystrophien ist eine Schwäche im Bereich von Schulter- und Beckengürtelmuskulatur gemein, die der Erkrankung ihren Namen gab, sich allerdings bei zahlreichen Myopathien unterschiedlicher Genese findet und daher nicht spezifisch ist. Im Verlauf kann sich die Muskelschwäche auf distale Abschnitte der Extremitäten ausweiten, während Gesichts- und Nackenmuskulatur fast nie betroffen sind [Straub 2004]. Unterschiede bestehen bezüglich des Alters bei Beginn der Erkrankung, des Krankheitsverlaufs, des Ausmaßes der Muskelbeteiligung und des Schweregrades der Symptome bei nichtverwandten Patienten, aber auch bei Patienten innerhalb derselben Familie.

In einer neueren Studie wird eine eher armbetonte muskuläre Schwäche beim „Duchenne-like“ Phänotyp sowie eine eher beinbetonte Schwäche beim milderen Phänotyp der LGMD 2I beschrieben [Mercuri et al. 2003]. Ferner stellten die Autoren bei fast allen Patienten eine Hypertrophie der Waden, bei manchen eine Schwäche der axialen Muskulatur mit konsekutiver Skoliose und bei zwei Patienten eine progressive Makroglossie mit schmerzhaften Zungenkrämpfen fest. Mehr als die Hälfte der Patienten wies eine dilatative Kardiomyopathie auf. Sechs von achtzehn Patienten waren auf nächtliche Beatmung angewiesen – sie alle zeigten den „Duchenne-like“-Phänotyp.

Aus einer anderen Studie sind 16 Patienten mit LGMD 2I im Alter von 13 bis 58 Lebensjahren bekannt, deren klinischer Verlauf bis zu 11 Jahre lang beobachtet wurde [Poppe et al. 2003]. Bei dreizehn Patienten konnte die häufige Mutation C826A homozygot im FKRP-Gen nachgewiesen werden, hier zeigten sich erste Symptome im Erwachsenenalter. Drei weitere Patienten trugen C826A in zusammengesetzt heterozygoter Form, zwei von ihnen waren schon als Kinder in der Klinik vorstellig geworden. Im Verlauf wurden bei vielen Patienten Komplikationen beobachtet, so ein Abfall der forcierten Vitalkapazität, begleitet von Zeichen der Zwerchfellschwäche und nächtlicher Hypoventilation. Fünf Patienten waren auf nächtliche Heimbeatmung angewiesen, und zwar zu einem Zeitpunkt, als sie noch selbständig gehen konnten. Ein Drittel der Patienten wies kardiomyopathische Veränderungen auf.

1.4 Gliedergürteldystrophie: Diagnostik

Die Diagnosestellung kann beim einzelnen Patienten kompliziert sein. Eine wichtige Rolle nehmen Stammbaumanalyse und Familienanamnese ein [Mathews u. Moore, 2003]. Zudem sollte der ethnische Hintergrund des Patienten und seiner Familie erörtert werden, da dies Zuordnungen zu den einzelnen Formen der Gliedergürteldystrophien erleichtern kann. Erkrankungsbeginn, Verteilungsmuster sowie der Verlauf der Muskelschwäche sind ebenso in Erfahrung zu bringen wie Muskelschwellungen, Myalgien, myoglobininurische Episoden, kardiale Symptome und Zeichen nächtlicher Hypoventilation [Straub 2004]. Mittels elektromyographischer Untersuchungen erfolgt die Abgrenzung zu Myotonien und Myasthenien, Schlüsse

auf die jeweilige Form der Gliedergürteldystrophie bzw. die Abgrenzung einer Gliedergürteldystrophie von anderen Muskeldystrophien lässt diese Methode allerdings nicht zu. Mit bildgebenden Verfahren wie Ultraschall, Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) können Strukturveränderungen der Muskulatur nachgewiesen werden. Differentialdiagnostisch gewinnen bildgebende Verfahren an Bedeutung, da die Verteilungsmuster solcher Strukturveränderungen bei den einzelnen Formen der Gliedergürteldystrophie verschieden und zum Teil relativ spezifisch sind.

1.4.1 Magnetresonanztomographie bei LGMD 2I

Patienten mit LGMD 2I zeigen einen charakteristischen klinischen Phänotyp mit vorwiegender Schwäche der Hüftbeuger-, Hüftadduktoren-, Kniebeuger- und Fußhebermuskulatur. Unter Einschluss von Patienten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit klinisch und molekulargenetisch charakterisiert worden waren, konnte die Gruppe um Fischer zeigen, dass diese klinischen Befunde mit den Ergebnissen kernspintomographischer Untersuchungen korrelieren: Es fanden sich ausgeprägte Signalveränderungen in der Adduktoren-, der hinteren Oberschenkel- sowie der hinteren Wadenmuskulatur. Dieser charakteristische klinische und magnetresonanztomographische Phänotyp wurde auch bei der LGMD 2A gefunden, allerdings zeigten Patienten mit LGMD 2A zusätzlich Signalveränderungen des Musculus gastrocnemicus medialis und des Musculus soleus, welche bei keinem der Patienten mit LGMD 2I zu finden waren. Patienten mit LGMD 2D oder der Muskeldystrophie Becker-Kiener wiesen andere Verteilungsmuster auf: Hier waren die Signalveränderungen eher im Bereich der vorderen Oberschenkelmuskulatur zu finden. Die Magnetresonanztomographie kann also ein Instrument zur Unterscheidung der LGMD 2I von anderen autosomal-rezessiven Gliedergürteldystrophien und Dystrophinopathien sein [Fischer et al. 2004].

In keiner der bisherigen Studien wurden bei Patienten mit LGMD 2I Veränderungen des zentralen Nervensystems festgestellt, die über Zeichen einer minimalen Hirnatrophie hinausgingen [Poppe et al. 2003, Mercuri et al. 2003].

1.4.2 Muskelbiopsische Befunde bei LGMD 2I

Zur genauen Bestimmung der Kandidatengene wird neben der anamnestisch-ethnischen Zuordnung des Patienten häufig eine Muskelbiopsie entnommen. Histologisch zeigen die betroffenen Muskeln Variationen des Faserkalibers, ein Nebeneinander von de- und regenerierenden Muskelfasern sowie bereits in frühen Krankheitsstadien endo- und perimysiale Fibrosen. Diese Befunde führen zur Diagnose „Muskeldystrophie“, während die Zuordnung zu einer spezifischen Form der Gliedergürteldystrophie ohne weiteres nicht gelingt. Zur spezifischen Differentialdiagnostik werden immunhistochemische Untersuchungen, Western-Blots und ggf. eine Elektronenmikroskopie durchgeführt. Bei eher schwer betroffenen Patienten mit LGMD 2I wurden immunhistochemisch eine sekundäre Abschwächung von Laminin- α 2 beobachtet, und in fast allen Fällen fand sich eine Reduktion von α -Dystroglykan [Brockington et al. 2001b]. Patienten mit mildem Phänotyp können hingegen für beide Proteine normale Expressionsmuster aufweisen [Mercuri et al. 2003].

1.4.3 Molekulargenetik

Hierzu zählen Kopplungsanalysen und die direkte Sequenzierung von Kandidatengenen.

Präzise (molekulargenetische) Diagnosen sind bei Gliedergürteldystrophien erstrebenswert

- zur Abschätzung von Verlauf und Prognose,
- im Hinblick auf die Berufswahl des Patienten,
- zur Prävention von Komplikationen (z.B. durch Herzschrittmacher, Beatmung),
- zur genetischen Beratung des Patienten und seiner Familie,
- für eine mögliche pränatale Diagnostik,
- für den Einschluss in klinische Studien
- für künftige molekulare Therapieformen.

Ursprünglich wurden Gliedergürteldystrophien lediglich aufgrund ihres autosomalen Erbganges von den Muskeldystrophien Typ Duchenne und Becker-Kiener abgegrenzt, die gleichermaßen mit einer Schwäche der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur einhergehen. Neben diesen Dystrophinopathien, die X-chromosomal vererbt werden, sind differentialdiagnostisch auch die kongenitalen Muskeldystrophien (MDC) in Betracht zu ziehen, insbesondere die autosomal-rezessive MDC 1A. Bei manchen Formen der CMD und der LGMD liegen die Defekte auf dem gleichen Gen (siehe oben), so bei der LGMD 2I und der MDC 1C.

Ferner kommen in Frage: die X-chromosomale Muskeldystrophie Emery-Dreifuss (EDMD1), die autosomal dominante Facio-scapulo-humerale Muskeldystrophie (FSHD) und die autosomal dominanten myotonen Dystrophien Typ 1 und Typ 2 (DM 1, DM 2).

Innerhalb der Gruppe der Gliedergürteldystrophien kommen differentialdiagnostisch bislang sechs autosomal-dominante und zehn rezessive Formen in Betracht (Tabelle 1). Bei drei der sechs dominanten Formen konnten die betroffenen Gene identifiziert werden, deren Produkte Myotilin (LGMD 1A) [Hauser et al. 2000], Lamin A/C (LGMD 1B) [Bonne et al. 1999] und Caveolin-3 (LGMD 1C) [Minetti et al. 1998] sind. Drei weiteren Formen konnten bestimmte Genorte zugeordnet werden, die Gene allerdings sind bislang noch nicht bekannt. Es handelt sich um Chromosom 6q22 (LGMD 1D) [Messina et al. 1997], Chromosom 7q35 (LGMD 1E) [Speer et al. 1999] und Chromosom 7q31 (LGMD 1F) [Palenzuela et al. 2003]. Die Genprodukte der zehn rezessiven Formen sind Calpain-3 (LGMD 2A) [Richard et al. 1995], Dysferlin (LGMD 2B) [Bashir et al. 1998] [Liu et al. 1998], α -Sarkoglykan (LGMD 2D) [Roberds et al. 1994], β -Sarkoglykan (LGMD 2E) [Bönnemann et al. 1995], γ -Sarkoglykan (LGMD 2C) [Noguchi et al. 1995], δ -Sarkoglykan (LGMD 2F) [Nigro et al. 1996], Telethonin (LGMD 2G) [Moreira et al. 2000], TRIM32 (LGMD 2H) [Frosk et al. 2002], Fukutin-related Protein (LGMD 2I) [Brockington et al. 2001] und Titin (LGMD 2J) [Hackman et al. 2002]. Allerdings wurden all diese Loci bei zahlreichen Patienten bereits ausgeschlossen: in etwa 40% der Fälle konnte bislang keiner der bekannten genetischen Defekte gefunden werden [Straub 2004]. In näherer Zukunft

ist daher mit der molekularen Zuordnung weiterer Formen der Erkrankung zu rechnen [Nigro 2003].

1.6 Therapie der LGMD

Bislang steht keine kausale Therapie der Gliedergürteldystrophien zur Verfügung. Die optimale Betreuung der LGMD-Patienten fordert eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Neurologen, Neuropädiatern, Orthopäden, Humangenetikern, Kardiologen, Pneumologen, Physio- und Ergotherapeuten. Grundvoraussetzung sind regelmäßige klinische Untersuchungen, kardiale Diagnostik (EKG, Echokardiogramm), Lungenfunktionstests, Polysomnographien und orthopädische Beurteilungen [Straub 2004]. Bei nächtlicher Hypoventilation im Rahmen der Polysomnographie ist eine assistierte Beatmung notwendig, Kardiomyopathien werden u.a. mit ACE-Hemmern behandelt [Straub 2004]. Physiotherapeutische Maßnahmen zielen vor allem auf die Verhinderung von Gelenkkontrakturen ab.

Von erfolgreichen Einzelfallbehandlungen mit Steroiden wurde bei Patienten mit Sarkoglykanopathien berichtet [Angelini et al. 1998].

Kreatinmonohydrat, das die maximale Leistungsfähigkeit der Muskulatur verlängert und eine Verkürzung der Erholungszeit bewirkt, wurde im Rahmen einer placebokontrollierten Doppelblindstudie eine milde, aber signifikante Besserung der Muskelkraft sowie gute Verträglichkeit bescheinigt. Die Studie schloss 36 Patienten ein, darunter solche mit Sarkoglykanopathie (LGMD 2D) [Walter et al. 2000].

Die Gruppe um Barton-Davis legte 1999 eine Studie vor, in der sich zeigte, dass bei mdx-Mäusen nach Gabe von Aminoglykosid-Antibiotika das prämaturne Stop-Codon im Dystrophin-Gen überlesen wird. Dabei wurde eine partielle Wiederherstellung der Muskelfunktion beobachtet [Barton-Davis et al. 1999]. Die Autoren wiesen darauf hin, dass Gentamycin auch bei anderen Muskeldystrophien zum Einsatz kommen könnte, wenn in dem betroffenen Gen ein prämaturnes Stop-Codon vorliegt. Allerdings konnten die Ergebnisse in anderen Studien nicht reproduziert werden [Dunant et al. 2003]. Zudem wurde in klinischen Studien bei ausgewählten Patienten

mit Muskeldystrophie Duchenne keine erhöhte Dystrophinexpression nach Gentamycingabe festgestellt [Wagner et al. 2001].

1.6.1 Künftige Therapieformen

Ansätze wie Gentherapie, Stammzelltherapie oder Myoblastentransfer haben noch keinen Eingang in die klinische Praxis gefunden. Studien zeigen allerdings, dass durch Adenoviren und Adeno-assoziierte Vektoren die Sarkoglykan-Expression bei α - und γ -Sarkoglykan-defizienten Mäusen sowie bei δ -Sarkoglykan-defizienten Hamstern wiederhergestellt werden kann [Allamand et al. 2001, Stedman et al. 2000].

1.7 Kongenitale Muskeldystrophien (MDC)

Auch Kongenitale Muskeldystrophien (engl. Muscular dystrophies congenital, MDC) sind eine heterogene Gruppen genetisch determinierter, progredienter Erkrankungen der Muskulatur. Wie bei den Gliedergürteldystrophien findet man fortschreitende Muskelschwäche und –atrophie. Unterschiede betreffen das Verteilungsmuster, das Manifestationsalter und den Schweregrad der Erkrankung [Brockington et al., 2001a; Brockington et al., 2001b; Muntoni et al., 2002; Brockington et al., 2002; Karpati et al., 2002; Wagner, 2002]. Die Erkrankung tritt bei Geburt oder während der ersten sechs Lebensmonate in Erscheinung. Merkmale sind Muskelschwäche und –hypotonie, Kontrakturen sowie dystrophische Veränderungen in der Skelettmuskelbiopsie [Dubowitz 1995]. Dabei sind die Schweregrade der motorischen Entwicklungsverzögerung, der physischen Behinderung und der Muskelpathologie sowie der Anstieg der Kreatinkinase (CK) im Serum variabel, ebenso wie das Ausmaß mentaler Retardierung und struktureller Hirndefekte. Epidemiologische Daten legen nahe, dass Kongenitale Muskeldystrophien zu den häufigsten erblichen neuromuskulären Erkrankungen zählen [Mostacciuolo et al. 1996].

Während Gliedergürteldystrophien rezessiv oder dominant vererbt werden, weisen kongenitale Muskeldystrophien stets rezessive Erbgänge auf. 1994 wurden erstmals Mutationen im LAMA2-Gen beschrieben, das für die Laminin α 2-Kette von Merosin kodiert [Tome et al. 1994, Helbling-Leclerc et al. 1995]. Mutationen in diesem Gen sind für bis zu 40% aller MDC-Fälle verantwortlich [Pegoraro et al. 1998].

1.7.1 MDC bei Mutationen im FKRP-Gen

Der schweren Kongenitalen Muskeldystrophie 1C liegen Mutationen im FKRP-Gen zugrunde [Brockington et al., 2001a]. Klinische Merkmale sind der Krankheitsbeginn während der ersten Lebenswochen, schwere Schwäche und Atrophie der Schultergürtelmuskulatur, Hypertrophie und Schwäche der Beinmuskulatur (Waden- und Oberschenkelhypertrophie), Unfähigkeit zu laufen, stark erhöhte Serum-CK-Spiegel und eine schwere restriktive Ventilationsstörung bei erhaltener Intelligenz und normaler Hirnstruktur in der Bildgebung [Brockington et al. 2001a; Mercuri et al.

2003]. Ferner finden sich sekundäre Defizienzen von Laminin $\alpha 2$ sowie ein immunhistochemisch und im Western Blot abgeschwächtes α -Dystroglykan [Brockington et al. 2001a]. Diese Abschwächung wird, ähnlich wie die Abschwächung bei der LGMD 2I, auf einen Glykosylierungsdefekt zurückgeführt und scheint für die Pathogenese der MDC 1C essentiell zu sein [Brockington et al. 2001a].

Kürzlich wurden bei zwei weiteren Formen kongenitaler Muskeldystrophien homozygote FKRP-Mutationen gefunden, und zwar Tyr307Asn bei der muscle-eye-brain-Krankheit und Cys318Tyr beim Walker-Warburg-Syndrom [Beltran-Valero de Bernabé et al. 2004]. In beiden Fällen geht die Muskeldystrophie mit schweren strukturellen Hirn- und Augenschäden einher. Zuvor waren bei zwei Familien mit Kongenitaler Muskeldystrophie 1C und homozygoten FKRP-Mutationen zerebelläre Zysten beschrieben worden [Topaloglu et al. 2003]. Die Autoren halten diese Mutationen und die durch sie verursachten Glykosylierungsdefekte für besonders schwerwiegend, da eine Beteiligung von Auge und Gehirn bei anderen FKRP-Mutationen bis dahin nicht beobachtet worden war, wenngleich FKRP in Auge und Gehirn exprimiert wird.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse des FKRP-Gens bei Gliedergürteldystrophie 2I (LGMD 2I). 124 mehrheitlich deutschstämmige Patienten mit den passenden klinischen und apparativen Befunden sollen auf Mutationen im FKRP-Gen untersucht werden.

Dann soll eine Korrelation phänotypischer und genetischer Daten erfolgen, deren Ziel es ist, das Verständnis von Mutationen im FKRP-Gen zu verbessern und die Abschätzung von Prognose und Verlauf der LGMD 2I zu erleichtern, insbesondere angesichts schwerwiegender Differentialdiagnosen, der Berufswahl des Patienten, zur Prävention von Komplikationen, zur genetischen Beratung, für eine eventuelle pränatale Diagnostik sowie zum Einschluss in klinische Studien für künftige Therapieformen.

Ferner soll diese Arbeit helfen, das diagnostische Vorgehen bei Patienten mit Verdacht auf LGMD 2I zu vereinfachen und den Patienten Belastungen durch unnötige diagnostische Maßnahmen zu ersparen.

3. Material, Methoden

3.1 Patienten

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Patienten wurden von erfahrenen Neurologen klinisch untersucht. Bei 20 von 124 Patienten fanden sich Mutationen im FKRP-Gen. 18 Patienten sind deutschstämmig und leben in Deutschland. Ein Patient ist deutschstämmig, lebt aber in Ungarn; ein weiterer Patient ist Kroate. Die Stammbäume der Patienten sind mit autosomal-rezessiven Erbgängen vereinbar.

Elektromyographisch zeigten die betroffenen Muskeln aller Patienten Zeichen einer chronischen Myopathie. Bei 19 der 20 Patienten war zudem eine diagnostische Muskelbiopsie durchgeführt worden, hier zeigten sich verschiedene Grade einer chronisch-nekrotisierenden Myopathie ohne entzündliche oder spezifische strukturelle Veränderungen. In keinem der Fälle lag der Anteil nekrotischer Muskelfasern über 10%. In 17 Fällen waren immunhistochemische Untersuchungen und/oder ein Immunoblot durchgeführt worden. Zur Mutationsanalyse wurde genomische DNA aus venösem Vollblut extrahiert. Bei allen Patienten wurden eine Echokardiographie und Lungenfunktionstests durchgeführt, bei 12 Patienten zusätzlich ein Magnetresonanztomogramm des Schädels.

3.2 Immunhistochemie

In einem Kryostaten wurden serielle Querschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf gelatine-beschichtete Objektträger gelegt und jeweils eine Minute in Azeton fixiert. Die Inkubation der Schnitte mit monoklonalen Antikörpern für α -Dystroglykan (Clone VIA4-1, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) und Merosin (MAB 1922, Chemicon, Temecula, Kanada) erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller. Hierauf folgte die Inkubation mit einem sekundären Biotin-konjugierten Anti-Maus-Immunglobulin (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und Streptavidin-gekoppeltem Cy3 (Dianova, Hamburg, Deutschland).

3.3 Analyse von Mutationen im FKRP-Gen

Den Patienten und, falls möglich, ihren Familienmitgliedern wurde venöses Blut entnommen. Insgesamt wurden 124 Patienten (81 Patienten von der LMU München, 33 Patienten von der Universität Bonn, 10 Patienten aus anderen Zentren) mit bis dahin genetisch nicht klassifizierter Gliedergürteldystrophie untersucht. Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Patienten bzw. mit Zustimmung ihrer Erziehungsberechtigten. Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt vor (Projektnummer: 107/01).

Zur Differentialdiagnostik war bis auf sieben Fälle allen Patienten eine diagnostische Muskelbiopsie entnommen worden. Diese Biopsien waren mittels Immunhistochemie und Immunoblot auf Dystrophin-, Sarkoglykan-, Dysferlin-, Caveolin-3- und Calpain-3-Defizienzen untersucht worden. Es fanden sich keine Auffälligkeiten bis auf eine moderate Reduktion von Calpain-3 bei 29 Patienten. Nach Ausschluss von Mutationen im CAPN3-Gen durch direkte Sequenzierung wurde die Calpain-3-Defizienz dieser Patienten als sekundär eingestuft.

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das Fragment der Patienten-DNA amplifiziert, in dem die häufige FKRP-Mutation 826 C>A zu finden ist (Primer: 3F 5'-ACCAGCCTCTTTCTGCAGACC-3' und 4R 5'-CCTTCTCCCATACGAAGC-3'). Dieses Fragment, dessen Länge 532 Basenpaare beträgt, wurde dann aufgereinigt und mit einer Restriktions-Endonuklease (Bfa1, New England Biolabs, Frankfurt/Deutschland) inkubiert. Die Endonuklease zerschneidet das nicht mutierte PCR-Produkt in zwei kürzere Fragmente von 168 und 364 bp Länge, während mutierte DNA ungeschnitten bleibt.

Wenn sich beim Restriktionsverdau Mutationen fanden, wurden die PCR-Fragmente zur Bestätigung sequenziert. Bestätigte die Sequenz den Mutationsfund des Verdau, so wurde bei jedem Mutationsträger die gesamte kodierende Region des FKRP-Gens sequenziert, d.h. Exon 4 mit den flankierenden Abschnitten des 3. Introns und der 3'-untranslationierten Region.

Sofern das Einverständnis vorlag, wurden auch Verwandte der Patienten per Sequenzierung und Restriktionszymanalyse auf die FKRP-Mutation 826 C>A getestet.

Fand sich eine bis dahin in der Literatur nicht beschriebene Missense-Mutation, so wurden die betroffenen Patienten, ihre Verwandten und je 50 Normalkontrollen durch Restriktionsenzymanalysen und die Sequenzierung entsprechender PCR-Produkte hinsichtlich dieser neuen Mutationen untersucht.

Um die Häufigkeit der FKRP-Mutation 826 C>A in der Allgemeinbevölkerung zu bestimmen, wurden zusätzlich 300 Normalkontrollen mit der DNA gesunder Individuen durchgeführt (entsprechend 600 Chromosomen).

3.3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten, soweit nicht anders erwähnt, von der Firma Sigma (Taufkirchen/Deutschland).

3.3.2 DNA-Extraktion

Zur Analyse von Mutationen im FKRP-Gen wurde die genomische DNA aus venösem EDTA-Vollblut extrahiert. Hierfür wurde der Blood and Tissue Culture Extraction Kit von Qiagen (Hilden/Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Teile des 4. Exons oder das gesamte 4. Exon des FKRP-Gens sowie flankierende intronische bzw. untranslatierte Bereiche und Abschnitte der Promotorregion wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion = PCR) amplifiziert. Dieses Verfahren ermöglicht die exponentielle Vermehrung definierter DNA-Abschnitte *in vitro* (Mullis, 1990).

3.3.3.1 PCR-Reaktionsbedingungen / Standardprotokoll

Das Reaktionsvolumen eines typischen PCR-Ansatzes beträgt 50 µl, bestehend aus:
5 µl Reaktionspuffer 10x (ThermoPol Buffer; New England Biolabs, Frankfurt a.M./Deutschland)

1,25 mM sense-Primer

1,25 mM antisense-Primer

10 mM PCR Nucleotide Mix (MBI, St.Leon-Rot/Deutschland)

1 µg genomische DNA

2,5 Units Taq DNA-Polymerase (Roche, Mannheim/Deutschland)

Teils wurden die Bedingungen durch Zusatz von Mg²⁺ in verschiedenen Konzentrationen, durch Änderung des pH-Wertes oder durch Zugabe von zehnpromutigem Dimethylsulfoxid optimiert.

Die PCR wurde mittels eines Thermocyclers (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg/Deutschland) durchgeführt.

Ein typisches PCR-Programm läuft folgendermaßen ab:

1. 95°C: 5 Min.	Denaturierung der DNA
2. 32 Zyklen: (1) 94°: 30 Sek. (2) 52°: 1 Min. (3) 72°: 1 Min.	Aufschmelzung der DNA-Doppelstränge Anlagerung der Primer (Annealing) Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)
3. 72°C: 7 Min.	Abschließende Extension

3.3.3.2 Primer

Sämtliche Primer wurden anhand von Sequenzen aus der Gendatenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) sowie der University of California, Genome Bioinformatics Group (<http://www.genome.ucsc.edu>) entworfen. Die

Synthese der Primer übernahm die Abteilung von Dr. G. Arnold (Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München).

3.3.3.2.1 Exon 4 des FKRP-Gens

Das FKRP-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q13.3). Es besteht aus vier Exons, wobei das kodierende vierte Exon 1488 Basenpaare lang ist. Dieses vierte Exon samt flankierender Intron-Sequenz und der flankierenden 3'-untranslatierten Region wurde bei homozygoten und bei heterozygoten Trägern der FKRP (826 C>A)-Mutation komplett sequenziert (Genbank-Zugangsnummer NT_011166).

Folgende Primerpaare wurden für die PCRs aus genomischer DNA verwendet:

Primer-paar	Sequenz	Zielregion	Länge des Fragments (bp)	Annealing-temperatur (°C)
FKRP-1F FKRP-1R	5' AAAGGGAATTGAGAAAGAGC 3' 5' GCAGGAAGGAGTCTACCAG 3'	Exon 4	360	52°C
FKRP-1F FKRP-2R	siehe oben 5' CCGAGAGGTTGAAGAGGT 3'	Exon 4	780	52°C
FKRP-2F FKRP-3R	5' TCGAGGCATTTGACAACGCGG 3' 5' GTTGCAGCCGAACCACTCCA 3'	Exon 4	706	52°C
FKRP-3F FKRP-4R	5' ACCAGCCTCTTTCTGCAGACC 3' 5' CCTTCTCCCATAACGAAGC 3'	Exon 4	534	52°C
FKRP-4F FKRP-5R	5' ATCTACTTGGAGGACGTGGGCAA 3' 5' GCTCACACAGAGCTTCTCC 3'	Exon 4	457	52°C

3.3.3.2.2 Mismatch-Primer

In einem Fall kamen bei der Restriktionsenzymanalyse so genannte Mismatch-Primer zum Einsatz, mit denen man zusätzlichen Schnittstellen für Restriktionsenzyme in PCR-Produkte einfügen kann. Bei der Synthese von Mismatch-Primern wird eine Base der Wildtyp-Sequenz durch eine andere ersetzt, die nahe der gewünschten Schnittstelle liegt.

Folgendes Primerpaar wurde für die Mismatch-PCR verwendet:

Primer-paar	Sequenz	Zielregion	Länge des Fragments (bp)	Annealing-temperatur (°C)
352s 352as	5'-TACCTCTACGAGGAGCGCTGGACGC-3' 5'-TCCCATGGGATGATGTCCCCGCGGC-3' (*)	Exon 4	161	52°C

(*) Mismatch-Primer. C = modifizierte Base.

3.3.3.2.3 Promotor

Zusätzlich wurde bei allen Patienten ein Teil der Promotorregion des FKRP-Gens sequenziert (Genbank-Zugangsnummer NP_077277):

Folgendes Primerpaar wurde für die PCR der Promotorregion verwendet:

Primer-paar	Sequenz	Zielregion	Länge des Fragments (bp)	Annealing-temperatur (°C)
PRO-1S PRO-1R	5' TTACACAGCCCTCCTTCCG 3' 5' GCCGCCATCTTGGAGCAAT 3'	Promotor	603	50°C

3.3.3.3 Aufreinigung der PCR

Alle PCR-Proben wurden mittels Elektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel aufgetrennt. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurde die Agarose-Konzentration zwischen 2% und 4% gewählt. Unter Durchleuchtung mit UV-Licht wurden die gewünschten PCR-Fragmente im Gel sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.3.4 Verdau von PCR-Fragmenten mit Restriktionsenzymen

Neben FKRP 826 C>A wurden alle bis dahin in der Literatur nicht beschriebenen Missense-Mutationen durch Sequenzierung der jeweiligen PCR-Produkte und mittels einer Restriktionsenzymanalyse nachgewiesen (siehe unten). Zur Restriktionsenzymanalyse („Verdau“) wurden 1-10 µg DNA in einem Standardansatz mit 2 µl 10x-Puffer und 1 µl (10-20 Units) eines Restriktionsenzymen versetzt. Dieser Ansatz wurde dann mit destilliertem Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Verdau erfolgte über mindestens drei Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur.

Bei den Enzymen und den Mutationen handelt es sich im einzelnen um:

Mutation	Primer (Sequenz s.o.), Länge des PCR-Fragments	Enzym, Hersteller	Schnitt bei Wildtyp oder Mutante? (Fragmentlängen)
Leu276Ile (826C>A)	FKRP-3F, FKRP-4R 532 bp	BfaI (New England Biolabs, Frankfurt/Deutschland)	Wildtyp (168 bp, 364 bp) [Mutante 532 bp]
Val121Glu (362T>A)	FKRP-2F, FKRP-2R 468 bp	BalI (Promega, Mannheim/Deutschland)	Wildtyp (198 bp, 270 bp) [Mutante 468 bp]
Val300Ala (899T>C)	3F, 4R 532 bp	SacII (MBI Fermentas, St. Leon-Rot/ Deutschland)	Mutante (68 bp, 174 bp, 290 bp) <i>und</i> Wildtyp (68 bp, 464 bp)
Arg352Gly (1054C>G)	3F, 4R 532 bp, <i>dann erneute PCR mit</i> 352s, 352as (*) 161 bp	Eco52I (MBI Fermentas) zum Verdau des 161 bp- Fragmentes.	Mutante (135 bp, 26 bp) [Wildtyp 161 bp]

(*) Mismatch-Primer (siehe oben).

3.3.5 Sequenzanalyse

Alle zu untersuchenden PCR-Produkte wurden sowohl in sense- als auch in Antisense-Richtung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch das Labor von Dr. H. Blum (LMU, Genzentrum München) mittels eines DNA-Sequenzierers der Firma Applied Biosystems (Modell 3100 Avant) und fluoreszierender Didesoxy-Terminatoren der Firma Perkin-Elmer (Foster City, CA, USA).

Anschließend wurden die Sequenzen auf Mutationen geprüft. Die Vergleiche mit der entsprechenden Wildtypsequenz erfolgte online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.4 Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher Spezies

Über den Server des National Center for Biotechnology Information wurden Aminosäuresequenzen des FKRP-Gens verschiedener Spezies bezogen (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi). Der Vergleich erfolgte mittels FASTA-Software. Die Genbank-Nummern lauten *NP_077277* (Homo sapiens); *NP_775606* (Mus musculus); *XP_218425* (Rattus norvegicus); *NP_611531* (Drosophila melanogaster) und *XP_314789* (Anopheles gambiae).

3.5 Frequenz intragenischer Polymorphismen

Außerdem wurden die Frequenzen zweier intragenischer Polymorphismen in mutierten (826C>A) und normalen Allelen mittels Sequenzanalyse bestimmt. Diese Polymorphismen sind -621C/G in der Promotorregion und 135C/T im vierten Exon des FKRP-Gens. Die Kopplung der Polymorphismen mit der Mutation 826 C>A wurde im Fisher Exact Test untersucht. Da Patient 3 der Bruder von Patient 1 in Tabelle 3 (siehe unten) ist, wurden seine Allele in der Kalkulation nicht berücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Insgesamt wurden 124 Patienten untersucht. Bei 20 Patienten aus 19 verschiedenen Familien konnte die FKRP-Mutation 826C>A in homo- oder heterozygoter Form nachgewiesen werden (Abbildung 2).

Relevante klinische und genetische Befunde sind in Tabelle 3 zusammengefasst, Abbildung 3 demonstriert den klinischen Phänotyp.

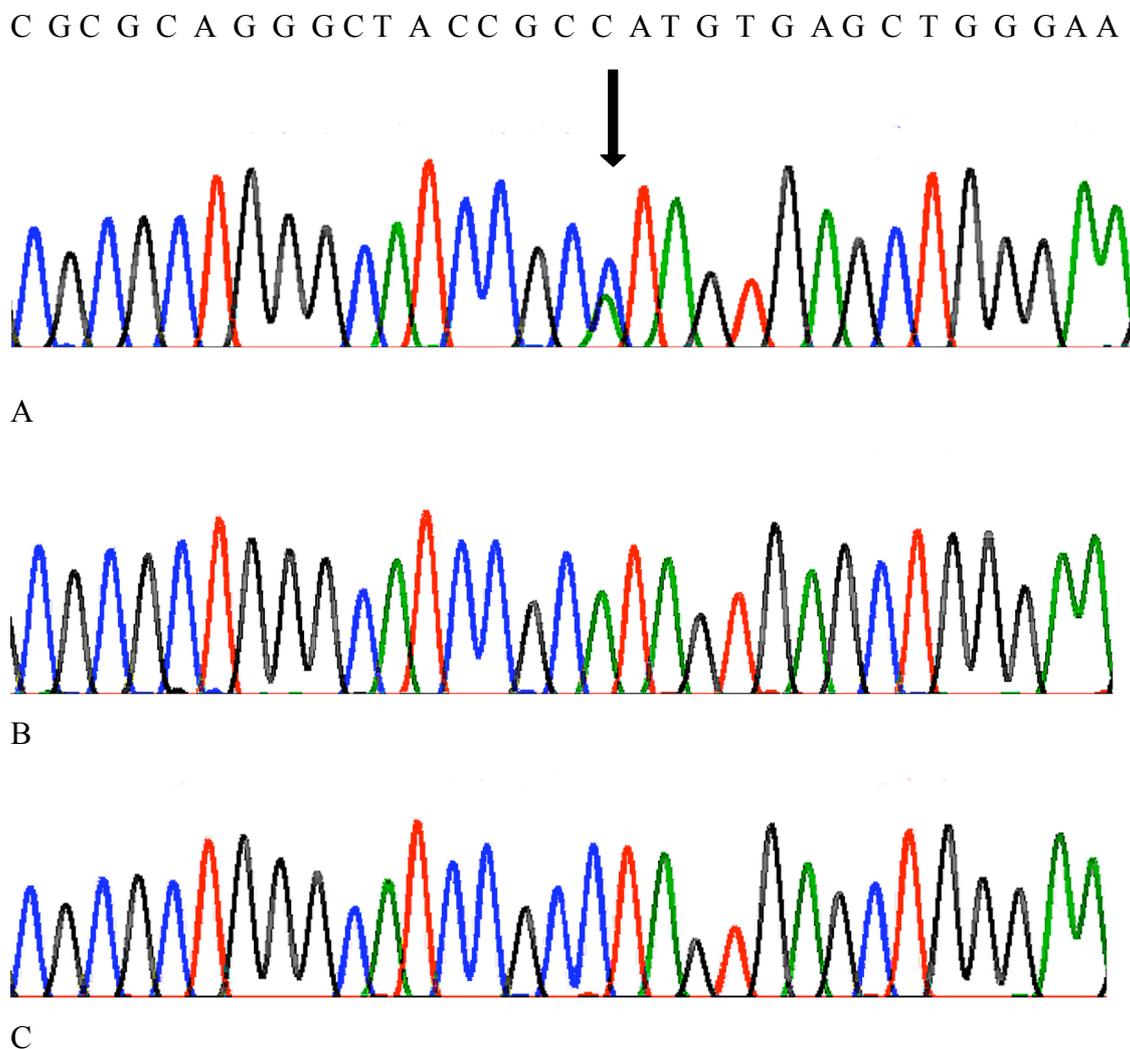


Abbildung 2 Ausschnitt der Sequenz des 4. Exons des FKRP-Gens. Der Pfeil weist auf die Position der „common mutation“ 826C>A (Leu276Ile), hier in A) heterozygoter und B) homozygoter Form. C) Wildtyp.

4.1.1 Symptome

Die ersten Symptome traten bei den Patienten zwischen dem 3. und dem 32. Lebensjahr auf, das mittlere Erkrankungsalter lag bei 15 ± 7 Jahren. Die mittlere Krankheitsdauer betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung 19 ± 7 Jahre, das mittlere Alter der Patienten 34 ± 10 Jahre. Bei 15 von 20 Patienten (75%) begann die Krankheit mit Myalgien und Rhabdomyolysen. Viele Patienten klagten über belastungsabhängige Muskelschmerzen und Muskelkrämpfe, hauptsächlich in der Wadenmuskulatur. Bei einem Patienten (Patient 14 in Tabelle 3) trat während einer Adenotomie eine Reaktion auf, die an eine maligne Hyperthermie denken lässt. Unter anderem zeigte sich eine Myoglobinurie mit CK-Werten im Serum nahe 23000 U/l (Normwert <80 U/l). Allerdings wurde dieses Ereignis nicht weiter untersucht, und bei den Verwandten des Patienten wurden derartige Reaktionen bislang nicht beobachtet.



Abbildung 3 Klinischer Phänotyp nicht verwandter Patienten mit LGMD2I (A ist Patientin 5, B ist Patientin 7, C ist Patient 8, D ist Patientin 12, E ist Patientin 17 in Tabelle A). Die Patienten sind homozygot (A, C, D, E) oder compound heterozygot für die Mutation 826C>A im FKRP-Gen. Wadenhypertrophie zeigt sich bei manchen (A, B), aber nicht bei allen Patienten (C, D, E).

4.1.2. Phänotyp

Der klinische Phänotyp variiert deutlich: Manche Patienten (4, 5, 6 und 11 in Tabelle 3) leiden auch Jahrzehnte nach dem erstmaligen Auftreten der Symptome noch nicht unter schweren Paresen, während andere stärker betroffen sind. Alle Patienten können ohne Hilfsmittel gehen, einige (7, 9, 12, 15, 16, 17 und 20 in Tabelle 3) haben wegen Paresen der proximalen Beinmuskulatur jedoch Schwierigkeiten beim Laufen und beim Treppensteigen.

Die Schwäche betrifft hauptsächlich proximale Muskelgruppen, wobei der Beckengürtel stärker betroffen ist als der Schultergürtel. Die meisten Patienten entwickelten im Krankheitsverlauf Fußheberschwächen. 8 von 20 Patienten weisen eine Wadenhypertrophie auf (Abbildung 3).

Lumbale Lordose, Skoliose und eine Scapula alata zählen zu den selteneren Befunden. Paresen der Gesichtsmuskulatur, eine Zungenhypertrophie oder Kontrakturen fanden sich bei keinem Patienten.

Tabelle 3 Klinische und genetische Befunde von 20 Patienten mit LGMD2I (aus 19 verschiedenen Familien)

Nr.	m / w	Alter bei Krankheitsbeginn	Krankheitsdauer (Jahre)	Alter bei Untersuchung	Initialsymptome	Verteilungsmuster der Paresen (MRC)	Durchschnittl. CK-Wert (Normalwert <80 U/l)	Biopsiemuskel	Proteinanalyse, IHC		Mutationstyp	FKRP-Analyse
									Mer	αDG		
1*	W	5	35	40	Myalgien, belastungsabhängige Muskelcrampi, Wadenhypertrophie, proximale Beinschwäche	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, 4-5/5 Fußextensoren	350	Biceps brachii	n.d.	n.d.	Homozygot	826C>A
2	M	8	4	12	Muskelkrämpfe, rasche Erschöpfung bei Belastung	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, Skoliose	4800	Rectus femoris	n.d.	n.d.	Homozygot	826C>A
3*	M	10	25	35	Myalgien, belastungsabhängige Muskelkrämpfe, Wadenhypertrophie	3-4/5 proximale Armmuskeln, 3-4/5 proximale Beinmuskeln	750	Biceps brachii	+	--	Homozygot	826C>A
4	M	14	21	35	Belastungsinduzierte Rhabdomyolysen, milde Schwäche der proximalen Beinmuskulatur	4/5 proximale Armmuskeln, 4/5 proximale Beinmuskeln	900	Vastus lateralis	+	n.d.	Homozygot	826C>A
5	W	14	17	31	Wadenhypertrophie, proximale Schwäche	4/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußstrecker	2500	Tibialis anterior	-	-	Homozygot	826C>A
6	W	15	31	46	Myalgien, Muskelkrämpfe, Wadenhypertrophie	4/5 proximale Beinmuskeln (Kniebeuger), Fußextensoren 4-5/5	1000	Biceps brachii	+	--	Homozygot	826C>A
7	W	15	15	30	Proximale Beinschwäche	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußstrecker	1000	Biceps brachii	-	(-)	Homozygot	826C>A
8	M	16	11	27	Belastungsabhängige Myalgien, Wadenhypertrophie	4/5 proximale Armmuskeln, 3-4/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußstrecker	1000	Vastus lateralis	-	-	Homozygot	826C>A
9	M	17	21	38	Belastungsinduzierte Rhabdomyolysen, proximale	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, 3/5	1000	Vastus lateralis	-	--	Homozygot	826C>A

10	M	17	19	36	Beinschwäche Belastungsinduzierte Rhabdomyolysen, proximale Beinschwäche	Fußstrecker 4/5 proximale Armmuskeln, 3- 4/5 proximale Beinmuskeln	2000	Tibialis anterior	-	-	Homozygot	826C>A
11	M	17	11	28	Belastungsabhängige Myalgien und Rhabdomyolysen, keine Paresen.	Keine Paresen	4600	Deltoides	(-)	--	Homozygot	826C>A
12	W	20	26	46	Myalgien, proximale Beinschwäche	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, 1/5 Fußstrecker, 3/5 Fußbeuger	500	Tibialis anterior	-	-	Homozygot	826C>A
13	W	25	23	48	Muskelkrämpfe, proximale Beinschwäche	3-4/5 proximale Beinmuskeln 4-5 Fußstrecker	200	Vastus lateralis	+	n.d.	Homozygot	826C>A
14	M	3	10	13	Proximale Beinschwäche, Reaktion ähnlich der malignen Hyperthermie	4/5 proximale Beinmuskeln	5600	Tibialis anterior	--	-	Compound heterozygot	826C>A 362T>A
15	W	9	20	29	Myalgie, Wadenhypertrophie, proximale Beinschwäche	4/5 proximale Armmuskeln, 2- 3/5 proximale Beinmuskeln, 1/5 Fußstrecker, 3/5 Fußbeuger	760	Tibialis anterior	(-)	-	Compound heterozygot	826C>A 1054C>G
16	W	12	20	32	Myalgie, proximale Beinschwäche	3-4/5 proximale Armmuskeln, 2-3/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußheber	1000	Biceps brachii	+	-	Compound heterozygot	826C>A 919T>A
17	W	12	19	31	Belastungsabhängige Myalgien und Rhabdomyolysen, geht auf Zehenspitzen, proximale Beinschwäche	4/5 proximale Armmuskeln, 3/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußheber	2000	Biceps brachii	+	-	Compound heterozygot	826C>A 1486T>A (341C/G)
18	M	15	25	40	Proximale Beinschwäche, Wadenhypertrophie	3-4/5 proximale Beinmuskeln, 4/5 Fußheber	1200	Vastus lateralis	+	-	Compound heterozygot	826C>A 1486T>A (341C/G)
19	W	20	22	42	Wadenhypertrophie, konnte nie schnell laufen	4-5/5 proximale Armmuskeln, 3- 4/5 proximale Beinmuskeln	4000	n.d.	n.d.	n.d.	Compound heterozygot	826C>A 1475delC
20	W	32	13	45	Proximale Beinschwäche	3/5 proximale Armmuskeln, 2- 3/5 proximale Beinmuskeln, 1/5 Fußheber, 3/5 Fußbeuger	1300	Tibialis anterior	+	n.d.	Compound heterozygot	826C>A 899T>C

* = Patient 1 and Patient 3 sind Geschwister

MRC = Medical Research Council / **CK** = Kreatinkinase / **IHC** = Immunohistochemie / **Mer** = Merosin / **αDG** = α-Dystroglykan / + = normal / (-) leicht reduziert / - = reduziert / -- = stark reduziert oder fehlend / **n.d.** = nicht durchgeführt.

4.2 Laborbefunde

Die Kreatinkinase-Spiegel (Creatin Kinase = CK) im Blut der Patienten waren um das 4- bis 60fache erhöht (Mittel 1800 ± 1600 U/l). Die höchsten CK-Spiegel waren während myoglobinurischer Episoden nachgewiesen worden. Allerdings blieben die Spiegel auch zwischen den Episoden erhöht.

Die meisten Patienten mit längerer Krankheitsdauer (mehr als 20 Jahre) hatten, verglichen mit Patienten, die erst seit wenigen Jahren erkrankt waren, niedrigere CK-Spiegel.

4.3 Befunde apparativer Untersuchungen

Bei 12 der 20 Patienten waren magnetresonanztomographische Untersuchungen des Gehirns durchgeführt worden. Es fanden sich keine Auffälligkeiten.

Bei allen Patienten waren Lungenfunktionstests und eine Echokardiographie durchgeführt worden. Zwei Patienten (3 und 9 in Tabelle 3) wiesen eine leicht bis mittelgradige Einschränkung der Herzfunktion auf (Ejektionsfraktion bei Patient 3: 55%, bei Patient 9: 38%). Bei einem Patienten (1 in Tabelle 3) war die Vitalkapazität auf 80% reduziert.

4.4 Immunhistochemie

Histologisch zeigten sich bei allen Patienten die Charakteristika einer Muskeldystrophie, zu denen Kalibervariationen der einzelnen Muskelfasern, ein Nebeneinander de- und regenerierender Fasern sowie signifikante endo- und perimysiale Fibrosen schon in frühen Stadien der Erkrankung zählen. Immunhistochemisch fand sich bei den meisten Patienten eine variable Abschwächung von α -Dystroglykan (Tabelle 3). Das Ausmaß dieser Abschwächung

korrelierte jedoch weder mit dem Erkrankungsalter noch mit dem Schweregrad der Erkrankung. Bei 7 von 15 untersuchten Patienten zeigte sich immunhistochemisch zudem eine Abschwächung des Merosins.

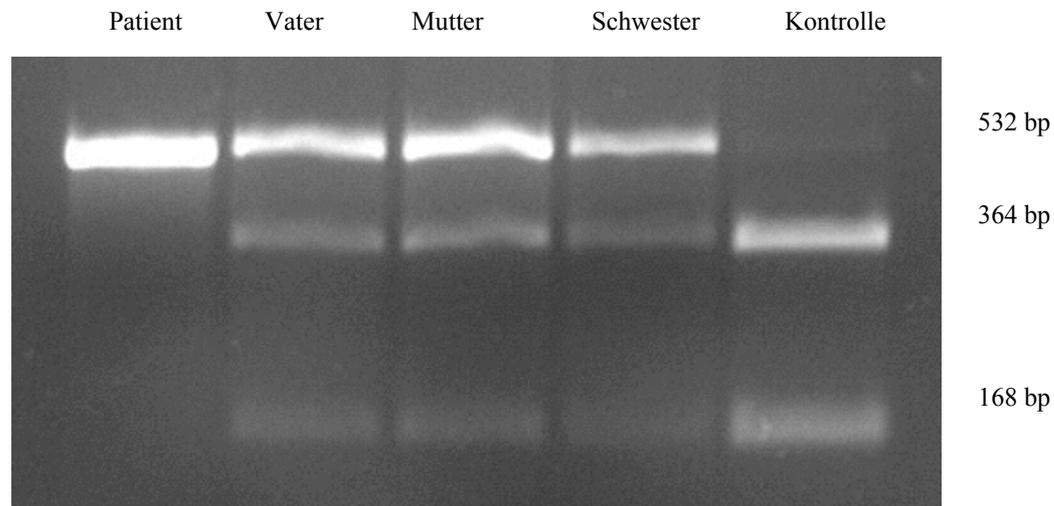


Abbildung 4 Gelbild des Restriktionsverdaus zum Screening auf die FKRP-Mutation 826C>A (Leu276Ile). Das mutierte Fragment bleibt ungeschnitten (532 bp), während das Wildtyp-Fragment geschnitten wird (364 bp, 168 bp). Der Patient ist homozygot für die Mutation 826C>A, während die Eltern und seine Schwester die Mutation heterozygot tragen.

4.5 Genetische Analyse

4.5.1 Mutationen

In einer Kohorte von 124 LGMD-Patienten (81 Patienten aus einer neurologischen Abteilung in München, 33 Patienten aus einer neurologischen Abteilung in Bonn, 10 Patienten aus anderen Abteilungen) konnte die FKRP-Mutation 826C>A bei 20 Patienten aus 19 verschiedenen Familien nachgewiesen werden (Abbildung 4). 13 Patienten waren homo-, 7 Patienten waren zusammengesetzt heterozygot für die

Mutation (Tabelle 3). Keiner der homozygoten Patienten ist Nachkomme blutsverwandter Eltern.

Bei allen Patienten mit heterozygoter Mutation 826C>A konnte mittels Sequenzanalyse eine zweite heteroallelische Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 3). Zwei dieser Mutationen waren zuvor schon beschrieben worden: 919T>A (Tyr307Asn) [Mercuri et al. 2003] und 1486T>A (Stop496Arg) [Driss et al. 2003]. Letztere Mutation ist mit dem Polymorphismus Ala114Gly (341C/G) assoziiert, der zuvor schon bei einer Familie aus Tunesien beschrieben wurde [Driss et al. 2003].

Vier Mutationen sind neu: 1475delC bedingt einen Frameshift in der Nähe des Stop-Codons. Dies wiederum führt zu einer Verlängerung der Aminosäurekette.

Zu allen drei neuen Missense-Mutationen Val121Glu (362T>A), Val300Ala (899T>C) und Arg352Gly (1054C>G) sowie zum Polymorphismus Ala114Gly (341C/G) wurden Normalkontrollen untersucht. Keine der Mutationen konnte in jeweils 100 Allelen gesunder Patienten nachgewiesen werden. Der Polymorphismus Ala114Gly (341C/G) konnte in einer gesunden Normalkontrolle homozygot nachgewiesen werden.

4.5.2 Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher Spezies

Der Vergleich verschiedener Spezies zeigt, dass Val300 und Tyr307 in hohem Maße konserviert sind. Val121 und Arg352 hingegen sind nur bei Säugetieren, nicht aber bei Insekten konserviert (Abbildung 5).

4.5.3 Polymorphismen, Founder-Effekt

Hinsichtlich eines eventuellen Founder-Effektes wurden ein bekannter Polymorphismus im vierten Exon (135C/T) [Brockington et al. 2001a] und ein neuer Polymorphismus in der Promotorregion (-621C/G) untersucht. Beide

Polymorphismen konnten in homozygoter Form bei allen homozygoten Trägern der FKRP-Mutation 826C>A nachgewiesen werden. Im Fisher's exact Test zeigte sich beim Vergleich zwischen normalen Allelen und solchen mit der FKRP-Mutation 826C>A ein deutliches Kopplungsungleichgewicht für diese Polymorphismen (Abbildung 6).

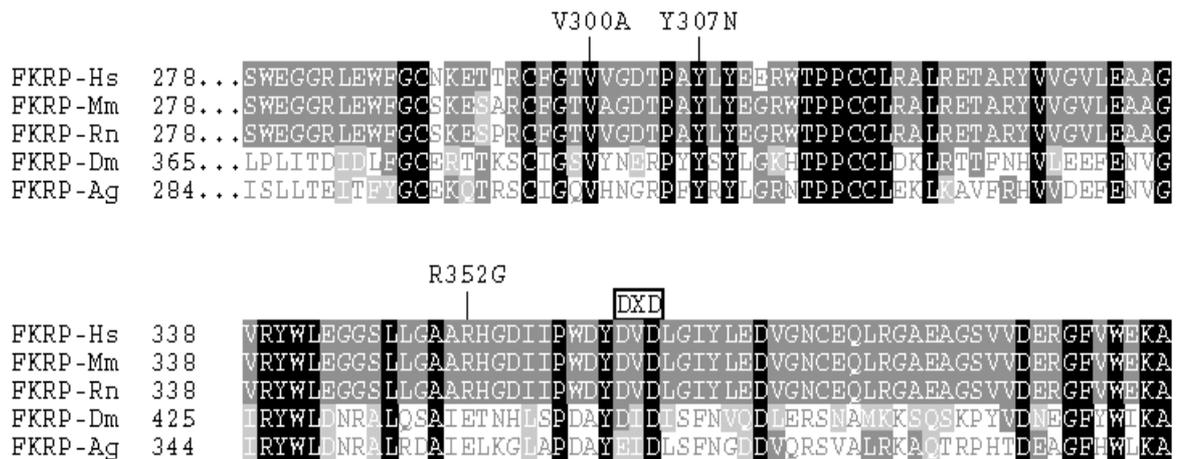
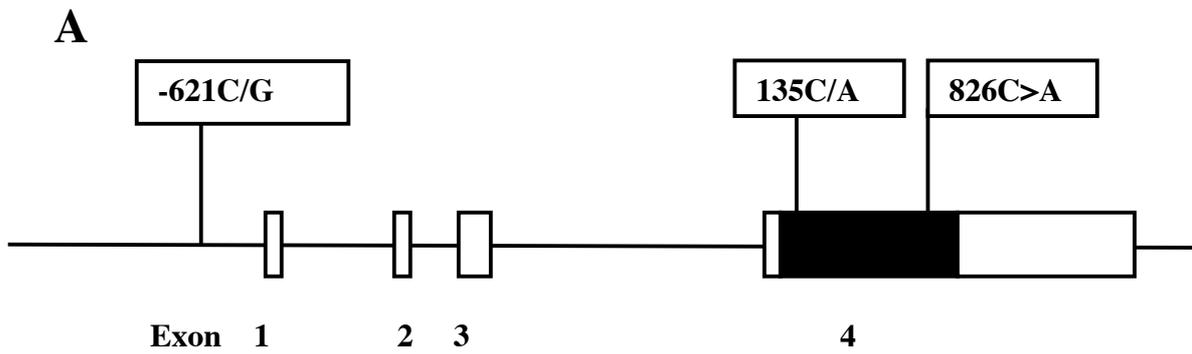


Abbildung 5 Vergleich homologer FKRP-Sequenzen verschiedener Spezies. Diese Ausschnitte aus Aminosäuresequenzen des FKRP-Gens stammen von Homo sapiens (FKRP_Hs: NP_077277), Mus musculus (FKRP_Mm: NP_775606), Rattus norvegicus (FKRP_Rn: XP_218425), Drosophila melanogaster (FKRP_Dm: NP_611531) und Anopheles gambiae (FKRP_Ag: XP_314789). Im Kasten das konservierte DxD-Motiv, ein Merkmal von Glykosyltransferasen. Die Kürzel vollständig konservierter Aminosäuren sind weiß auf schwarz geschrieben. Weiß auf Dunkelgrau: Konservierung > 60%. Weiß auf Hellgrau: Konservierung < 40%. Die Kürzel nicht konservierter Aminosäuren sind dunkelgrau auf weiß geschrieben. Oberhalb der Sequenzen sind die Positionen der FKRP-Mutationen V300A, Y307N und R352G angezeigt.

4.5.4 FKRP 826C>A in Normalkontrollen

Insgesamt wurden 300 Normalkontrollen (600 Kontrollchromosomen) mittels Restriktionsenzymanalyse auf die FKRP-Mutation 826C>A getestet. In einem einzigen Fall konnte die Mutation in heterozygoter Form nachgewiesen werden.



B

Polymorphismus -621C/G	-621G	-621C	Total
Anzahl der Allele (826C>A homozygot)	24	0	24
Anzahl der Allele (Normalkontrollen)	41	43	84

⇒ **p = 0.036**

Polymorphismus 135C/T	135T	135C	Total
Anzahl der Allele (826C>A homozygot)	24	0	24
Anzahl der Allele (Normalkontrollen)	7	27	34

⇒ **p = 0.0016**

Abbildung 6 Die Analyse zweier Polymorphismen im FKRP-Gen gibt Hinweise auf einen „Founder“-Haplotyp des Allels 826C>A.

(A) Exon 1-4 sind in Kastenform dargestellt, der schwarze Bereich repräsentiert die kodierende Region. Der neu identifizierte Polymorphismus -621C/G liegt stromaufwärts in der Promotorregion, der intragenische Polymorphismus 135C/T wurde schon beschrieben [Brockington et al. 2001b].

(B) Im Fisher's exact test zeigt sich ein Kopplungsungleichgewicht der Mutation 826C>A mit den Polymorphismen -621G und 135T.

5 Diskussion

5.1 Phänotyp

Für die vorliegende Arbeit wurden klinische und genetische Daten von 20 Patienten mit Gliedergürteldystrophie 2I aus 19 verschiedenen Familien zusammengestellt. Bisherige Studien zeigten, dass Muskeldystrophien, denen Mutationen im FKRP-Gen zugrunde liegen, variable Schweregrade aufweisen, wobei das Spektrum von der milden Gliedergürteldystrophie (LGMD) Erwachsener bis zur schweren Kongenitalen Muskeldystrophie (CMD) reicht.

Im Durchschnitt zeigten die Patienten dieser Arbeit einen relativ milden klinischen Phänotyp. Bei manchen traten lediglich erhöhte CK-Spiegel im Serum, Muskelschmerzen und Myoglobinurie auf. Dies ist unter anderem einem Stichproben-Bias geschuldet: Stärker betroffene Patienten (Nr. 2 in Tabelle 3) wurden zu Beginn der Erkrankung hauptsächlich in pädiatrischen, seltener in neurologischen Kliniken vorstellig. Zum anderen wurden in der vorliegenden Arbeit nur Träger der häufigen FKRP-Mutation 826C>A berücksichtigt. Schon in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die FKRP-Mutation 826C>A mit einem eher milden Phänotyp einhergeht [Brockington et al. 2001b, Poppe et al. 2003].

Bemerkenswert ist, dass ein früher Krankheitsbeginn nicht unbedingt zu einem schweren Phänotyp führt. Im Gegensatz zu einer englischen Studie [Poppe et al. 2003], die bei einem Drittel der Patienten kardiomyopathische Veränderungen und in vielen Fällen Einschränkungen der forcierten Vitalkapazität, begleitet von Zeichen der Zwerchfellschwäche, nächtlicher Hypoventilation und der Notwendigkeit nächtlicher Heimbeatmung beschreibt, weisen die LGMD 2I-Patienten der vorliegenden Arbeit selbst nach jahre- bis jahrzehntelangem Krankheitsverlauf nur selten pulmonale (ein Patient) oder kardiale (zwei Patienten) Funktionseinschränkungen auf.

5.2 Symptomatik

In der Mehrzahl der hier beschriebenen LGMD 2I-Fälle traten als Erstsymptome Muskelschmerzen und Myoglobinurie auf. Bei Patienten mit Myoglobinurie sollte die Diagnostik daher um die Suche nach FKRP 826C>A ergänzt werden, wenn die CK-Spiegel im Serum auch zwischen den myoglobinurischen Episoden erhöht bleiben.

5.3 Narkosezwischenfall

Bei einem Patienten trat unter Narkose eine der malignen Hyperthermie ähnliche Reaktion auf. Obwohl nicht auszuschliessen ist, dass es sich um ein zufälliges Zusammentreffen handelt, sollten Operationen bei LGMD2I-Patienten mit besonderer Vorsicht geplant und durchgeführt werden.

5.4 Mutationen

Neben der häufigen Mutation 826C>A wurden bei den hier beschriebenen Patienten sechs weitere Mutationen im vierten Exon des FKRP-Gens gefunden. Zwei davon waren zuvor schon beschrieben worden, weitere vier sind neu.

Die Mutation Stop496Arg (1486T>A) ist aus einem tunesischen LGMD2I-Stammbaum bekannt [Driss et al. 2003]. Sie führt sie zu einer Verlängerung der Aminosäurekette um mehrere Missense-Codons. Bei den tunesischen Patienten liegt Stop496Arg auf demselben Allel wie Ala114Gly (341C/G). Die beiden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten mit Stop496Arg tragen Ala114Gly ebenfalls auf demselben Allel. In einer früheren Studie wurde die Hypothese vertreten, Ala114Gly sei pathogen [Brockington et al. 2001b]. Allerdings wurde Ala114Gly homozygot in tunesischen Normalkontrollen [Driss et al. 2003] sowie in einer der Normalkontrollen gefunden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit

durchgeführt wurden. Daher sollte Ala114Gly eher als seltener Polymorphismus betrachtet werden, während Stop496Arg wohl die pathogene Mutation bei den Patienten der vorliegenden Arbeit wie auch bei den tunesischen Patienten darstellt.

Zu den im Rahmen dieser Arbeit erstmals gefundenen Mutationen zählt auch die Deletion der Base Cytosin an Position 1475 des vierten Exons des FKRP-Gens (1475delC). Infolge dieses nahe dem Stop-Codon gelegenen Defekts wird Tyrosin an Position 492 der Aminosäure-Kette durch Arginin ersetzt, und die Aminosäurekette wird um 28 Missense-Codons verlängert.

Es ist anzunehmen, dass die drei neuen Missense-Mutationen Val121Glu, Val300Ala und Arg352Gly pathogen sind, da

- 1.) keine von ihnen in jeweils 50 Normalkontrollen gefunden wurde (entsprechend jeweils 100 Allelen),
- 2.) sie in hoch konservierten Bereichen der Aminosäuresequenz liegen (Val300Ala) oder zu Ladungsänderungen führen (Val121Glu, Arg352Gly),
- 3.) sie heteroallelisch mit Leu276Ile sind,
- 4.) mit ihnen die typischen klinischen und biochemischen Veränderungen einhergehen.

Zum endgültigen Beweis der pathogenetischen Natur dieser Mutationen müssten allerdings weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden [Esapa et al. 2002].

5.5 Founder-Allel

Die häufige Mutation 826C>A war in allen Fällen mit zwei intragenischen Polymorphismen assoziiert. Demzufolge könnte ein altes Founder-Allel zugrunde liegen, wenngleich die Autoren einer früheren Studie von mehreren Foundern ausgehen. Diese Autoren stützten ihre These auf die Haplotypisierung zweier

extragenischer, polymorpher Repeats, die 3 Centi-Morgan der FKRP-Region umfassen (Brockington et al. 2001b). Allerdings wiesen sie mit Hilfe des Markers D19S606 zwei seltene Allele nach, die sich mit der Mutation im Kopplungsungleichgewicht befinden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Mutation aus einer begrenzten Zahl von Anlässen hervorgegangen ist.

Weiterführende Untersuchungen sollten eine große Zahl mutierter Allele einschließen und mit extra- und intragenischen, polymorphen Markern durchgeführt werden. Nur so kann man spezifizieren, ob Leu276Ile (826C>A) mehrmals entstanden oder nur ein einziges Mal aufgetreten ist. Im letzteren Fall könnte das Ereignis lange Zeit zurückliegen. Die Heterogenität naher, extragenischer Marker ließe sich dann durch Rekombinationsereignisse erklären und ginge in dem Konzept ebenso auf wie die europaweite Verteilung der Mutation Leu276Ile.

Interessanterweise wurde Leu276Ile auch bei den Hutterern gefunden, einer endogamen nordamerikanischen Population, die vor über hundert Jahren aus Europa emigrierte [Frosk et al. 2002]. In einer neueren Publikation konnte die Gruppe um Frosk ein deutliches Kopplungsungleichgewicht für bis zu 0,25 Mb vom FKRP-Gen entfernte Regionen nachweisen [Frosk et al. 2004]. Bezüglich des intragenischen Polymorphismus 135C>T weisen alle Chromosomen betroffener Hutterer das insgesamt seltene T-Allel auf [Frosk et al. 2004]. Zudem findet sich im putativen Promotor des FKRP-Gens bei rs3810288 das G-Allel (mit einer Ausnahme, die im Rahmen von Rekombinationsereignissen gedeutet wird). Somit wurden bei erkrankten Hutterern die gleichen Allelfrequenzen gefunden wie bei den europäischen Patienten der vorliegenden Arbeit [Frosk et al. 2004], ein weiteres starkes Indiz für das postulierte Founder-Allel.

5.6 Epidemiologie

Insgesamt scheint LGMD 2I eine der häufigsten rezessiven Muskeldystrophien erwachsener Patienten zu sein. Die Häufigkeit liegt im Bereich von LGMD 2A (Calpainopathien), LGMD 2B (Dysferlinopathien) und LGMD 2C-F (Sarkoglykanopathien). Wenngleich im Rahmen dieser Arbeit keine epidemiologischen Studien durchgeführt wurden und ein Stichproben-Bias bedacht werden muss, ist allein die LGMD 2I aufgrund der Mutation Leu276Ile (C826A) für 19% (15 von 81) bzw. 18% (6 von 33) bis dahin nicht klassifizierter Gliedergürteldystrophien in zwei deutschen Kohorten verantwortlich (neurologische Abteilungen der Ludwig-Maximilians-Universität München bzw. der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem einer anderen Studie, in der LGMD 2I bei 11% aller Patienten mit LGMD 2 identifiziert werden konnte [Zatz et al. 2003].

Der Gruppe um Brockington gelang es in Großbritannien, ein Allel mit der Mutation Leu276Ile (826C>A) in 200 Kontrollchromosomen nachzuweisen [Brockington et al. 2001b]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand sich ein mutiertes Allel in 600 deutschen Kontrollchromosomen. Leu276Ile (826C>A) weist somit in der deutschen und in der englischen Population eine ähnliche Frequenz auf. Entsprechend liegt die geschätzte Prävalenz der LGMD 2I im Bereich der Prävalenz anderer häufiger Muskeldystrophien [Emery 1991], wenngleich zum Beweis dieser Hypothese weitere epidemiologische Studien nötig sind.

5.7 Diagnostik

Bislang beruhte die Diagnostik der Gliedergürteldystrophien in den meisten Fällen auf einer Muskelbiopsie mit nachfolgendem Immunoblot sowie immunohistochemischer Untersuchung des Gewebes. Zum Teil war dies der großen Variabilität des Phänotyps sowie den klinischen Gemeinsamkeiten der verschiedenen Gliedergürteldystrophien

geschuldet. Zudem tragen nur wenige Patienten häufige Mutationen in LGMD-Genen; meist handelt es sich um seltene oder um private Mutationen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse anderer Studien legen nahe, dass LGMD 2I eine häufige Muskeldystrophie erwachsener Patienten ist und gewöhnlich - zumindest in Europa - durch eine einzige Missense-Mutation im FKRP-Gen verursacht wird, nämlich Leu276Ile (826C>A). Dadurch kann der diagnostische Prozess in vielen Fällen erleichtert werden.

Bei männlichen Patienten weisen die Dystrophinopathien (Muskeldystrophie Becker) eine recht hohe Prävalenz auf. Teils gehen sie mit ähnlichen klinischen Befunden einher wie die LGMD 2I, so dass zu einem frühen Zeitpunkt im diagnostischen Prozess weiterhin eine Muskelbiopsie nötig sein wird. Im Gegensatz dazu könnte bei weiblichen LGMD-Patienten die direkte Testung auf FKRP Leu276Ile (826C>A) mittels einer Blutprobe erfolgen, und zwar noch vor Entnahme der diagnostischen Muskelbiopsie.

Zahlreiche sarkolemmale Strukturproteine, deren Defekte verschiedene Formen der Muskeldystrophie bedingen, konnten in der Vergangenheit identifiziert werden. Obwohl der posttranslationalen Prozessierung ein entscheidender Anteil an korrekter Funktion und Zusammensetzung muskulärer Proteine zukommt, wurde ihre Rolle in der Pathogenese der Muskeldystrophien erst während der letzten Jahre aufgezeigt. Insbesondere die mangelhafte Glykosylierung von α -Dystroglykan führt zu progressiver Muskeldegeneration und abnormer Migration von Neuronen im Gehirn [Muntoni et al. 2002] und könnte noch anderen bislang nicht molekular charakterisierten Muskeldystrophien und neuronalen Migrationsstörungen zugrunde liegen [Muntoni et al. 2002]. Ein besseres Verständnis der posttranslationalen Prozessierung muskulärer Proteine sowie der Enzyme, die daran beteiligt sind, zählt zu den wichtigen Zielen künftiger Forschung.

Fraglich bleibt, ob die Funktion des Fukutin related Protein auf die Glykosylierung von α -Dystroglykan beschränkt ist [Grewal et al. 2003]. Die biochemische Aktivität dieser und anderer Glykosyltransferasen, die an der Pathogenese von Muskeldystrophien beteiligt sind, wird zu klären sein. Hierdurch könnte man das Spektrum der Glykane identifizieren, die für die α -Dystroglykan-Liganden-Interaktion nötig sind, und im nächsten Schritt Therapiemodelle etablieren: Für die LGMD 2I wären dann ein Enzymersatz durch Gentherapie, das Hochregulieren kompensierender Glykosyltransferasen oder den Gebrauch von Glykan-Analogen zur Wiederherstellung der Lamininbindung denkbar [Grewal et al. 2003].

Dystroglykane spielen zudem eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion. Alpha-Dystroglykan bindet Beta-Dystroglykan, welches wiederum mit Grb2 (Growth factor receptor bound 2) assoziiert ist, einem Protein, das in Signaltransduktionskaskaden eingebunden ist [Chiba et al. 1997]. Es bleibt zu klären,

inwieweit eine gestörte Signaltransduktion bei Pathogenese bei Patienten mit Glykosylierungsdefekten beeinflusst [Muntoni et al. 2002].

Eine gegenwärtig umfangreiche, stetig wachsende Sammlung genetischer und klinischer Daten zum FKRP-Gen wird helfen, funktionell wichtige Bereiche des Proteins zu identifizieren. Vereinfacht wird die Mutationssuche dadurch, dass die codierende Region des FKRP-Gens in einem einzigen Exon liegt. Die Vielzahl verschiedener Phänotypen bei Defekten im FKRP-Gen legt den Schluss nahe, dass das Ausmaß der Funktionseinschränkung des Fukutin Related Proteins von der jeweils zugrunde liegenden Mutation abhängt. Zur genaueren Einschätzung der pathogenetischen Rolle jeder einzelnen Mutation sind weiterführende funktionelle Studien nötig [Petersen et al. 2004]. Gleichzeitig wird zu klären sein, welche Faktoren jenseits der bekannten Gendefekte dazu führen, dass auch bei identischen Genotypen innerhalb derselben Familien große phänotypische Variabilitäten beobachtet werden [Mercuri et al. 2003].

Muskeldystrophien sind erbliche Erkrankungen mit progressiven De- und Regenerationsvorgängen der Muskelfasern. Zuordnungen zu den einzelnen Formen, für die inzwischen mehr als 30 Genloki gefunden wurden, sind aufgrund phänotypischer Überschneidungen nicht ohne weiteres möglich, so dass genetische Klassifikationen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Gemeinsames Merkmal der zu den Muskeldystrophien zählenden Gliedergürteldystrophien (LGMD) ist eine progrediente Schwäche der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur. Im Jahr 2000 wurde erstmals Chromosom 19q13.3 als Locus der autosomal-rezessiven LGMD 2I beschrieben. 2001 wurde gezeigt, dass der LGMD 2I Mutationen im Fukutin-related Protein (FKRP)-Gen zugrunde liegen. FKRP gilt als Glykosyltransferase, deren Defekt eine fehlerhafte Glykosylierung von α -Dystroglykan zur Folge hat. Dadurch wird unter anderem in Skelett- und Herzmuskelzellen die Verknüpfung der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett unterbrochen.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass 826C>A zu den häufigen Mutationen des FKRP-Gens zählt. In der Aminosäuresequenz führt diese Mutation zum Austausch von Leucin durch Isoleucin an Position 276.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Kohorte von 124 Patienten mit bis dahin nicht klassifizierter LGMD auf FKRP 826C>A getestet. Sofern die Mutation identifiziert und damit die Diagnose einer LGMD 2I gesichert werden konnte, erfolgte die Korrelation des Genotyps mit dem klinischen Phänotyp.

Insgesamt konnte FKRP 826C>A bei 20 Patienten aus 19 verschiedenen Familien nachgewiesen werden. Dreizehn Patienten waren homozygot für die Mutation, sieben waren zusammengesetzt heterozygot. Bei allen heterozygoten Patienten konnte eine

zweite heteroallelische Mutation nachgewiesen werden. Zwei dieser Mutationen waren aus Publikationen bekannt, vier hingegen sind neu: 1475delC, Val121Glu (362T>A), Val300Ala (899T>C) und Arg352Gly (1054C>G). In allen Fällen war 826C>A mit zwei intragenischen Polymorphismen assoziiert. Daher ist anzunehmen, dass der Mutation ein einziges Founder-Allel zugrunde liegt.

Es zeigte sich, dass 826C>A in homo- wie heterozygoter Form mit einem relativ milden klinischen Phänotyp assoziiert ist. Selbst nach jahre- bis jahrzehntelangem Krankheitsverlauf traten nur selten pulmonale oder kardiale Funktionseinschränkungen auf. Teils fanden sich lediglich erhöhte CK-Spiegel im Serum, Muskelschmerzen und Myoglobinurie. Bei Patienten mit einer Myoglobinurie sollte die Diagnostik daher um die Suche nach FKRP 826C>A ergänzt werden, falls die CK-Spiegel im Serum auch zwischen den myoglobinurischen Episoden erhöht bleiben.

Insgesamt scheint die LGMD 2I eine der häufigsten Gliedergürteldystrophien erwachsener Patienten zu sein. In den meisten Fällen wird die Erkrankung durch die Mutation 826C>A (Leu276Ile) im FKRP-Gen verursacht. Diese Mutation fand sich bei ungefähr 20% der hier untersuchten Patienten mit bis dahin genetisch nicht klassifizierter LGMD.

Man kann daher bei entsprechenden klinischen und apparativen Befunden direkt auf FKRP 826C>A testen, und zwar noch vor Entnahme der diagnostischen Muskelbiopsie. Neben den Erkenntnissen zu Mutationen im FKRP-Gen bildet die vorliegende Arbeit somit die Grundlage für eine Vereinfachung des diagnostischen Prozesses für Arzt und Patient.

Allamand V, Donahue KM, Straub V, Davisson RL, Davidson BL, Campbell KP (2000). Early adenovirus-mediated gene transfer effectively prevents muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Gene Ther*; 7:1385-91.

Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda MP, Duggan DJ, Hoffman EP (1998). Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve*; 21:769-75.

Aravind L, Koonin EV (1999). The fukutin protein family--predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol*; 9:R836-7.

Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*; 104:375-81.

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira Ede S, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*; 20:37-42.

Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F (2004). Mutations in the *FKRP* gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*; 41:61.

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*; 21:285-8.

Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP (1995). Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*; 11:266-73.

Breton C, Imberty A (1999). Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*; 9:563-71.

Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F (2001a). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*; 69:1198-1209

Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F (2001b). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*; 10:2851-2859

Brockington M, Blake DJ, Brown SC, Muntoni F (2002). The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord*; 12:233-234

Brown SC, Fassati A, Popplewell L, Page AM, Henry MD, Campbell KP, Dickson G (1999). Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. *J Cell Sci*; 112:209-16.

Bushby KM, Beckmann JS (2002). The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies, Naarden, April 12-14, 2002. *Neuromuscul Disord*; 13:80-90.

Campbell KP (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*; 80:675-9.

Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*; 282:2079-81.

Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T (1997). Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem*; 272:2156-62.

Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, Hentati F (2000). A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul Disord*; 10:240-6.

Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, Souilem S, Hayashi YK, Shimizu N, Minoshima S, Kudoh J, Hentati F, Nishino I (2003). Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I. *Neurology*; 60:1341-1344

Dubowitz V: *Muscle Disorders in Childhood*. 2. Aufl. WB Saunders; London; (1995)

Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmüller H (2003). Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve*; 27:624-7.

Emery AE (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases - a world survey. *Neuromuscul Disord*; 1:19-29

Ervasti JM, Campbell KP (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*; 66:1121-31.

Esapa CT, Benson MA, Schroder JE, Martin-Rendon E, Brockington M, Brown SC, Muntoni F, Kroger S, Blake DJ (2002). Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet*; 11:3319-3331

Fischer D, Walter MC, Kesper K, Petersen JA, Aurino S, Nigro V, Kubisch C, Meindl T, Lochmüller H, Wilhelm K, Urbach H, Schröder R (2004). Diagnostiv value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* (2004 zur Publikation angenommen)

Frosk P, Greenberg CR, Poulin A, Lamont R, Nylén E, Hirst C, Frappier D, Roslin N, Zaik M, Bushby K, Straub V, Zatz M, de Paula F, Morgan K, Fujiwara TM, Wrogemann K (2004). The most common mutation in FKRP causing limb girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD 2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat* (2004 zur Publikation angenommen)

Frosk P, Lamont R, Brunham L, Weiler T, Nylén E, Hoke A, Frappier D, Roslin N, Hudson T, Morgan K, Fujiwara TM, Greenberg CR, Wrogemann K (2002). Genetic heterogeneity of limb girdle muscular dystrophy in Hutterites. *J Neurol Sci*; 199 (Suppl. 1):58

Frosk P, Weiler T, Nylén E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, Fujiwara TM, Wrogemann K (2002). Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet*; 70:663-72.

Grewal PK, Hewitt JE (2003). Glycosylation defects: a new mechanism for muscular dystrophy? *Hum Mol Genet*; 12:R259-64.

Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B (2002). Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet*; 71:492-500.

Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC (2000). Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet*; 9:2141-7.

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K (1995). Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet*; 11:216-8.

Henry MD, Campbell KP (1999). Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol*; 11:602-7.

Holt KH, Crosbie RH, Venzke DP, Campbell KP (2000). Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett*; 468:79-83.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*; 355:696-702.

Karpati G, Holland P (2002). Sweetening the pot in muscle: genetic defects of protein glycosylation causing muscle disease; 59:1674-1676

Leschziner A, Moukhles H, Lindenbaum M, Gee SH, Butterworth J, Campbell KP, Carbonetto S (2000). Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J Neurochem*; 74:70-80.

Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*; 20:31-6.

Mahjneh I, Bushby K, Pizzi A, Bashir R, Marconi G (1996). Limb-girdle muscular dystrophy: a follow-up study of 79 patients. *Acta Neurol Scand*; 94:177-89.

Mathews KD, Moore SA (2003). Limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep*; 3:78-85.

Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown S, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F (2003). Phenotypic spectrum associated with mutations in the Fukutin-Related Protein Gene. *Ann Neurol*; 53:537-542

Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM (1997). Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet*; 61:909-17.

Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP (2002). Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*; 418:417-422.

Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*; 18:365-8.

Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet*; 24:163-6.

Mostacciuolo ML, Miorin M, Martinello F, Angelini C, Perini P, Trevisan CP (1996). Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. *Hum Genet*; 97:277-9.

Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC (2002). Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet*; 360:1419-1421

Naom I, D'Alessandro M, Sewry CA, Philpot J, Manzur AY, Dubowitz V, Muntoni F (1998). Laminin alpha 2-chain gene mutations in two siblings presenting with limb girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*; 8:495-501.

Nigro V (2003). Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myol*; 22:35-42.

Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M (1996). Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet*; 14:195-8.

Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*; 270:819-22.

Palenzuela L, Andreu AL, Gamez J, Vila MR, Kunimatsu T, Meseguer A, Cervera C, Fernandez Cadenas I, van der Ven PF, Nygaard TG, Bonilla E, Hirano M (2003). A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology*; 61:404-6.

Pegoraro E, Marks H, Garcia CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM, Fanin M, Martinello F, Trevisan CP, Angelini C, Stella A, Scavina M, Munk RL, Servidei S, Bonnemann CC, Bertorini T, Acsadi G, Thompson CE, Gagnon D, Hoganson G, Carver V, Zimmerman RA, Hoffman EP (1998). Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology*; 51:101-10.

Petersen JA, Walter MC, Stucka R, Fischer D, Schroder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Muller-Felber W, Pongratz D, Muller JS, Auerswald EA, Lochmuller H (2004). FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet*; 41:50

Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LVB, Birchall D, Brockington M, Buddles M, Bushby M, Muntoni F, Wills A, Bushby K (2003). The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I; 60:1246-1251

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*; 81:27-40.

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*; 78:625-33.

Spear PG (1998). A welcome mat for leprosy and Lassa fever. *Science*; 282:1999-2000.

Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, Rogala A, McMichael R, Chutkow J, Goldsmith C, Tim RW, Pericak-Vance MA (1999). Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am J Hum Genet*; 64:556-62.

Stedman H, Wilson JM, Finke R, Kleckner AL, Mendell J (2000). Phase 1 clinical trial utilizing gene therapy for limb girdle muscular dystrophy: alpha-, beta-, gamma-, or delta-sarcoglycan gene delivered with intramuscular instillations of adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther*; 11:777-90.

Straub V: Gliedergürteldystrophien. In: Spuler S, v. Moers A (Hrsg): *Muskelkrankheiten*. Schattauer; Stuttgart; (2004)

Straub V, Campbell KP (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*; 10:168-75.

Tome FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M (1994). Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III*; 317:351-7.

Topaloglu H, Brockington M, Yuva Y, Talim B, Haliloglu G, Blake D, Torelli S, Brown SC, Muntoni F (2003). FKR1 gene mutations cause congenital muscular dystrophy, mental retardation, and cerebellar cysts. *Neurology*; 60:988-92.

Wagner KR (2002). Genetic diseases of muscle. *Neurol Clin*; 20:645-78.

Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, Escolar DM, Hoffman EP, Fischbeck KH (2001). Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol*; 49:706-11.

Walter MC, Lochmüller H (2001). Novel approaches to treat muscular dystrophies. *Exp Opin Invest Drugs*; 10:695-707.

Walter MC, Lochmüller H, Reilich P, Klopstock T, Huber R, Hartard M, Hennig M, Pongratz D, Müller-Felber W (2000). Creatine monohydrate in muscular dystrophies: A double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology*; 54:1848-50.

Wicklund MP, Hilton-Jones D (2003). The limb-girdle muscular dystrophies: genetic and phenotypic definition of a disputed entity. *Neurology*; 60:1230-1.

Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M (2003). The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromusc Disord*; 13:532-544

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
α	Alpha
α DG	Alpha-Dystroglykan
Ala	Alanin
Arg	Arginin
as	antisense
Asn	Asparagin
β	Beta
bp	Basenpaare
C	Cytosin
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
CAPN3-Gen	Calpain-3-Gen
CK	Kreatinkinase
Cys	Cystein
CT	Computertomographie
δ	Delta
del	Deletion
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDMD	Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
F	Forward
FKRP	Fukutin-related Protein Gen

FSHD	Fazio-Skapulo-Humerale Muskeldystrophie
G	Guanin
γ	Gamma
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
IHC	Immunhistochemie
Ile	Isoleucin
l	Liter
LAMA2-Gen	Laminin- α 2-Gen
Leu	Leucin
LGMD	Gliedergürteldystrophie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
M	männlich
MDC	Kongenitale Muskeldystrophie
Mer	Merosin
Min.	Minute
MRC	Medical Research Council
MRT	Magnetresonanztomographie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.d.	nicht durchgeführt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

R	Reverse
s	sense
Sek.	Sekunde
T	Thymin
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UTR	untranslationierte Region
UV	ultraviolett
Val	Valin
W	weiblich

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Hanns Lochmüller, der mir die Möglichkeit gab, am Friedrich-Baur-Institut und am Genzentrum München tätig zu sein und mich über zweieinhalb Jahre gleich bleibend exzellent betreut hat.

Frau Dr. Maggie Walter danke ich ebenso herzlich ich für Ihre Unterstützung in fachlichen Fragen und die Zuteilung geeigneter Patienten.

Auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe am Genzentrum München möchte ich für Ihre freundliche und kompetente Hilfe danken, besonders Herrn Dr. Rolf Stucka, Frau Dr. Sabine Krause, Juliane Müller, Ursula Klutzny und Carolin Schmidt.

Ein inniger Dank gilt meinen Eltern Dr. Gerd und Christina Petersen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jens Alexander Petersen
Geburtsdatum: 20. März 1976
Familienstand: ledig
Geburtsort: Pinneberg
Adresse: Ainmillerstrasse 5
80801 München

Ausbildung

1982-1986 Heinrich-Eckmann-Schule, Rellingen
1986-1995 Johannes-Brahms-Gymnasium, Pinneberg
1995 Abitur
1995-1996 Zivildienst
1997-2004 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
1999 Physikum
2000 1. Medizinisches Staatsexamen
2003 2. Medizinisches Staatsexamen
2004 3. Medizinisches Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Friedrich-Baur-Institut,
Neurologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-
Universität München

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Jens Petersen)

Dissertation eingereicht am: