

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

Molekulargenetische Analyse und funktionelle Charakterisierung von Kandidatengenomen bei hereditären Einschlusskörpermyopathien

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Markus Simon Heitzer

aus

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Heinen

Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht

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

Datum der mündlichen Prüfung: 13.06.2013

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kottlors M, Moske-Eick O, Huebner A, Krause S, Mueller K, Kress W, Schwarzwald R, Bornemann A, Haug V, **Heitzer M**, Kirschner J. (2010).

Late-onset autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy and Paget's disease of bone unlinked to the VCP gene locus.

J Neurol Sci. 2010 Apr 15;291(1-2):79-85.

Meinen Eltern Ursula und Andreas Heitzer
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	IV
I) Einleitung.....	1
1. Molekulargenetische Klassifikation	1
2. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 1	2
3. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 2	2
3.1. Pathologie.....	2
3.2. Klinik.....	4
3.3. Genetik.....	6
4. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 3	9
5. IBMPFD.....	10
5.1. Pathologie.....	10
5.2. Klinik.....	13
5.3. Genetik.....	16
II) Problemstellung / Zielsetzung.....	18
III) Material und Methoden	20
1. Patienten und Untersuchungsmaterial	20
2. Chemikalien	20
3. Molekulargenetische Methoden.....	20
3.1. DNA-Extraktion.....	20
3.2. RNA-Extraktion aus Muskelgewebe und cDNA - Synthese	21
3.2.1. RNA-Extraktion aus Muskelgewebe.....	21
3.2.2. Synthese von cDNA mit Reverser Transkriptase und PCR-Amplifikation (RT-PCR)	21
3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.3.1. Prinzip der PCR.....	22
3.3.2. Reaktionsbedingungen	22
3.3.3. Optimierungen	23
3.3.4. cDNA-PCR.....	24
3.3.5. PCR-Primer	25
3.4. Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese	27
3.5. Gelextraktion.....	27

3.6.	Sequenzanalyse.....	27
3.7.	Klonierungen.....	28
3.7.1.	Einführen der Mutation <i>VCP D120del</i> in den Vektor pEF-DEST51	28
3.7.2.	Sequenzen der Mutagenese-Primer.....	31
3.7.3.	Kolonie-PCR.....	31
3.8.	Ligation.....	32
3.9.	Transformation von Bakterien	32
3.10.	Bakterienkultur.....	32
3.11.	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	32
3.12.	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
4.	Zellkultur.....	33
4.1.	Kultivierung der Zellen	33
4.2.	Transfektion	33
5.	Herstellung der Proteinextrakte.....	33
6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (Western Blot).....	34
6.1.	Herstellung des Laemmli-Gels	34
6.2.	Herstellung des Schägger und Jagow-Gels	34
6.3.	Gelelektrophorese	35
6.4.	Western blotting.....	35
7.	Immunfluoreszenz	36
8.	Antikörper	36
9.	Transdifferenzierung von Fibroblasten mit MyoD.....	37
IV)	Ergebnisse.....	38
1.	Mutationen im <i>GNE</i> -Gen.....	38
1.1.	Patient A: Die Mutation V331G (I200F) im <i>GNE</i> -Gen.....	38
1.1.1.	Klinische Daten	38
1.1.2.	Molekulargenetische Untersuchung.....	39
1.2.	Patient B: Die Mutation D378Y (V696M).....	40
1.2.1.	Klinische Daten	40
1.2.2.	Molekulargenetische Untersuchung.....	40
1.3.	Patient C: Die Mutation V696M ohne 2. Mutation	41
1.3.1.	Molekulargenetische Untersuchung.....	42

1.3.2.	Klinische Daten	42
1.3.3.	RT-PCR/RNA-Gewinnung und Sequenzanalyse.....	42
1.4.	Vergleichstabelle	43
2.	Mutationen im <i>VCP</i> -Gen	44
2.1.	Die Mutation R155H/L.....	44
2.2.	Die Mutation D120del	46
2.2.1.	Klinische Daten	46
2.2.2.	Molekulargenetische Untersuchung.....	49
2.2.3.	Phylogenetische Relevanz.....	50
2.2.4.	Einfluss der Mutationen im <i>VCP</i> -Gen auf das Autophagosom	50
2.2.5.	Transdifferenzierung von Patientenfibroblasten in Myoblasten mit MyoD ...	53
2.2.6.	Pathogenitätsprognose mit MutationTaster®.....	56
V)	Diskussion.....	57
1.	Mutationen im <i>GNE</i> -Gen.....	57
1.1.	Patient A:	57
1.2.	Patient B:	57
1.3.	Patient C:.....	58
1.4.	Zusammenfassung	58
2.	Mutationen im <i>VCP</i> -Gen	58
2.1.	Die Mutation an Position R155	59
2.2.	Die Deletion D120del.....	60
2.2.1.	Klinischer Verlauf.....	60
2.2.2.	Funktionelle Untersuchungen der Mutation	61
3.	Bedeutung der genetischen Diagnostik	64
4.	Ausblick	64
VI)	Zusammenfassung	66
	Literatur	68
	Danksagung	73
	Lebenslauf	74
	Ehrenwörtliche Erklärung	75

ABSTRACT

Die Gruppe der hereditären Einschlusskörpermyopathien (*hereditary inclusion body myopathy; hIBM*) umfasst eine Vielzahl an erblich bedingten Muskelerkrankungen mit dem Hauptsymptom der Muskelschwäche.

Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Einschlusskörpermyopathie die Kandidatengene *GNE* und *VCP* auf krankheitsrelevante Mutationen hin zu überprüfen und durch klinische und molekularbiologische Charakterisierung einzelner Mutationen die molekulare Pathogenese der Erkrankung näher zu analysieren.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA von 26 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer *GNE*-Myopathie oder IBMPFD (Einschlusskörpermyopathie assoziiert mit M. Paget und frontotemporaler Demenz) auf Mutationen untersucht. Zusammengesetzt heterozygote oder homozygote Mutationen im *GNE*-Gen führen zum Krankheitsbild der *GNE*-Myopathie (früher als HIBM2 bezeichnet), während für die IBMPFD eine autosomal dominante Mutation im *VCP*-Gen ursächlich ist.

Drei Patienten trugen unterschiedliche Mutationen im *GNE*-Gen, das für das bifunktionale Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) kodiert. Als Erstsymptomatik der *GNE*-Myopathie fällt primär eine Muskelschwäche und -atrophie der distalen und proximalen Muskulatur auf, wobei der M. quadriceps femoris typischerweise ausgespart bleibt.

Bei insgesamt vier der untersuchten Patienten konnte eine Mutation im *VCP*-Gen, das für das Valosin-containing protein (*VCP*) kodiert, festgestellt werden. Mutationen in diesem Gen führen zu einer IBMPFD, die durch die Symptomtrias Einschlusskörpermyopathie, Morbus Paget und früh einsetzender frontotemporaler Demenz gekennzeichnet ist. Mit einem mittleren Manifestationsalter von 45 Jahren zeigen sich bei den Patienten Symptome einer langsam progredienten distalen und proximalen Muskelschwäche. Im weiteren Verlauf können dann fakultativ Symptome eines ossären M. Paget und einer frontotemporalen Demenz hinzutreten.

VCP gehört zur Gruppe der AAA-ATPasen, die in der Zelle mannigfaltige Funktionen erfüllen. *VCP* spielt auch eine Schlüsselrolle bei der Autophagie der Zelle. Durch Mutationen im *VCP*-Gen wird die Autophagosomenreifung gestört, was zu einer intrazellulären Akkumulation von Proteinen und zur Vakuolenbildung führt. Dadurch ist die Myofibrillenbildung beeinträchtigt und könnte damit einen Teil des Pathomechanismus der IBMPFD erklären. Diese Mechanismen sind für die häufigste humane Mutation im *VCP*-Gen (R155H) bereits gut untersucht. Unsere Versuche konnten bestätigen, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit weltweit erste beschriebene Deletion im *VCP*-Gen (D120del) Störungen im Bereich der Autophagie verursacht. Auch auf struktureller Ebene wurde mit

Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Störung der Myofibrillenbildung nachgewiesen. Daraus ergaben sich neben der klinischen Symptomatik gute Hinweise, dass die Deletion D120del auf einer ähnlichen Ebene wie die Mutation R155H pathophysiologische Mechanismen der IBMPFD beeinflusst.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
CK	Serum Kreatinkinase
CT	Computer-Tomographie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemoluminescence
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation
FCS	fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FSHD	Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie
FTD	frontal temporal dementia / Fronto-temporale Demenz
FTLD-U	frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDAC6	Histon Deacetylase 6
hIBM	hereditary inclusion body myopathy
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HS	Horse Serum
IBM	Einschlußkörpermyopathie (<u>i</u> nclusion <u>b</u> ody <u>m</u> yopathy)
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton (Einheit der Molekularmasse)
LC3	Microtubuli-assoziiertes Protein1, leichte Kette (<u>l</u> ight <u>c</u> hain) 3
LC3-B-I	Microtubuli-assoziiertes Protein1, leichte Kette (<u>l</u> ight <u>c</u> hain) 3 Typ B Isoform I
LC3B-II	Microtubuli-assoziiertes Protein1, leichte Kette (<u>l</u> ight <u>c</u> hain) 3 Typ B Isoform II
LGMD	Gliedergürteldystrophie (<u>l</u> imb <u>g</u> irdle <u>m</u> uscular <u>d</u> ystrophy)

M.	Morbus
M.	Musculus
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MyHC	Myosin heavy chain
n.b.	nicht bestimmt
n.u.	nicht untersucht
OD	optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	physiologische Salzlösung in Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sIBM	sporadic inclusion body myopathy
siRNA	silencing ribonucleic acid
SQSTM1	Sequestosom 1
TDP-43	TAR DNA-binding-protein 43
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur (melting temperature)
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
VCP	Valosin-containing protein
WB	Westernblot

I) EINLEITUNG

Die Gruppe der hereditären Einschlusskörperchenmyopathien (*hereditary inclusion body myopathy; hIBM*) umfasst eine Vielzahl an erblich bedingten Muskelerkrankungen, die sich alle durch das Hauptsymptom der im frühen bis mittleren Erwachsenenalter auftretenden Muskelschwäche auszeichnen. Es kommen sowohl autosomal-rezessive als auch autosomal-dominante Vererbungsmuster vor, der klinische Phänotyp der Patienten ist dabei individuell sehr unterschiedlich, was zusammen mit der Seltenheit der Erkrankung die Diagnosestellung erschwert. Allen gemeinsam ist das histologische Auftreten von Einschlusskörperchen (*rimmed vacuoles*) in der Muskelbiopsie. Laborchemisch zeigt sich meist eine normale bis leicht erhöhte Kreatinkinase (CK) im Serum.

Differentialdiagnostisch sind die Formen der hIBM von der Einschlusskörperchenmyositis (*inclusion body myositis; IBM*), die mit einem entzündlichen Geschehen im Muskel einhergeht, zu unterscheiden. Diese Form wird auch als sporadische Einschlusskörperchenmyositis (*sporadic inclusion body myositis; sIBM*) bezeichnet und ist durch eine autoimmun bedingte Entzündungsreaktion und Degeneration des Skelettmuskels charakterisiert.

Die hereditären Einschlusskörperchenmyopathien sind Gegenstand der Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Dabei wird schwerpunktmäßig auf die Krankheitsbilder hIBM2 (GNE-Myopathie) und IBMPFD eingegangen.

1. Molekulargenetische Klassifikation

Grundsätzlich teilt man die *hIBMs* in 4 Gruppen ein:

1. *hIBM1* (OMIM # 601419): Eine autosomal-dominante Form, bei der der M. quadriceps sehr früh von der Muskelschwäche betroffen ist,
2. *hIBM2* (OMIM # 600737): Eine autosomal-rezessive Form, bei der primär die Muskeln der unteren Extremität von der Muskelschwäche betroffen sind, der M. quadriceps aber lange ausgespart bleibt (*quadriceps-sparing myopathy [QSM]*). Diese Erkrankung konnte auf Mutationen auf Chromosom 9 im Gen der *UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)* zurückgeführt werden. Die Erkrankung wird heute als allelisch mit der hauptsächlich in Japan und dem mittleren Osten auftretenden Form der *distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV)* oder Nonaka-Myopathie (OMIM # 605820) angesehen.
3. *IBMPFD (Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia; OMIM # 167320)*: Eine autosomal-dominant vererbte Form der *hIBM*, die mit einem ossären M. Paget und einer frontotemporalen Demenz assoziiert ist. Diese Erkrankung konnte ebenfalls auf eine Mutation auf

Chromosom 9, allerdings im Gen des *valosin-containing protein (VCP)* zurückgeführt werden.

4. *hIBM3* (OMIM # 605637): Eine extrem seltene autosomal-dominant vererbte Form der hIBM. Hauptsymptome sind hierbei angeborene Gelenkkontrakturen, eine externe Ophthalmoplegie und eine proximale Muskelschwäche. Histologisch finden sich *rimmed vacuoles* in der Muskelbiopsie. Die Erkrankung wird auf eine Mutation im Gen der *myosin heavy chain II (MHCII)* auf Chromosom 17 zurückgeführt.

2. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 1

Die hIBM1 ist eine sehr seltene autosomal-dominante Muskelerkrankung, der eine Mutation im Desmin-Gen auf Chromosom 2q35 zugrunde liegt (Goebel and Fardeau 2004). Die Erkrankung wird nach OMIM den Myofibrillären Myopathien (MFM; OMIM #601419), einer Gruppe chronischer neuromuskulärer Erkrankungen zugeordnet, die sich durch eine heterogene Genetik, aber eine homogene Morphologie auszeichnen.

Das Manifestationsalter der hIBM1 liegt zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr. Klinisch tritt typischerweise eine langsam progrediente Muskelschwäche mit früher Beteiligung des M. quadriceps femoris auf. Die Erkrankung ist mit dem Auftreten von Kardiomyopathien und Herzrhythmusstörungen assoziiert. Histologisch finden sich in der Muskelbiopsie intrazelluläre Desmin-positive Aggregate, „rimmed vacuoles“ und multifokale myopathische Veränderungen wie beispielsweise endomysiale Fibrosen oder Variationen im Faserkaliber (Park et al. 2000; Ferreira et al. 2004).

3. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 2

1984 wurde die autosomal-rezessive Form der hIBM2 zum ersten Mal bei Juden aus dem Iran und dem mittleren Osten als eine den M. quadriceps aussparende Myopathie (quadriceps sparing myopathy; QSM) beschrieben (Argov and Yarom 1984). Die Krankheit ist sehr selten und genaue epidemiologische Daten fehlen, die Prävalenz bei Juden persischer Herkunft beträgt 1:500 (Argov et al. 1997).

Parallel dazu wurde eine distale Myopathie mit rimmed vacuoles (DMRV) bei japanischen Patienten beschrieben, nach ihrem Erstbeschreiber auch Nonaka-Myopathie genannt (Nonaka et al. 1981). Durch den identischen Phänotyp und Genotyp wurden diese Krankheitsbilder später als hIBM2 oder GNE-Myopathie zusammengefasst (Nishino et al. 2002).

3.1. PATHOLOGIE

Bei allen Einschlusskörperchenmyopathien finden sich in der Muskelbiopsie im Zytoplasma und Zellkern lichtmikroskopisch vor allem in atrophierten Muskelfasern umrandete oder gerahmte Vakuolen, sogenannte „rimmed vacuoles“, und eosinophile filamentöse Einschlüsse mit einem Durchmesser von circa 14 – 20 nm. Die Vakuolen

enthalten eine Vielzahl an Proteinen, darunter Apolipoprotein E, Ubiquitin, phosphoryliertes Tau-Protein und Amyloid-beta (Dubourg et al. 2011).

Die Serum-Kreatinkinase (CK) ist charakteristischerweise normal bis leicht erhöht. Der genaue Pathomechanismus der hIBM2 ist bisher nicht bekannt, allerdings gibt es verschiedene Ansatzpunkte, die das Entstehen der Erkrankung zu erklären versuchen. Das bifunktionale Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) katalysiert als Schlüsselenzym die ersten beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Sialinsäurebiosynthese. Dabei wird der erste Schritt von der N-terminalen Epimerasedomäne katalysiert, der zweite Schritt, eine ATP-abhängige Phosphorylierung, von der C-terminalen Kinase-Domäne. Nach weiteren Zwischenschritten entsteht letztendlich *N*-Acetylneuraminsäure, die häufigste Sialinsäure in eukaryontischen Zellen (Sparks et al. 2005) (Abb. 1).

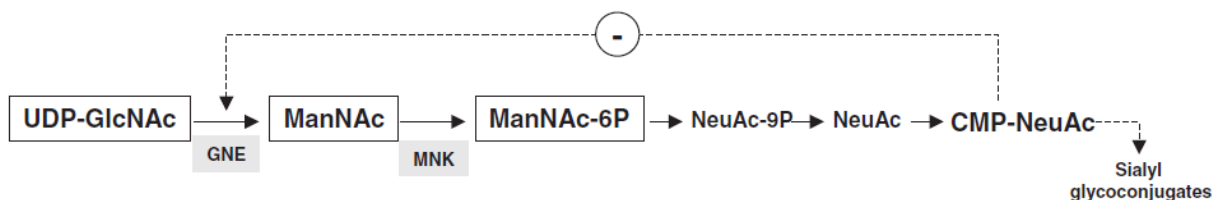


Abb. 1 Bedeutung von *GNE* bei der Biosynthese von CMP-NeuAc Im ersten Schritt katalysiert die Epimerase-Domäne von *GNE* die Umwandlung von Uridindiphosphat-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zu *N*-Acetylmannosamin (ManNAc). Die Enzymaktivität wird dabei vom Endprodukt Cytosinmonophosphat-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-NeuAc) im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Bindung an das allosterische Zentrum gehemmt. Im zweiten Schritt folgt die Phosphorylierung von ManNAc durch die Kinase-Domäne von *GNE*. Über weitere Zwischenschritte entsteht schließlich das Endprodukt CMP-NeuAc, das im Golgi-Apparat Glycokonjugate sialyliert (Sparks et al. 2005).

Sialinsäuren haben als Bestandteil von Aminosuktern im Körper eine zentrale Bedeutung bei einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen wie z. B. der Zell-Zell-Interaktion und der Signaltransduktion und spielen damit eine wichtige Rolle im Verhalten der Tumorigenität und Metastasierung maligner Zellen oder im Adhäsionsverhalten von Bakterien und Viren (Dennis and Laferte 1985; Edelman and Crossin 1991; Hinderlich et al. 2001; Matrosovich and Klenk 2003). Als natürlicher Baustein von Glykoproteinen und Gangliosiden sorgen sie für die nötige Stabilität an der Zellmatrix (Rens-Domiano and Reisine 1991). Des Weiteren schützen Sialinsäuren Proteine vor einem Abbau durch Proteasen.

Die Rolle von *GNE* als Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese sowie die Funktion der Sialinsäuren ist somit gut untersucht, dennoch erklären diese Hypothesen nicht endgültig die Pathophysiologie der hIBM2. Mutationen im *GNE*-Gen führen nicht zu einem Ausfall der Enzymfunktion sondern zu einer messbar reduzierten enzymatischen Aktivität des gleichnamigen Enzyms. Dabei zeigt sich bei *in vitro*-Experimenten, dass eine Mutation in einer Domäne auch die Aktivität der anderen Domäne beeinflusst (Penner et al. 2006). Saito und Tomimitsu berichten von einem Patienten mit zwei Mutationen in der Epimerasedomäne, bei dem eine Hyposialylierung von Glykoproteinen im Skelettmuskel möglicherweise aufgrund von falsch gefalteten Glykoproteinen zu einer Dysfunktion der Skelettmuskulatur führt (Saito et al.

2004). Andere Autoren geben zu bedenken, dass die Enzymaktivität nur bei homozygoten Mutationen ausreichend reduziert ist, um auch einen Effekt auf die Sialylierung von Skelettmuskel-Glykoproteinen zu haben und dass somit die Sialylierung in der Pathogenese der GNE-Myopathie möglicherweise keine so große Rolle spielt wie bisher angenommen, sondern andere, bisher noch nicht ausreichend gut untersuchte Mechanismen, die ebenfalls ein funktionierendes *GNE* voraussetzen, weitaus relevanter sind (Salama et al. 2005).

Somit sind mit Sicherheit noch weitere Untersuchungen notwendig, um eine sinnvolle Erklärung für den Pathomechanismus der GNE-Myopathie zu finden und damit die Grundlage für einen kausalen Therapieansatz zu schaffen.

3.2. KLINIK

Die GNE-Myopathie manifestiert sich durchschnittlich im Alter von 20 Jahren (15-40 Jahre). Sie zeichnet sich durch einen langsam progredienten Verlauf einer distalen und proximalen Myopathie aus. Meist fällt die Erkrankung primär durch eine Fußheberschwäche auf, da zu Beginn oft der M. tibialis anterior, der an der unteren Extremität für die Dorsalflexion und Supination im Fußgelenk verantwortlich ist, von der Muskelschwäche betroffen ist. Klinisch ist dabei oft ein Steppergang als Primärsymptom zu beobachten. Charakteristisch ist, dass der M. quadriceps femoris selten von der Muskelschwäche betroffen ist und die Patienten somit noch sehr lange eine grundlegende Gehfähigkeit behalten (s. Abb. 2 und Abb. 3). Dies grenzt die HIBM2 auch differentialdiagnostisch von den anderen Formen der hereditären Myopathien ab (Argov and Yarom 1984).

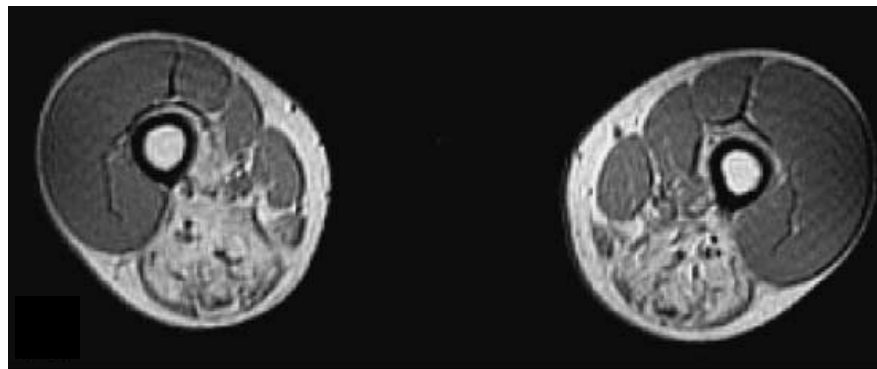


Abb. 2 T1-gewichtete MRT-Aufnahme des Oberschenkels. Symmetrischer fettgewebiger Umbau der dorsalen Flexorengruppe. Deutlich zu sehen ist die Aussparung des M. quadriceps (Krause et al. 2003).

Als weitere Symptome zu Beginn der Erkrankung treten manchmal eine Muskelschwäche der Dorsalflexoren und der Zehenextensoren auf. Eine Beteiligung der Finger- und Handmuskulatur kann hinzukommen, ist aber im Vergleich zur Beteiligung der unteren Extremität seltener.

Typischerweise schreitet die Muskelschwäche im weiteren Verlauf vom anterioren Kompartiment nach dorsal und weiter nach proximal fort, sodass auch eine Beteiligung der

Nackermuskulatur, des Schultergürtels und der Rückenmuskulatur mit Auftreten einer Scapula alata beobachtet wird (s. Abb. 3A).

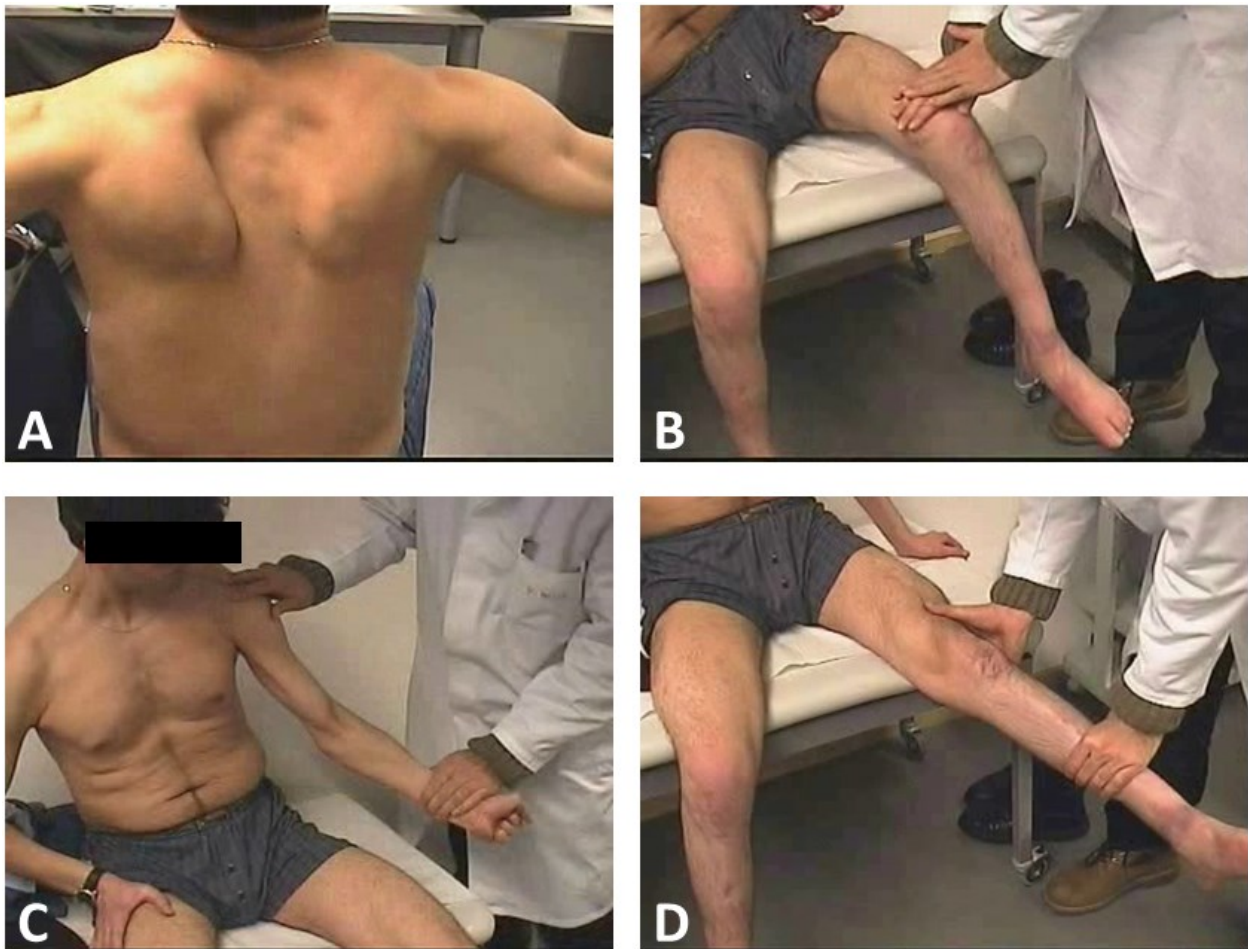


Abb. 3 Klinische Untersuchung eines Patienten mit einer HIBM2. (A) zeigt die deutlich ausgeprägte Scapula alata bei Abduktion im Schultergelenk. Die Abduktion $>90^\circ$ ist nur erschwert möglich. (B) Eine Flexion im Hüftgelenk ist gegen die Schwerkraft gut möglich, ein leichter Gegendruck des Untersuchers genügt aber um den Oberschenkel wieder auf die Untersuchungsfläche zu drücken. Gut zu sehen ist hier auch die Ausweichbewegung des Oberkörpers, die als Kompensationsmechanismus für die Flexion im Hüftgelenk genutzt wird. (C) zeigt die deutliche Atrophie der Muskulatur der oberen Extremität. Eine forcierte Extension kann gegen die vom Patienten durchgeführte Flexion mit wenig Kraft erreicht werden. (D) Der Patient kann die Extension im Kniegelenk mit eigener Kraft durchführen. Die Kniestreckung ist vom Untersucher auch bei stärkster Krafteinwirkung nicht überwindbar. Diese Untersuchung zeigt klinisch eine Aussparung des M. quadriceps femoris und ist in der Zusammenschau verdächtig für eine GNE-Myopathie. Die Bilder wurden aus einem Untersuchungsvideo der Ambulanz des Friedrich-Baur-Instituts entnommen. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. M. Walter und PD Dr. Dr. S. Krause (Krause 2011).

10 bis 15 Jahre nach Primärmanifestation kommt es zu einer Generalisierung, wobei die Augenmuskulatur, die mimische Muskulatur und die Atemhilfsmuskulatur charakteristischerweise ausgespart bleiben. Eine kardiale Mitbeteiligung mit konsekutivem Herztod wurde gelegentlich beobachtet (Nishino et al. 2005).

Aufgrund der progredienten Muskelschwäche und der Einschränkung der Gehfähigkeit besteht im Schnitt nach 12 Jahren eine Rollstuhlpflichtigkeit.

Diagnostisch findet sich laborchemisch die Serum Kreatinkinase (CK) im Normbereich oder leicht erhöht, im EMG zeigen sich meist unspezifische myopathische Veränderungen, die Nervenleitgeschwindigkeit ist typischerweise normal. In der Computertomographie oder Magnetresonanztomographie lässt sich in den betroffenen Muskelgruppen eine degenerative Umwandlung des Muskelgewebes zu Fett- und Bindegewebe beobachten. Histologische Untersuchungen von Muskelbiopsaten zeigen unspezifische myopathische Veränderungen mit rimmed vacuoles und fettig-bindegewebigem Umbau der Muskelfasern (Saito et al. 2004; Huizing and Krasnewich 2009).

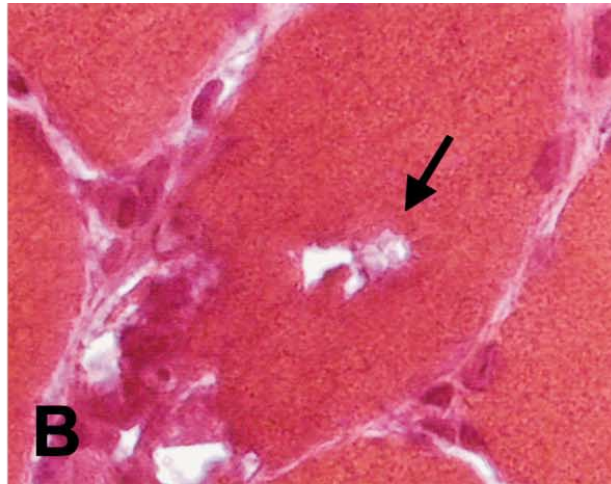


Abb. 4 Histologische Untersuchung eines Patientenmuskels bei GNE-Myopathie (Gefrierschnittpräparat). Standard Histologie (Schichtdicke 10µm; Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Vergr. 250x). Gezeigt ist eine Muskelfaser mit einem typischen Einschlusskörperchen (Pfeil) (Krause et al. 2003).

3.3. GENETIK

Die hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 2 bzw. GNE-Myopathie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erberkrankung, der Mutationen im Gen der UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*), das für das gleichnamige bifunktionale Enzym kodiert, zugrunde liegen. Das *GNE*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9p12-p13 und umfasst eine genomische Sequenz von ca. 700 kb (Eisenberg et al. 2001). Das Gen umfasst 13 Exons, wobei Exon 2-5 für die N-terminale Epimerasedomäne kodieren und Exon 6-12 für die C-terminale Kinasedomäne. Exon 1 und 13 sind nicht kodierend (Abb. 5).

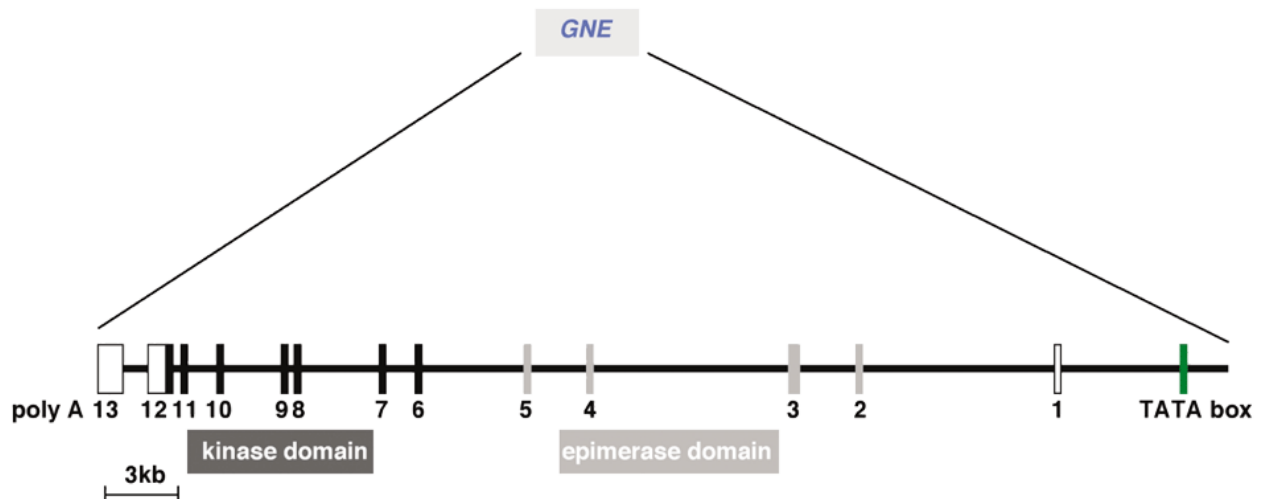


Abb. 5 Vergrößerte Ansicht einer 50 kb umfassenden Sequenz auf Chromosom 9p12-p13, die die Organisation des *GNE*-Gens und die Lokalisation und Abfolge der Exons schematisch darstellt. Die ausgefüllten Kästchen stehen für kodierende Exons, Exon 2-5 (grau) kodiert für die Epimerasedomäne, Exon 6-12 für die Kinasedomäne, weiße Kästchen stehen für nicht-kodierende Exons (1 und 13). 10 kb oberhalb („upstream“) von Exon 1 befindet sich eine regulatorische TATA-Box-Sequenz. Entnommen aus (Eisenberg et al. 2001).

Neben der *GNE*-Myopathie spielt dieses Gen auch noch eine Rolle bei einer anderen Erkrankung, der Sialurie. Dabei kommt es, bedingt durch die fehlende Rückkopplungshemmung durch das Endprodukt, zu einer intrazellulären Akkumulation und einer vermehrten renalen Ausscheidung von Sialinsäure. Ursächlich dafür sind autosomal-dominant vererbte Mutationen im allosterischen Zentrum der Epimerasedomäne, wo das Endprodukt bindet.

Bei den Patienten mit *GNE*-Myopathie finden sich die Mutationen im Gegensatz zur Sialurie über den gesamten kodierenden Bereich des *GNE*-Gens, also sowohl im Bereich der Kinase als auch der Epimerasedomäne. Eine erhöhte Sialinausscheidung konnte bisher nicht beobachtet werden. Es treten bei der *GNE*-Myopathie zwei Formen von Mutationen auf: bei einer homozygoten Mutation sind beide Allele gleichzeitig von der gleichen Missense-Mutation betroffen, bei den häufigeren compound heterozygoten Mutationen sind zwei Mutationen auf unterschiedlichen Allen nötig, damit die Krankheit phänotypisch in Erscheinung tritt.

Bis dato sind ca. 60 unterschiedliche Mutationen in der Literatur beschrieben (Abb. 6). Am häufigsten tritt die Mutation M712T auf, die vermehrt in der jüdischen Population im Iran und mittleren Osten gefunden wurde und als „founder mutation“ bezeichnet wird (Argov et al. 2003).

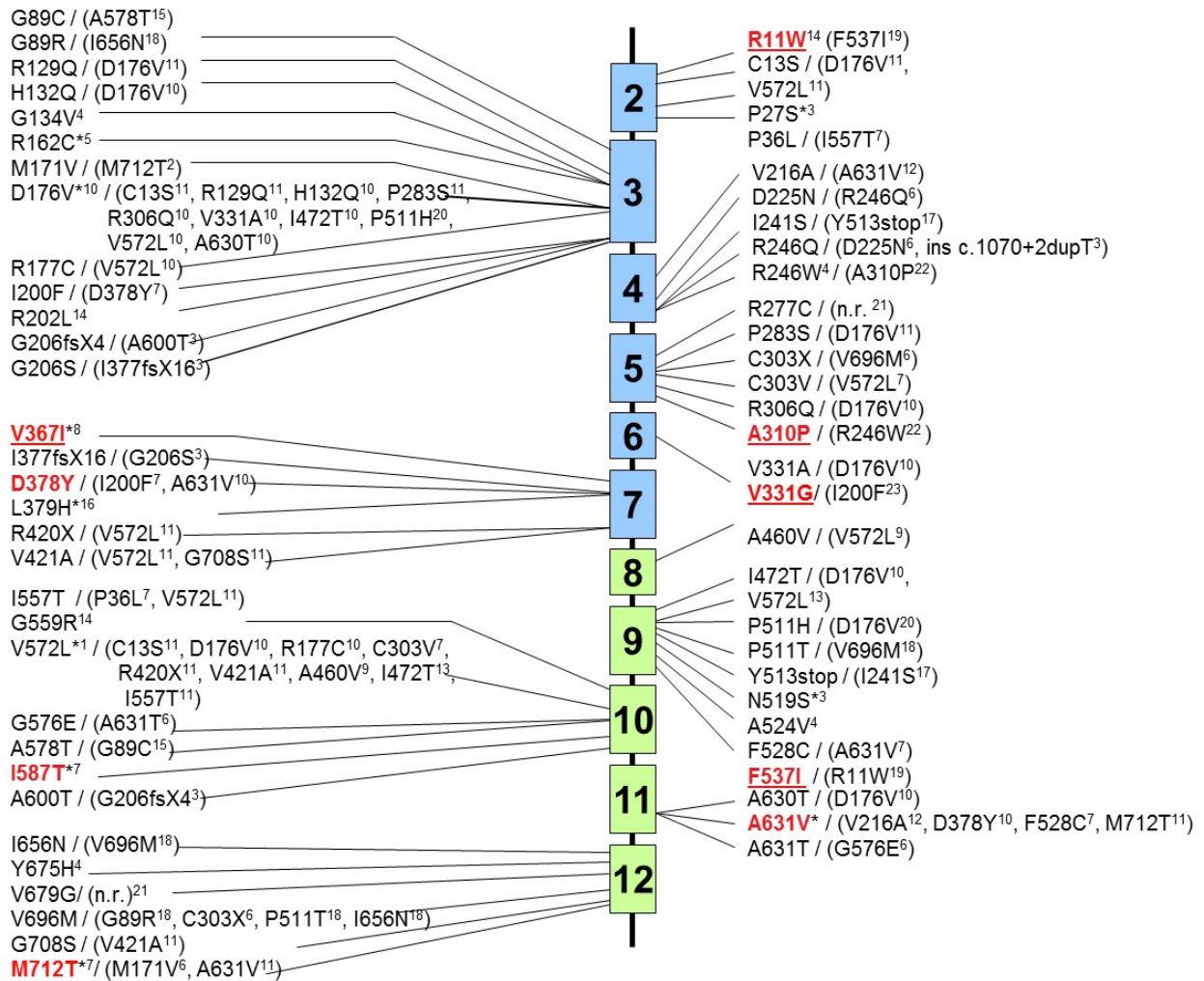


Abb. 6 Lokalisation der bekannten Mutationen im *GNE*-Gen in Bezug auf die Exons. Die blau markierten Exons kodieren für die Epimerasedomäne, die grün markierten für die Kinasedomäne. Die rot markierten Mutationsloci wurden u.a. im Labor für molekulare Myologie beschrieben. In Klammern ist immer die compound-heterozygote Mutation dargestellt, mit der die bezeichnete Mutation gemeinsam auftrat (Krause 2011).

Mit Daten aus der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie lassen sich 3D-Modelle von Proteinen errechnen. Bei solchen Analysen hat man festgestellt, dass die Mutationen in der Kinasedomäne von *GNE* hauptsächlich im Innern des Enzyms, bei der Epimerasedomäne vor allem an der Oberfläche lokalisiert sind (Penner et al. 2006) (Abb. 7).

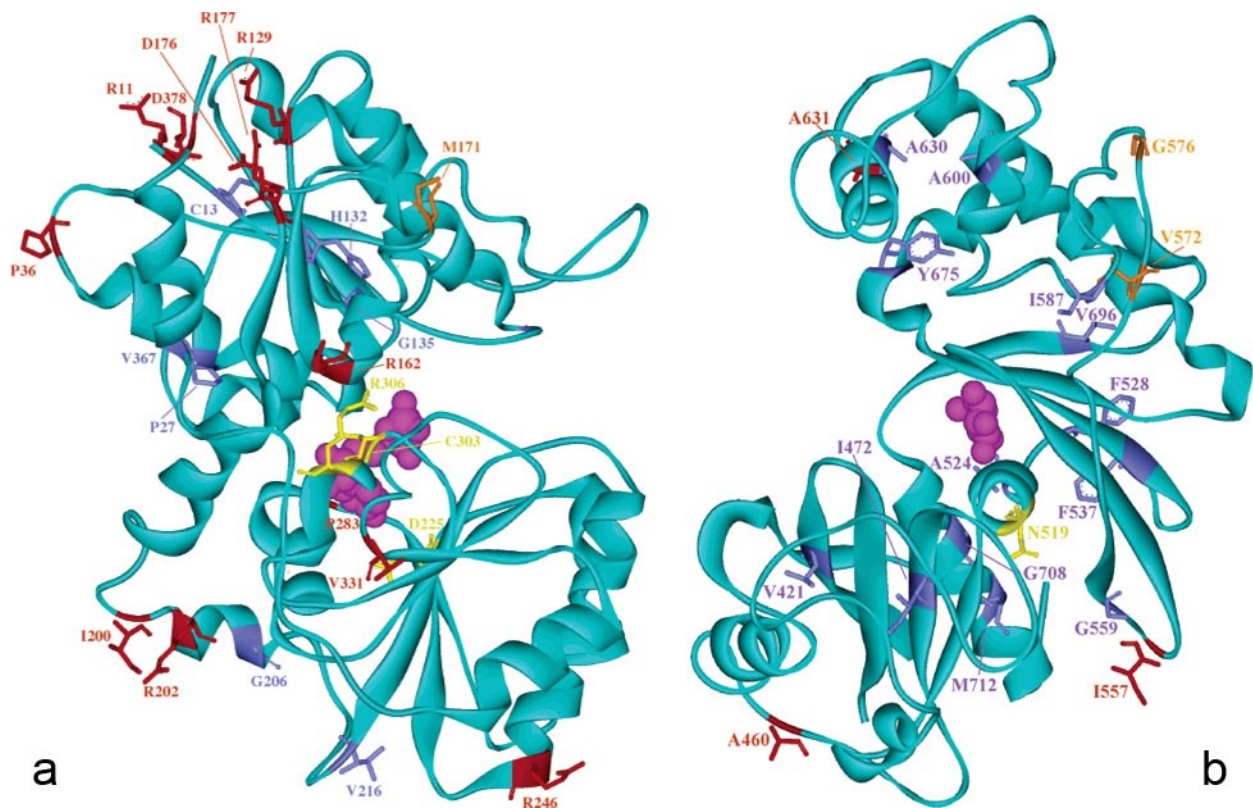


Abb. 7 Mutationsloci des *GNE*-Gens und ihre Lokalisation im Enzym. Gezeigt ist ein 3D-Modell der beiden Domänen des *GNE*-Gens. Die Modelle basieren auf Kristallstrukturanalysen der *E. coli* GlcNAc 2-Epimerase und der *E. coli* Glucokinase, die den jeweiligen funktionellen Domänen von GNE entsprechen. Aminosäuren, die bei der GNE-Myopathie häufig mutiert sind, sind farblich markiert, je nach Lokalisation: Rot für oberflächlich gelegene, blau für innen gelegene, orange für Aminosäuren im Bereich der Dimerisierungsinteraktionsfläche, gelb für Lokalisation im Substratbindungszentrum. a zeigt die Struktur der *E. coli* Glc-NAC 2-Epimerase im Komplex mit UDP, b zeigt die Kinasedomäne im Komplex mit Glukose. Auffällig ist bei der Epimerasedomäne das gehäufte Auftreten von Mutationen an der Oberfläche im Gegensatz zur Epimerasedomäne, wo die Mutationen eher bei Aminosäuren im Inneren des Enzyms auftreten (Penner et al. 2006).

4. Hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie Typ 3

Bei der HIBM3 handelt es sich um eine extrem seltene autosomal-dominante Form der Einschlusskörperchenmyopathie, die erstmals 1998 in einer schwedischen Familie beschrieben wurde (Darin et al. 1998). Dabei ist das Gen für die schwere Kette des Myosins (MyHC) auf Chromosom 17p13.1 mutiert, was zu einer Fehlfunktion von Typ 2A Muskelfasern führt. Daher konnte man den genauen Locus auf das für Typ 2A-Fasern kodierende Gen MYHC2A zurückführen (Martinsson et al. 1999; Martinsson et al. 2000).

Hauptsymptome der Erkrankung sind Gelenkkontrakturen und eine externe Ophthalmoplegie. Bei 75% der Patienten treten bereits bei Geburt Gelenkkontrakturen auf, die sich im frühen Kindesalter meist wieder zurückbilden. Daneben tritt eine vor allem proximal betonte Muskelschwäche und -atrophie sowie in 60% ein Tremor auf.

Die Erkrankungsprogredienz sistiert im Kindesalter nach Rückbildung der Kontrakturen, im Erwachsenenalter zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr kommt es zu einer

progredienten Muskelschwäche mit den typischen histopathologischen Veränderungen der Einschlusskörpermyopathien.

5. IBMPFD

IBMPFD ist eine seltene autosomal-dominant vererbte Muskelerkrankung mit drei phänotypischen Ausprägungen unterschiedlicher Penetranz: 90% der Patienten entwickeln eine Einschlusskörpermyopathie (IBM) mit einem mittleren Manifestationsalter von 45 Jahren. 51% der Patienten zeigen osteolytische Läsionen eines ossären Morbus Paget. 32% entwickeln Sprachstörungen und Verhaltensauffälligkeiten, die dem typischen Muster einer frontotemporalen Demenz entsprechen und im Mittel mit 54 Jahren auftreten. Ursache der Multisystemerkrankung ist eine Mutation im Gen des Valosin-containing protein (*VCP*) auf Chromosom 9p13-12 (OMIM #167320) (Watts et al. 2004; Haubenberger et al. 2005; Kimonis and Watts 2005).

5.1. PATHOLOGIE

Skelettmuskelpathologie

Muskelschnitte von IBMPFD Patienten zeigen ein ähnliches histologisches Bild wie bei den hereditären IBMs und der sporadischen IBM, weshalb man die IBMPFD auch den Einschlusskörpermyopathien zuordnet. Wie bei diesen beiden Krankheitsbildern finden sich auch bei der IBMPFD elektronenmikroskopisch eine gestörte Myofibrillenbildung, Vakuolen und Ubiquitin positive tubulofilamentöse Einschlüsse (Hubbers et al. 2007; Watts et al. 2007), wobei einschränkend angemerkt werden muss, dass nicht bei allen Patienten „rimmed vacuoles“ gefunden werden, was demzufolge oft zur Fehldiagnose einer unspezifischen Myopathie führt (Kimonis et al. 2008). Die Vakuolen haben typischerweise eine unregelmäßige Form und weisen am Rand teilweise basophilen Debris auf. Dabei können sie sowohl im Sarkoplasma als auch am Sarkolemm lokalisiert sein (Weihl et al. 2009). Differentialdiagnostisch lässt sich die IBMPFD von der sIBM durch das Fehlen von Entzündungszellen (T-Zellen) unterscheiden. Des Weiteren sind alle mit Muskeldystrophien assoziierten Proteine (Dystrophin, Emerin, Sarcoglycan, Dystroglycan) quantitativ im Immunoblot im Normbereich vorhanden. Eine mitochondrial bedingte Pathologie kann ebenfalls ausgeschlossen werden (Kovach et al. 2001).

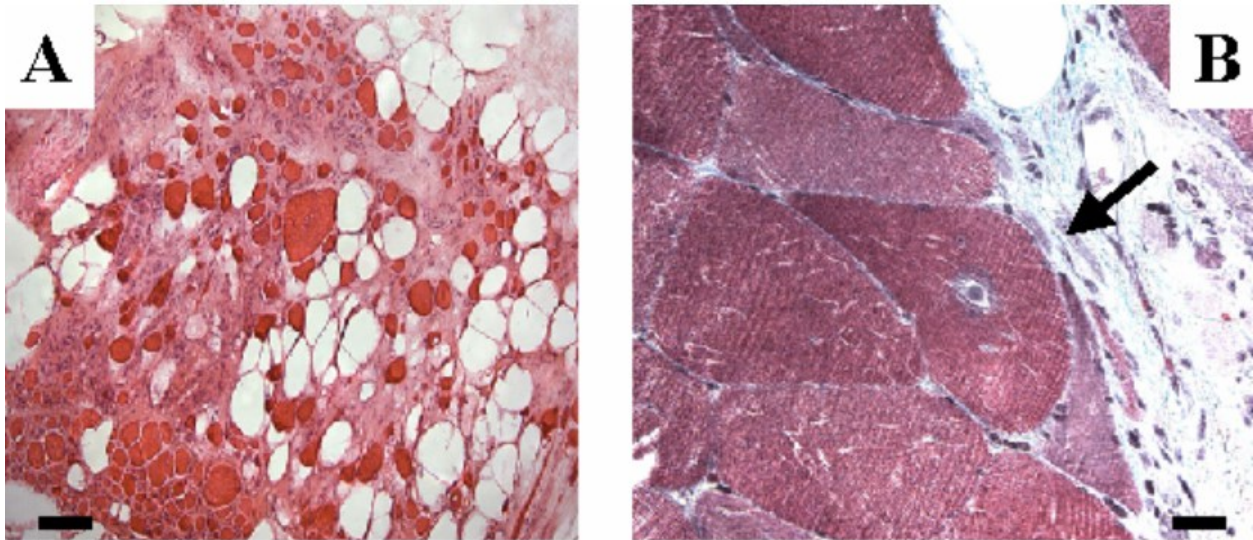


Abb. 8 Lichtmikroskopische Histologie aus Biospiematerial aus dem linken M. quadriceps femoris eines 59-Jahre alten IBMPFD-Patienten mit einer Mutation im VCP-Gen. (A) In der Hematoxylin-Eosin (HE)-Färbung finden sich Variationen des Muskelfaserkalibers, chronisch myopathische Veränderungen mit fettgewebigem Umbau, Bindegewebsproliferation und rimmed vacoules (Maßstab 80 µm). (B) Vergrößerte rimmed vacuole (Pfeil) mit eosinophilen Einschlüssen (HE, Maßstab 20 µm) (Krause et al. 2007).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen in den Myofibrillen β -Amyloid Ablagerungen (Kovach et al. 2001; Hubbers et al. 2007), Färbungen gegen ubiquitinierte Proteine zeigen in den meisten Muskelbiopsiepräparaten Ubiquitin-positive Einschlusskörperchen, sowohl im Zellkern als auch am Sarkolemm (Hubbers et al. 2007; Wehl et al. 2009).

VCP weist in der gesunden Muskelzelle ein diffuses Verteilungsmuster auf. Es konnte im Sarkoplasma, im Zellkern und perinukleär nachgewiesen werden (Watts et al. 2004; Guyant-Marechal et al. 2006; Greenberg et al. 2007). Bei IBMPFD Patienten finden sich VCP-positive Einschlusskörperchen im Sarkoplasma und im Zellkern, die in Muskelfasern mit und ohne Vakuolenbildung auftreten (Watts et al. 2004; Guyant-Marechal et al. 2006; Hubbers et al. 2007). Interessanterweise sind diese Einschlusskörperchen oft mit Ubiquitin positiven Einschlusskörperchen kolokalisiert (Hubbers et al. 2007). Leider ist das Vorhandensein von VCP-positiven Einschlüssen kein spezifisches Zeichen der IBMPFD, sondern tritt auch bei anderen Muskelerkrankungen, u. a. der sIBM, auf (Watts et al. 2004). Auch die Vakuolenbildung bei IBMPFD ist nicht konstant, teilweise werden bei nur 60% der Patienten Vakuolen gefunden (Kimonis et al. 2008), sodass das Vorhandensein von Ubiquitin-positiven Einschlüssen in Verbindung mit VCP- und TDP-43-positiven Einschlusskörperchen (s. u.) diagnostisch wohl den besten Hinweis gibt (Wehl et al. 2009).

Hirnpathologie

Makroskopisch und in MRT- und CT-Untersuchungen zeigt sich bei IBMPFD-Patienten, die von einer frontotemporalen Demenz (FTD) betroffen sind, meist eine Degeneration und Atrophie des präfrontalen Kortex und des vorderen Temporallappens (Krause et al. 2007).

Histopathologisch lässt sich diese Form der FTD von z. B. der Demenz vom Alzheimer Typ durch das Fehlen typischer Zeichen des M. Alzheimer (Tauopathie durch hyperphosphoryliertes Tau-Protein mit neurofibrillären Tangles, senile β -Amyloid-Plaques) unterscheiden. Bei der *VCP*-bedingten Demenz finden sich im histologischen Präparat im Zellkern und im Zytosol Ubiquitin-positive Einschlusskörperchen, die fast immer mit TDP-43 (TAR DNA-binding-protein 43)-positiven Einschlusskörperchen kolokalisieren (Neumann et al. 2007). Deshalb wird diese Form der Demenz auch als „frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions“ oder FTLD-U bezeichnet. IBMPFD war die erste FTLD-U, deren genetische Ursache identifiziert werden konnte (Schroder et al. 2005; Forman et al. 2006). TDP-43 ist ein RNA bindendes Protein und spielt beim Exon Skipping von Vorläufer-mRNA eine wichtige Rolle. Neben der FTLD-U kommen TDP-43 positive Einschlusskörperchen auch bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) vor. Man geht davon aus, dass es sich dabei um ein spezifisches Krankheitsmerkmal handelt und TDP-43 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen einnimmt (Neumann et al. 2006).

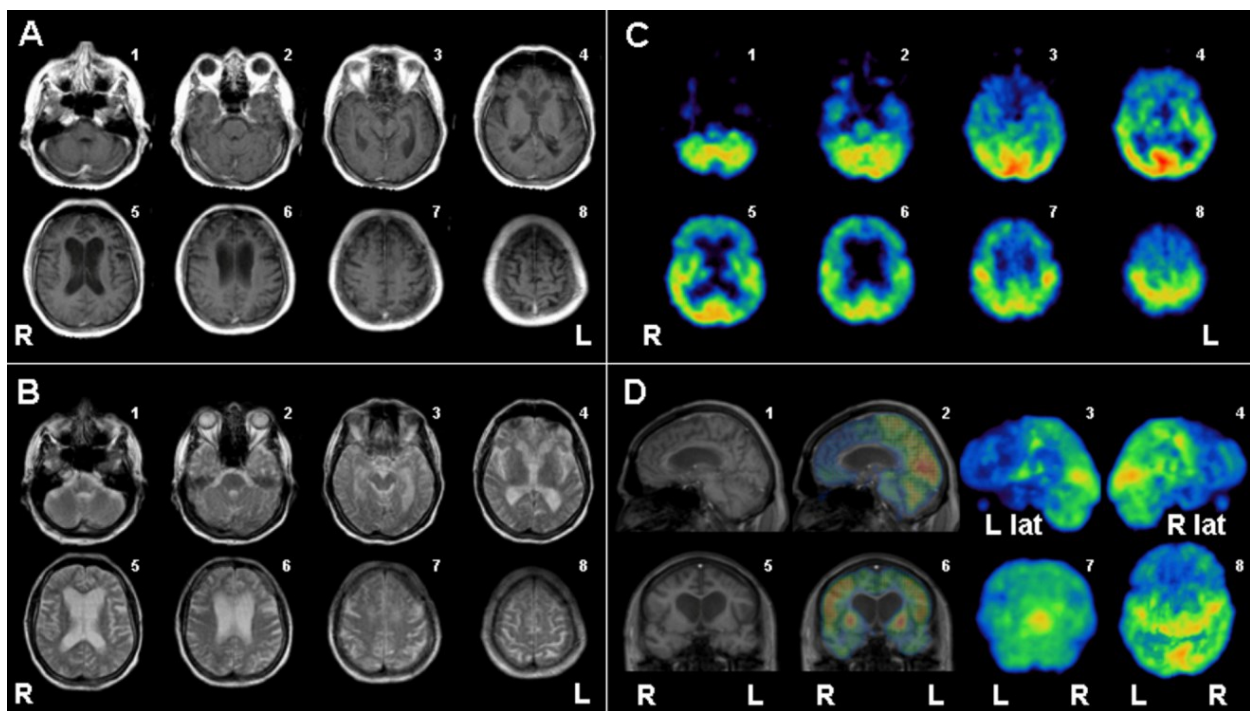


Abb. 9 MRT- und PET-Untersuchung des Gehirns eines IBMPFD-Patienten mit der Mutation R93C im *VCP*-Gen. Gezeigt sind Horizontal- (A, B, C), Sagittal- (D1, D2) und Frontalschnitte (D5, D6), sowie Rekonstruktionen des kortikalen Stoffwechsels in der Ansicht von links (D3), rechts (D4), posterior (D7) und oben (D8). Die kontrastmittelverstärkten Bilder in der T1-Wichtung (Serie A; TR=627 ms, TE=17 ms, Schichtdicke 6 mm) und in der T2-Wichtung (Serie B; TR=2,210 ms, TE=85 ms, Schichtdicke 5 mm) zeigen neben einer auffälligen Erweiterung der Seitenventrikel eine Erweiterung im Bereich der frontalen und perisylvischen Sulci. Wie der T1-gewichtete Sagittal- (D1) und Frontalschnitt (D5) (TR=15 ms, TE=6 ms, Schichtdicke 10 mm) zeigen, betrifft die Degeneration hauptsächlich die weiße Substanz, besonders im Bereich des Corpus callosum. Die Fusionsaufnahmen (D) und die isolierten PET-Bilder (C) zeigen vor allem im Bereich der oberen und mittleren Gyri des Frontalkortex, des linken frontalen Operculums und des linken unteren Parietallappens eine verminderte Stoffwechselaktivität (Krause et al. 2007)

Autophagie

VCP ist an einer Vielzahl von zellulären Abläufen wie Mitose, Apoptose, Organellbiogenese, Membranfusion und Proteinabbau beteiligt (Wang et al. 2004). Die größte Rolle für die Pathogenese spielt dabei wohl die regulatorische Rolle von *VCP* im Abbauweg zellulärer Proteine. Daher ist *VCP* mit einigen Mitgliedern des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) assoziiert. *VCP* sitzt auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und ist dort verantwortlich für die Extraktion falsch gefalteter ER-, transmembranaler und sekretorischer Proteine über die „endoplasmatic reticulum associated degradation (ERAD)“. Sobald diese Proteine aus dem ER entfernt wurden, werden sie ubiquitiniert und für den endgültigen Abbau zum 26S Proteasom geschickt. Auch dieser Schritt wird durch *VCP* vermittelt (Halawani and Latterich 2006).

Als weiterer Hinweis für die wichtige Rolle von *VCP* in Proteinabbauwegen dient die Beobachtung, dass die Histondeacetylase 6 (HDAC6), ein essentielles Protein für das Aggresom, an ubiquitinierte Proteine und *VCP* bindet. Im Falle einer beeinträchtigten Funktion des UPS vermittelt HDAC6 den Transport fehlgefalteter Proteine zum Aggresom, wo sie durch Autophagie abgebaut werden (Kawaguchi et al. 2003; Boyault et al. 2006; Pandey et al. 2007).

Unterstützend zeigen Studien mit genetischem Knockdown von *VCP* oder ATPase inaktivem *VCP* einen Anstieg an ubiquitinierten Proteinen im Immunoblot, verstärkte Vakuolenbildung im ER und Akkumulation zytosolischer und ER-spezifischer Proteine, die die wichtige Rolle von *VCP* im UPS unterstreichen (Dalal et al. 2004; Wojcik et al. 2004; Wojcik et al. 2006).

In anderen Studien mit IBMPFD-Patientenmyoblasten und Zellkulturzellen, in die künstlich eine IBMPFD Mutation eingeführt wurde, zeigt sich, dass autophagiespezifische Proteinmarker wie LC3II und p62 (s. unten) im Vergleich zu Kontrollmyoblasten signifikant ansteigen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass durch Mutationen im *VCP*-Gen Autophagiemechanismen gestört werden können. Die gleichen Beobachtungen zeigen sich im Tiermodell (Ju et al. 2009).

5.2. KLINIK

Myopathie

Eine Beteiligung der Muskulatur tritt bei ca. 90% der IBMPFD Patienten auf und ist durch eine im Erwachsenenalter beginnende, langsam progrediente distale und proximale Muskelschwäche charakterisiert, die sich initial vor allem im Bereich der Hüftmuskulatur und des Schultergürtels mit Auftreten einer Scapula alata manifestiert. Die Patienten fallen durch eine Gangstörung, die oft als Stepper- oder Watschelgang beschrieben wird, eine progrediente Armheberschwäche, Schwierigkeiten beim Treppensteigen und eine distinkt ausgeprägte Handmuskelschwäche auf. Die Muskeleigenreflexe sind abgeschwächt,

elektrophysiologisch ist die Nervenleitgeschwindigkeit meist normal, während sich im Elektromyogramm typische myopathische Potentiale mit kurzen schmalen polyphasischen Aktionspotentialen und positiven „sharp waves“ zeigen. Die Serum-Kreatinkinase (CK) ist meist im Normalbereich und kann lediglich zu Beginn der Erkrankung bei manchen Patienten leicht erhöht sein.

MRT-Untersuchungen zeigen Signalveränderungen in den betroffenen Muskelgruppen und Umbau von Muskel- in Fettgewebe, sowie Zeichen einer Atrophie. Seltener treten daneben auch Katarakt, Neuropathie und Kardiomyopathie auf. Dieses unspezifische Erkrankungsmuster führt oft zu Fehldiagnosen wie Gliedergürteldystrophie (LGMD), Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD), verschiedene Formen der distalen Myopathien und Amytrophe Lateralsklerose (ALS).

Die Erkrankung verläuft über Jahre progredient und führt meist zur Rollstuhlpflichtigkeit der Patienten. Viele sterben schließlich an den Folgen der Ateminsuffizienz oder Komplikationen, die von der FTD herrühren. (Hubbers et al. 2007; Kimonis et al. 2008; Weihl et al. 2009)

Morbus Paget

45-51% der Patienten mit IBMPFD weisen Knochenläsionen auf, die vereinbar mit der Diagnose eines ossären Morbus Paget sind, bei einem mittleren Manifestationsalter von 42 Jahren (im Gegensatz zu >50 Jahre in der Normalbevölkerung). Typischerweise sind die Wirbelsäule, das Becken, die Schulterblätter und der Schädelknochen am ehesten betroffen. Die Symptomatik ist dabei eher milde und äußert sich meist mit Rücken- oder Beckenschmerzen oder Skelettdeformitäten. Radiologische Untersuchungen zeigen eine grobmaschige Trabekulärstruktur, Rindenverdichtungen und unregelmäßige Sklerosierung. Die diagnostisch beste Sensitivität weist die Visualisierung des Knochenstoffwechsels durch eine Skelettszintigraphie auf. Laborchemisch ist fast immer die alkalische Phosphatase (AP) im Serum erhöht, die eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten anzeigt. (Kimonis et al. 2008; Weihl et al. 2009)

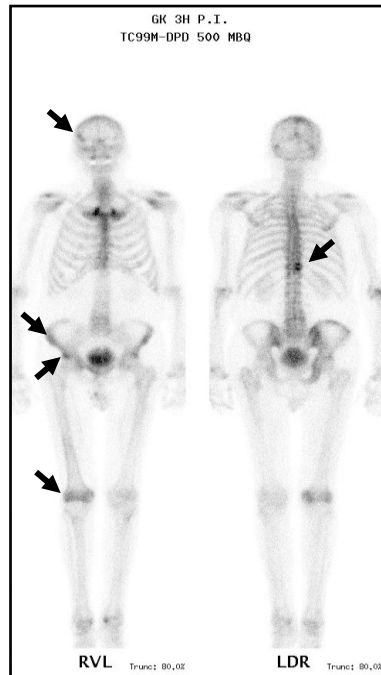


Abb. 10 Manifestation des Morbus Paget bei der IBMFPD. Skelettszintigraphie mit Technetium-99m. Bei diesem IBMFPD-Patienten liefert das Skelettszintigramm den Hinweis auf erhöhte Stoffwechselaktivität im Bereich des Schädelknochens, des Beckenkamms, der Brustwirbelsäule und der Femurkondylen rechts, vereinbar mit der Diagnose eines ossären Morbus Paget (Krause et al. 2007; Krause 2011).

Frontotemporale Demenz

Eine frontotemporale Demenz (FTD) tritt am seltensten auf. Nur 32-37% der Patienten entwickelten eine FTD mit einem mittleren Manifestationsalter von 54-55 Jahren. Die FTD zeichnet sich typischerweise durch Verhaltensauffälligkeiten aus, räumlich-visuelle Fähigkeiten und Merkfähigkeit sind meist nicht betroffen, was ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu anderen Demenzformen darstellt. Primär fallen die Patienten durch drastische Persönlichkeitsveränderungen, Affektlabilität, Störungen des sozialen und zwischenmenschlichen Umgangs, Perseveration, Aphasie und emotionaler Abstumpfung auf. Das wichtigste diagnostische Instrument ist die neuropsychologische Testung, radiologische Untersuchungen wie cerebrales MRT und CT können die Diagnose durch Zeichen der Atrophie im Frontallappen und vorderen Temporallappen untermauern (Kimonis et al. 2008; Wehl et al. 2009).

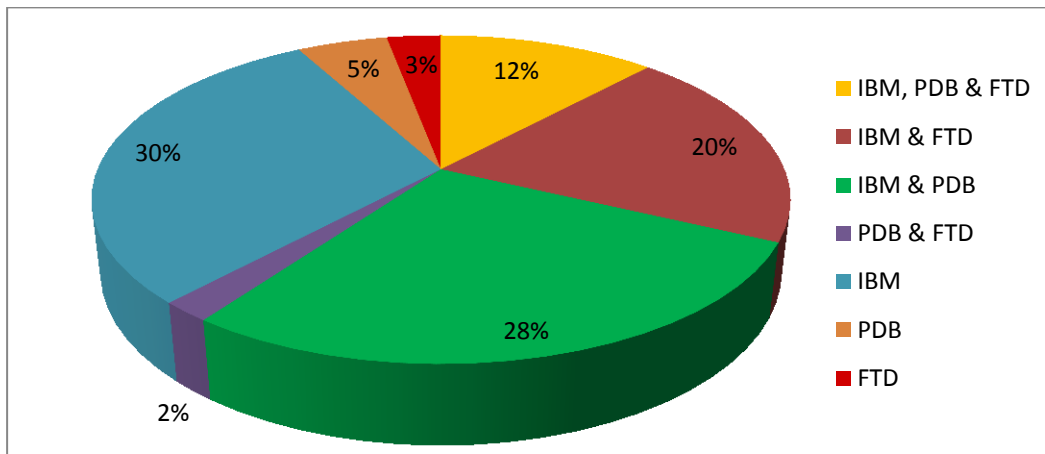


Abb. 11 Symptomverteilung der IBMPFD Das Diagramm zeigt die Häufigkeit der Symptome bei Patienten mit einer IBMPFD. Bei ca. 90% besteht eine IBM als Leitsymptom. IBM, PDB und FTD treten nur bei knapp 12% der Patienten gemeinsam auf [nach Daten aus (Kimonis et al. 2008)]

5.3. GENETIK

Die IBMPFD ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die auf einer Mutation im valosin-containing protein-Gen (*VCP*-Gen) auf Chromosom 9p13-p12, das für das gleichnamige Protein kodiert, beruht (Kimonis et al. 2008). Bis zum heutigen Tag sind 14 unabhängige Mutationen an 10 unterschiedlichen Stellen im *VCP*-Gen bekannt [(Weihl et al. 2009) und eigene Daten], die sich ausschließlich in der N und D1-Domäne konzentrieren (s. Abb. 12). Das *VCP*-Gen besteht aus 17 Exons.

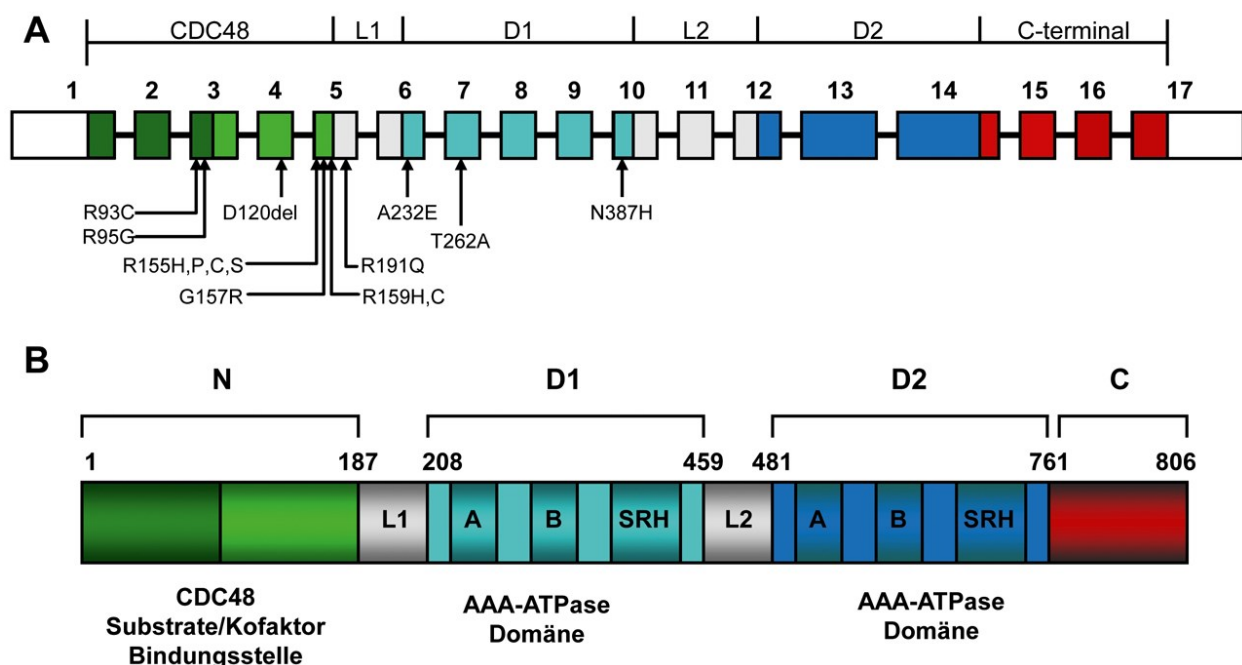


Abb. 12 Bekannte Mutationen im *VCP*-Gen Die Abbildung zeigt alle bisher bekannten Mutationen im *VCP*-Gen und setzt die Positionen in Relation zu den funktionellen Domänen. *VCP* hat 17 Exons, die Pfeile zeigen die ungefähre Position der Mutationen an. Die Lokalisation der jeweiligen Exon-Intron-Sequenz der funktionellen Domänen ist farbig markiert (CDC48 grün, flexibler Linker L1 grau, erste AAA-ATPase Domäne D1 hellblau, Linker Region L2 grau, zweite AAA-ATPase Domäne D2 dunkelblau und die C-terminale Domäne rot). Modifiziert nach (Krause 2011).

Im Gegensatz zu *GNE* gibt es beim *VCP*-Gen *hotspot* Regionen, in denen sich die meisten Mutationen finden lassen. Dies umfasst die Exons 3, 5, 6 und 10. Am häufigsten werden auf Position R155 Mutationen beschrieben.

Das bei Säugern auftretende *VCP* (p97) ist ein Mitglied der Typ 2 AAA (*ATPase associated with a variety of cellular activities*) ATPase-Familie, einer Gruppe evolutionär hochkonservierter Proteine (Confalonieri et al. 1994; Feiler et al. 1995; Pinter et al. 1998). *VCP* hat eine dreigeteilte Struktur bestehend aus einer N-Domäne (*CDC48*), die Kofaktoren und Polyubiquitin bindet und zwei zentralen D-Domänen (D1 und D2), die ATP binden und hydrolysieren (DeLaBarre and Brunger 2003; Wehl et al. 2009). Das fertige Protein formiert sich zu einem funktionalen Hexamer mit einer zentralen Pore, die durch die D-Domänen, umgeben von den N-Domänen, gebildet wird (Abb. 13). Dabei ist die D1-Domäne hauptsächlich für die Hexamerbildung verantwortlich, die D2-Domäne für die ATPase-Aktivität (Zhang et al. 2000; Hubbers et al. 2007).

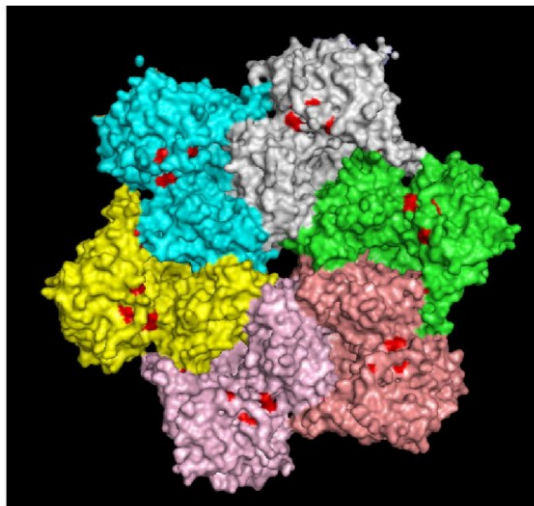


Abb. 13 Darstellung der Hexamerkonfiguration von VCP. Jedes Monomer ist unterschiedlich eingefärbt. Die roten Markierungen bezeichnen Stellen bekannter Mutationen (ohne Berücksichtigung der Mutation D120del). Entnommen aus (Wehl et al. 2009).

II) PROBLEMSTELLUNG / ZIELSETZUNG

Bei den Einschlusskörpermyopathien handelt es sich um sehr seltene Erkrankungen. In der klinischen Praxis stellt die Diagnosestellung Ärzte oft vor eine schwierige Herausforderung. Zum einen ist dieses Krankheitsbild relativ unbekannt und die Expertise auf wenige Zentren beschränkt, zum anderen erschwert auch das heterogene klinische Bild und das individuell unterschiedliche Verlaufsbild die Diagnosefindung. Für die Patienten bedeutet dies oft einen langen Leidensweg mit vielen Arztwechseln, bis ihre Erkrankung einen Namen bekommt, der den Weg für eine Therapie bereitet.

Bis heute sind ca. 60 Mutationen im *GNE*-Gen und 14 im *VCP*-Gen bekannt. Die Funktionen dieser Proteine im Organismus sind mannigfaltig und der Einfluss auf die Pathogenese bisher ungeklärt, weshalb bis heute auch kausale Therapieansätze fehlen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll die Verknüpfung zwischen der klinischen Diagnostik und den molekularbiologischen Untersuchungstechniken zur Charakterisierung von Patienten mit hereditärer IBM verbessert werden durch Etablierung neuer und Optimierung bestehender Methoden sowie ein Zusammenhang mit zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen analysiert werden.

Dazu sollen im Rahmen dieser Arbeit bei Patienten, bei denen der Verdacht auf eine hIBM bzw. GNE-Myopathie oder eine IBMPFD besteht, die für diese Erkrankungen bekannten Kandidatengene *GNE* und *VCP* mittels PCR und direkter Sequenzierung auf krankheitsrelevante Mutationen untersucht werden. Diese Art des Mutationsscreenings soll künftig für den Patienten belastende, invasive Untersuchungsmethoden wie Muskelbiopsien ablösen.

Ein weiteres Ziel ist die erweiterte genotypische, phänotypische und molekulare Charakterisierung der Mutationen, die zu diesen Krankheitsbildern führen.

Insbesondere bei der IBMPFD ist die Pathophysiologie bisher weitgehend unklar. Zur Funktion des *VCP*-Gens gibt es sehr viele verschiedene Ansätze. Es ist bekannt, dass Mutationen in diesem Gen u. a. zu Störungen der Apoptose und der Autophagie sowie zu Veränderungen der Myosinfibrillenbildung führen. Ziel dieser Arbeit ist es, zu überprüfen, ob dieser Einfluss von allen bekannten Mutationen ausgeht. Insbesondere die bisher noch nicht beschriebene und charakterisierte Mutation D120del soll neben der phänotypischen Beschreibung durch funktionelle Zellkulturstudien hinsichtlich ihrer Pathogenität untersucht werden. Dazu sollen in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Treten bei den untersuchten IBMPFD-Patienten morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen im Skelettmuskel auf? Unterscheiden sich diese Veränderungen von denen, die bei der GNE-Myopathie beobachtet wurden? Bestehen bei der Patientin mit der neu identifizierten Mutation D120del ähnliche Veränderungen, und wo liegen eventuelle Unterschiede?

- Wie verhält sich der klinische Verlauf der Patientin mit der neu identifizierten Mutation D120del im Vergleich zu bekannten klinischen Verlaufsformen einer IBMPFD?
- Kann ein Zellkulturmodell der IBMPFD und der neu beschriebenen Mutation D120del etabliert werden? Ist der experimentell beobachtete Phänotyp analog zu dem in IBMPFD-Patientengewebe?
- Beeinträchtigt eine Mutation in *VCP* bekannte Stoffwechsel-Signalwege? Inwiefern sind zelleigene Abbauwege (v. a. Makroautophagie) betroffen?
- Eignen sich durch virale Transdifferenzierung aus Fibroblasten entstandene Myoblasten als *in-vitro*-Untersuchungsmaterial? Kann eine solche Technologie eine Muskelbiopsie in der Diagnostik ersetzen?

Diese Fragen sollen mit Hilfe histologischer, zellbiologischer und molekularbiologischer Methoden sowie in *in silico*-Studien untersucht werden.

Auch wenn die untersuchten Erkrankungen bis heute nicht kausal therapiert werden können, darf der Nutzen einer genauen Einteilung und Benennung der eigenen Erkrankung für den Patienten nicht unterschätzt werden. Durch die Klärung genetischer Grundlagen in dieser Arbeit und die Zusammenschau klinischer Manifestationen mit genetischen Veränderungen, soll die Grundlage für eine therapieorientierte Forschung gelegt werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Aussagesicherheit über die Prognose und den Verlauf der Erkrankung zu optimieren, sodass den Patienten eine fundierte klinische und genetische Beratung angeboten werden kann. Durch den frühzeitigen Beginn supportiver Therapien kann die Lebensqualität verbessert werden, aber auch die Lebenserwartung kann z. B. durch eine rechtzeitige kardiale Diagnostik und kardioprotektive Therapie positiv beeinflusst werden.

III) MATERIAL UND METHODEN

1. Patienten und Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 26 Patienten mit bioptisch gesicherter Einschlusskörpermyopathie untersucht. Bei 13 Patienten wurden Mutationen oder genetische Veränderungen im *GNE*-Gen und bei 13 Patienten im *VCP*-Gen untersucht.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte nach ausführlicher klinischer Untersuchung, elektrophysiologischer Diagnostik und invasiver Diagnostik mittels Muskelbiopsie durch Herrn Prof. Dr. H. Lochmüller, Frau Prof. Dr. med. M. Walter und Frau PD Dr. med. Dr. phil. S. Krause am Friedrich-Baur-Institut der LMU München.

Zusätzliches Patientenmaterial (EDTA-Vollblut, Muskelgewebe, genomische DNA) wurde von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Patienten wurde auch Material in Form von EDTA-Vollblut oder genomischer DNA von Angehörigen in die weiteren Untersuchungen einbezogen, sofern bei den untersuchten Patienten eine Mutation gefunden wurde. DNA aus EDTA-Vollblut von gesunden freiwilligen Personen diente als Kontrolle.

Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach Aufklärung und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. deren Familienangehörigen. Ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München zu den durchgeführten Untersuchungen liegt vor (Projektnummer 084/00).

2. Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien entsprechen höchsten Reinheitsanforderungen und stammen, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland).

3. Molekulargenetische Methoden

3.1. DNA-EXTRAKTION

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte aus peripher entnommenem venösem EDTA-Vollblut mit Hilfe des Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Deutschland), entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.2. RNA-EXTRAKTION AUS MUSKELGEWEBE UND CDNA - SYNTHESE

3.2.1. RNA-Extraktion aus Muskelgewebe

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von RNA wurden sehr kleine Mengen Patientenmuskelbiopsat (wenige Muskelgefrierschnitte) verwendet. Die Extraktionsmethode mit TRIzol Reagent (Invitrogen) kam wie folgt zur Anwendung:

1. Homogenisierung der Muskelschnitte in 800 µl TRIzol Reagent für 5 min auf 15-30°C
2. Um die Viskosität der genomischen DNA zu reduzieren wurde die Lösung zweimal durch eine 27G-Kanüle aspiriert.
3. Zugabe von 160ml Chloroform, gefolgt von 15 sec kräftigem Schütteln
4. Zentrifugation: ca. 12.000 x g, 15 min, 4°C
5. Die wässrige Phase wurde abpipettiert, hierin ist die DNA und RNA gelöst
6. Zur Optimierung beim Ausfällen der geringen RNA-Menge wurde 5-10 µg Glycogen (Invitrogen) zugegeben und mit 400µl Isopropylalkohol vermischt.
7. Inkubation auf Raumtemperatur (15-20°C) für 10 min
8. Zentrifugation: ca. 12.000 x g, 10 min, 4°C
9. Vorsichtige Abnahme des Überstandes
10. Das verbleibende RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol (800 µl) gewaschen
11. Zentrifugation: ca. 7.500 x g, 5 min, 4°C
12. Abnahme des Überstandes und kurze Trocknung des Pellets
13. In 18 µl dH₂O aufnehmen

3.2.2. Synthese von cDNA mit Reverser Transkriptase und PCR-Amplifikation (RT-PCR)

Zur Analyse der translatierten DNA wurde aus RNA mit Hilfe einer Reverse-Transkriptase-Reaktion cDNA synthetisiert. Zur Anwendung kam dabei folgendes Protokoll:

1. 1,5 µg RNA (aus Muskelgewebe) mit 1 µl oligo-dT-Primer (Ansatz 1) oder 1 µl random-Hexamer-Primer (Ansatz 2) und dH₂O zu einem Endvolumen von 10 µl geben
2. Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur bei 70°C für 5 min.
3. Abkühlung im Eisbad (4°C) und kurze Zentrifugation in der gekühlten Zentrifuge
4. Zugabe von (in dieser Reihenfolge):
 - 5 µl 5x M-MuLV-Buffer (Fermentas)
 - 6,5 µl 2,5mM dNTPs
 - 1µl RNase-Inhibitor (RNAsin, Promega)
5. Primer-Annealing bei 37°C für 5 min (Ansatz 1) bzw. bei 25°C für 5 min (Ansatz 2)
6. Zugabe der Reversen Transkriptase M-MuLV-RT (50 units)
7. Synthese des cDNA-Gegenstrangs:
 - Ansatz 1: Inkubation auf 37°C >60 min

- Ansatz 2: Inkubation auf 25°C für 10 min (stabile Bindung der kurzen random-Hexamere), danach 37°C >60 min
8. Denaturierung bei 70°C für 10 min: Inaktivierung der RT und Isolierung der cDNA-Einzelstränge

Danach schließt sich eine PCR-Amplifikation der cDNA an (s. unten).

3.3. POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

3.3.1. Prinzip der PCR

Die von Mullis entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR) dient der selektiven Amplifikation definierter DNA-Abschnitte *in vitro* (Mullis, 1990). Die Methode basiert auf 3 Reaktionsschritten: der Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch Hitze, der Anlagerung von Oligonukleotiden („Annealing“) und der enzymatischen Verlängerung der DNA-Einzelstränge („Extension“). Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklusses erfolgt eine exponentielle Vermehrung des zu untersuchenden DNA-Abschnittes.

Im ersten Schritt, der Hitzedenaturierung, wird der Doppelstrang der Matrizen-DNA in die beiden Einzelstränge aufgetrennt, um den Primern die Anlagerung, d. h. die Hybridisierung an ihre komplementäre Sequenz zu ermöglichen („Annealing“). Als Primer werden dafür zwei Oligonukleotide verwendet, die den zu untersuchenden DNA-Bereich am 3'- und 5'-Ende flankieren. Mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) erfolgt anschließend die DNA-Synthese des gewünschten Abschnittes („Extension“) in Anwesenheit von dNTPs.

3.3.2. Reaktionsbedingungen

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer (ThermoPol Buffer; New England Biolabs (NEB, Frankfurt, Deutschland)
- 5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 5 µl dNTP-Mix (2,5 mM, Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland): 0,25 mM je dNTP
- 1 µl Taq DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)
- 1 µl sense Primer (50 pmol)
- 1 µl antisense Primer (50 pmol)
- 2 µl genomische DNA
- 30 µl H₂O ad 50 µl Gesamtvolumen

Die Amplifikationseffizienz der PCR wurde teilweise durch Zugabe von Mg^{2+} in unterschiedlicher Konzentration optimiert. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf) durchgeführt.

Ein typisches PCR Programm zur Amplifikation des *GNE*- und *VCP*-Gens umfasst:

1. Denaturierung der DNA	95°C: 60 sec	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	94°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	55°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

3.3.3. Optimierungen

Um bei geringen Mengen an Ausgangs-DNA oder schwierigen Bedingungen (z. B. GC-reicher DNA-Abschnitt) ausreichende Mengen PCR-Produkt zu erhalten, wurde das *HotStarTaq Plus*-DNA-Polymerase-Kit verwendet (Qiagen, Hilden, Cat. No. 203601).

Ein typischer PCR-Ansatz mit diesem Kit enthält in 50 μ l Reaktionsvolumen:

- 5 μ l Coralload PCR Buffer
- 5 μ l dNTP-Mix (2,5 mM, Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland): 0,25 mM je dNTP
- 10 μ l Qsolution
- 0,25 μ l HotStarTaq Plus-DNA-Polymerase
- 1 μ l sense primer (50 pmol)
- 1 μ l antisense primer (50 pmol)
- 2 μ l genomische DNA
- 25,75 μ l H_2O ad 50 μ l Gesamtvolumen

Ein typisches PCR Programm zur Amplifikation mit dem Kit umfasst:

1. Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C: 5 min	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	94°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	48°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

3.3.4. cDNA-PCR

Zur Amplifikation von cDNA wurde wieder das *HotStarTaq Plus*-DNA-Polymerase-Kit verwendet (Qiagen, Hilden, Cat. No. 203601).

Ein typischer PCR-Ansatz mit diesem Kit enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

- 5 µl Coraload PCR Buffer
- 5 µl dNTP-Mix (2,5 mM, Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland): 0,25 mM je dNTP
- 10 µl Qsolution
- 0,25 µl HotStarTaq Plus-DNA-Polymerase
- 1 µl sense primer (50 pmol)
- 1 µl antisense primer (50 pmol)
- 2 µl cDNA
- H₂O ad 50 µl Gesamtvolumen

Ein typisches PCR Programm zur Amplifikation von cDNA mit dem Kit umfasst:

Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C: 5 min	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	94°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	48°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

3.3.5. PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden entworfen, basierend auf in der GenBank-Datenbank veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi bzw. Acc. no. für *GNE* AL158830 und für *VCP* AC004472), mit Hilfe des Programms Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) optimiert und bei Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

GNE Primer

Acc.No. AL158830, gi 11121380, Chr. 9p12-p11

Primernamen	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
A1s	5'-GCCTATTGGTGACTGCTCCGTGGCAGCTAA-3'	66.0	Exon 1	149
A1a	5'-TGAGAAGCAAGTAGCAGCCACAGAATGACT-3'	62.0		
2s	5'-GTGGTTAAGGACTTGAAACT-3'	54.0	Exon 2	449
2a	5'-GTGACTACTCTAAGGCCAC-3'	56.7		
3s	5'-CTTCAGAGTTGGTGTAGATTG-3'	58.0	Exon 3	618
3a	5'-CCAAAAGGATTGAAATAGACGG-3'	58.0		
4s	5'-GCACAGACTTAGAGTCTTGC-3'	58.0	Exon 4	335
4a	5'-GAGCAAGATAGGAAGGCAG-3'	57.0		
5s	5'-GTGGGCTATACTTGCCAATG-3'	58.1	Exon 5	357
5a	5'-GCATACCTTATAACAACCTCACG-3'	58.0		
6s	5'-GGTCTAATTATGAGCATAGTAC-3'	54.9	Exon 6	269
6a	5'-GGATGATTAACAGTGATTGTAG-3'	58.0		
7s	5'-CTGAAGTCTCAGTTTCCATTAC-3'	58.0	Exon 7	396
7a	5'-GTTTCTAGTCTTACCTCCAAC-3'	62.0		
8s	5'-CCTATAGCAGTGTCTAATTTGTC-3'	59.0	Exon 8	308
8a	5'-GCTCAGGCATGCATCACAAG-3'	62.0		
9s	5'-CGTTTGTCTTAGGAGATCTGG-3'	56.6	Exon 9	424
9a	5'-GCAGAGTTGTAACCACCTGAC-3'	57.3		
10s	5'-CTCACATGCCAAAGCTCTGC-3'	62.1	Exon 10	372
10a	5'-GGCTTCAGTGTTTCAGCTGTC-3'	60.0		
11s	5'-GTGAAAAGAAAACACCGTCTTCC-3'	61.2	Exon 11	344
11a	5'-GACACTGCAAAGCACCTGTC-3'	59.5		
12s	5'-CTTTAACATTTCTGCTGCTGGCTC-3'	64.0	Exon 12	461
12a	5'-ATTTCTCTGCCAAAGTCACCTGC-3'	63.0		

Tab. 1 Sequenzen der *GNE*-Primer

VCP Primer

Acc. No. AC004472, gi 2984582, Chr. 9p13-p12

Primernamen	Primersequenz	T _m (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
1s	5'-ATTGGCTGTGATCTGCGGGTTGC-3'	66.0	Exon 1	706
1a	5'-TCCGTTCTAAGGGAGCCAATCG-3'	64.0		
2s	5'-GGGACAGCTTCATCTATTCACCTGTTTC-3'	62.0	Exon 2	441
2a	5'-GTCACCTCGGAACAACCTGCAATTCATC-3'	68.0		
3s	5'-ACAGTGTGGTGTCTTGTCCAGGTAA-3'	60.5	Exon 3	473
3a	5'-GGTCTGCCTGTAATACATGGGTCTCG-3'	68.0		
4s	5'-TCCACCCTGTTCTCTCTCTCTTC-3'	69.0	Exon 4	360
4a	5'-GATAAAGATGTTCCAAGGTTTATTCC-3'	64.0		
5s	5'-GCCGAGCACCCAGTCCTGACAGTTAC-3'	71.7	Exon 5	324
5a	5'-AGGGCACTATCTAATGAGCTTGGC-3'	64.0		
6s	5'-GTGGAATGATTTAGAGAAACTCAGC-3'	63.3	Exon 6	302
6a	5'-CATGCATGAAAACAGTCCCAGG-3'	62.0		
7s	5'-AAGTTGCAATCATAAATGTTGCC-3'	58.0	Exon 7	401
7a	5'-ATAAGTGCTCCAGCTCATAAGCC-3'	63.0		
8s	5'-TTCTCTCCAGCCTTGCTGGTGGCTGT-3'	71.0	Exon 8	535
8a	5'-AAATCGCCGTAGAGCTGGGTCAATGC-3'	66.4		
9s	5'-CAACGTTTCGTAAAGCCTTTGAGGAGGCT-3'	66.6	Exon 9	644
9a	5'-TCAAAGCGACCTGTGGGACAGTACACAA-3'	66.6		
10s	5'-TAATCCTCTTGAAGCCCTTCACAGTGATTG-3'	60.0	Exon 10	596
10a	5'-TTGGGACCTAGAAATAAGGCTGCTCCAAC-3'	70.0		
11-12s	5'-CAGCCTTATTTCTAGGTCCCAAGTC-3'	62.6	Exon 11+12	656
11-12a	5'-TGCAGCAAATGTGTTGACACCCTG-3'	69.4		
13s	5'-ATCTGATACCATTGGGTACACC-3'	57.7	Exon 13	482
13a	5'-AATAACACTAGGTCTCTCAGACCTC-3'	56.5		
14s	5'-AATTCTACCTTCCTTTAGACCAAC-3'	63.0	Exon 14	408
14a	5'-GCTATTCTTTGATGAGCTGGATTC-3'	57.0		
15s	5'-CTGGTACGGAGTGCTCTTTAGTTTC-3'	66.0	Exon 15	476
15a	5'-TTCCAACAGCTTCTACTCTCAACTC-3'	64.0		
16-17s	5'-AGGAGACCAATAAACTGCAGTAATG-3'	63.0	Exon 16+17	865
16-17a	5'-AGCATTGAGTCAAGTGCAGATGC-3'	63.0		

Tab. 2 Sequenzen der VCP-Primer

3.4. AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE IN DER AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese erlaubt, unterschiedliche DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld zu trennen.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen. Abhängig von der Länge der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1-4% gewählt. Die Agarose (Invitrogen, Darmstadt) wurde je nach gewünschter Konzentration (1-4%) in TAE-Puffer gegeben und unter Kochen gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µl/ml, Stammlösung 10 mg/ml) wurde die Lösung in eine Gelkammer eingegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur, welche mit 1xTAE-Puffer gefüllt war, eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer [10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenol-Blau, 0,03% Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60% Glycerin) versetzt und in die Tasche hineinpipetiert. Eine separate Tasche wurde jeweils mit einem Größenmarker (10 µl 100 bp Leiter, MBI Fermentas, Leon-Rot) gefüllt, der das Ablesen der Fragmentlänge erlaubte.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 120 V über ungefähr 45 Minuten.

3.5. GELEXTRAKTION

Die PCR-Fragmentbanden wurden zunächst aus dem Gel unter UV-Lichtkontrolle mit einem Skalpell herausgeschnitten. Danach erfolgte die Gelextraktion mit Nucleic Acid Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers.

3.6. SEQUENZANALYSE

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

Die Sequenzen wurden anschließend mit den entsprechenden Datenbanksequenzen (GenBank-Zugangsnummer für *VCP* gi 2984582 und *GNE* gi 11121380) online über www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST verglichen und auf Mutationen untersucht.

3.7. KLONIERUNGEN

3.7.1. Einführen der Mutation *VCP* D120del in den Vektor pEF-DEST51

Um die Auswirkungen der bei der Patientin gefundenen Mutation *VCP* D120del *in vitro* zu untersuchen musste diese zunächst in die Wildtyp-Sequenz eingeführt werden. Dazu wurde im ersten Schritt die kodierende Sequenz des humanen *VCP*-Gens in den Vektor pEF-DEST51 (Catalog no. 12285-011, Invitrogen, Darmstadt) kloniert. Der so entstandene Vektor mit der Wildtyp-*VCP*-Sequenz trägt den Namen pTH331. pTH331 sowie 2 weitere Vektoren (pTH332 und pTH333) wurden uns freundlicherweise von Prof. Thorsten Hoppe, Universität Köln überlassen. pTH332 enthält die Mutation R95G und pTH333 die Mutation R155H, die zusammen die häufigsten Mutationen im *VCP*-Gen abdecken.

Um nun in den bestehenden Wildtyp-Vektor die Mutation D120del mit einer DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (proof-reading) (Vent DNA Polymerase, NEB, Frankfurt a. M.) mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese einzuführen, wurde zunächst eine PCR (PCR1) mit dem Mismatch Primer, der an Position D120 eine Lücke von 3 Basen aufweist und dem Primer KR334_1257s am 3'-Ende durchgeführt. Das so entstandene PCR-Produkt (PCR 1 Produkt) enthält an dieser Stelle schon die gewünschte Mutation. Da es allerdings noch nicht die benötigte Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BspEI* enthält, folgte nun im zweiten Schritt eine weitere PCR (PCR2). Dafür wurden die Primer 750s und 1033a verwendet. Das so entstandene Produkt (PCR 2 Produkt) ist in seinen ersten 22 Basen komplementär zu den letzten 22 Basen des PCR-Produktes 1, wodurch die Hybridbildung in der folgenden PCR (PCR3) bereits als Ansatzpunkt für die Polymerase dient und keine Primer zum Reaktionsansatz gegeben werden müssen. Das so entstandene Produkt (PCR 3 Produkt) kann somit ohne weitere Aufreinigung nach Zugabe der Primer KR334_12557s und 1033a im normalen PCR-Ansatz in ausreichender Menge durch Reamplifikation synthetisiert werden (PCR 4).

Das so entstandene Produkt (PCR 4 Produkt) enthält einen Ausschnitt des *VCP*-Gens mit der Mutation D120del und den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *BspEI*.

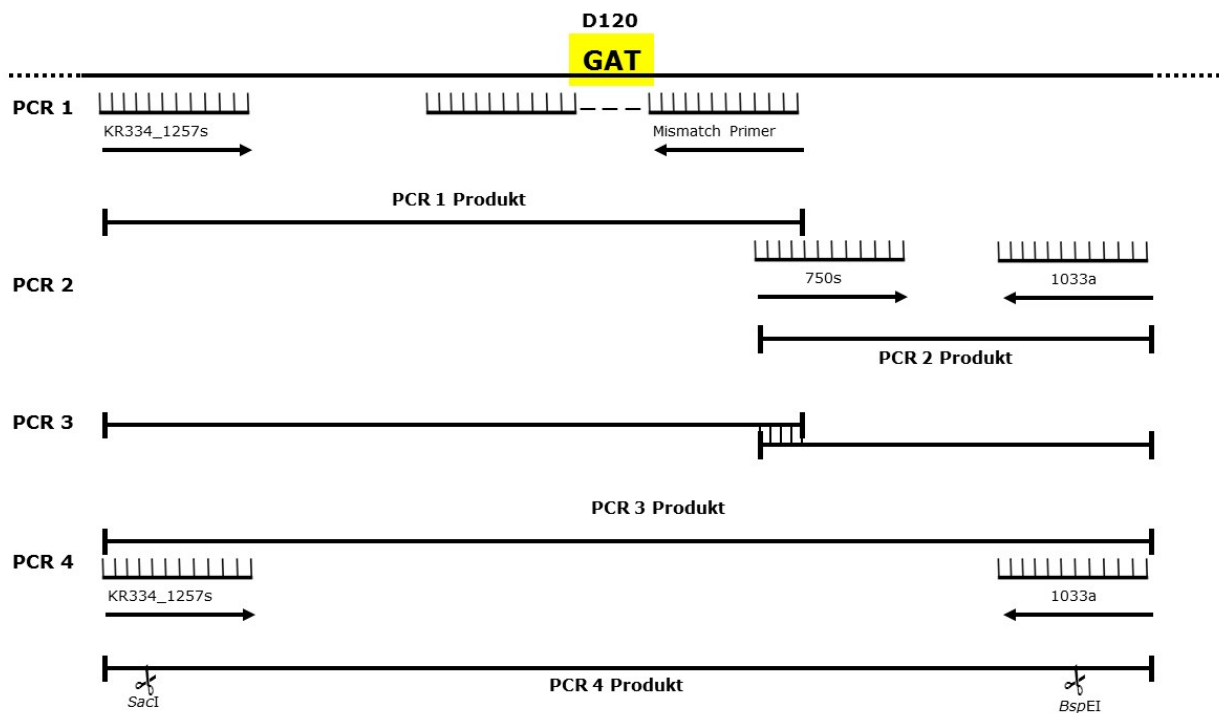


Abb. 14 Strategieschema der ortsgerichteten Mutagenese in 4 PCR-Amplifikationsschritten

Im Folgenden wurde das Produkt in einen TA-Vektor kloniert (TA-Cloning-Kit, Invitrogen, Darmstadt), um ausreichend Material für die nachfolgende Klonierung zu erhalten. Da die Vent-Polymerase eine 3'-Exonuklease-Aktivität besitzt und somit am 3'-Ende unseres Inserts kein Adenosin-Überhang vorhanden war, musste zunächst mit Hilfe der Taq-Polymerase ein Adenosinrest angehängt werden. Dazu wurde im ersten Schritt ein Ansatz aus 25 µl PCR-Produkt, 5 µl 10x Thermo-Pol Puffer, 1 µl Taq DNA Polymerase und 9 µl dH₂O 10 min auf 72°C inkubiert. Die DNA wurde über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und konnte nun in den TA-Vektor laut Herstellerangaben kloniert werden.

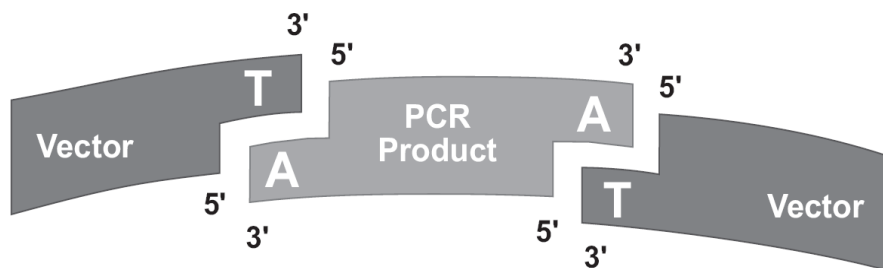


Abb. 15 Schema des TA-Vektors

Das Ligationsprodukt wurde daraufhin in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms DH5α unter Verwendung der Hitzeschock-Methode (s. unten) transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Darüber hinaus wurde X-Gal- und IPTG-Lösung auf die Platten gegeben, um die Kulturen später selektionieren zu können. Nach Inkubation auf 37°C über Nacht konnten am nächsten Tag die weißen Kolonien gepickt werden und in Vorkulturen überimpft werden. Aus diesen wurde am nächsten Tag

über einen Mini-Prep (Qiagen, Hilden) die Plasmid-DNA gewonnen und per Restriktionsverdau mit den Enzymen *SacI* und *BspEI* geschnitten. Ebenso wurde mit dem Plasmid pTH331 (*VCP*-Wildtyp) ein Verdau mit den gleichen Enzymen durchgeführt. Beide Ansätze wurden über ein Agarose-Gel aufgereinigt und analog zur DNA-Extraktion ausgeschnitten, wobei von dem Verdau pTH331 das große Fragment (Vektor-Backbone) und von dem Verdau des TA-Vektors (*VCP*-Fragment mit Mutation D120del) das kleine Fragment aus dem Gel verwendet wurde.

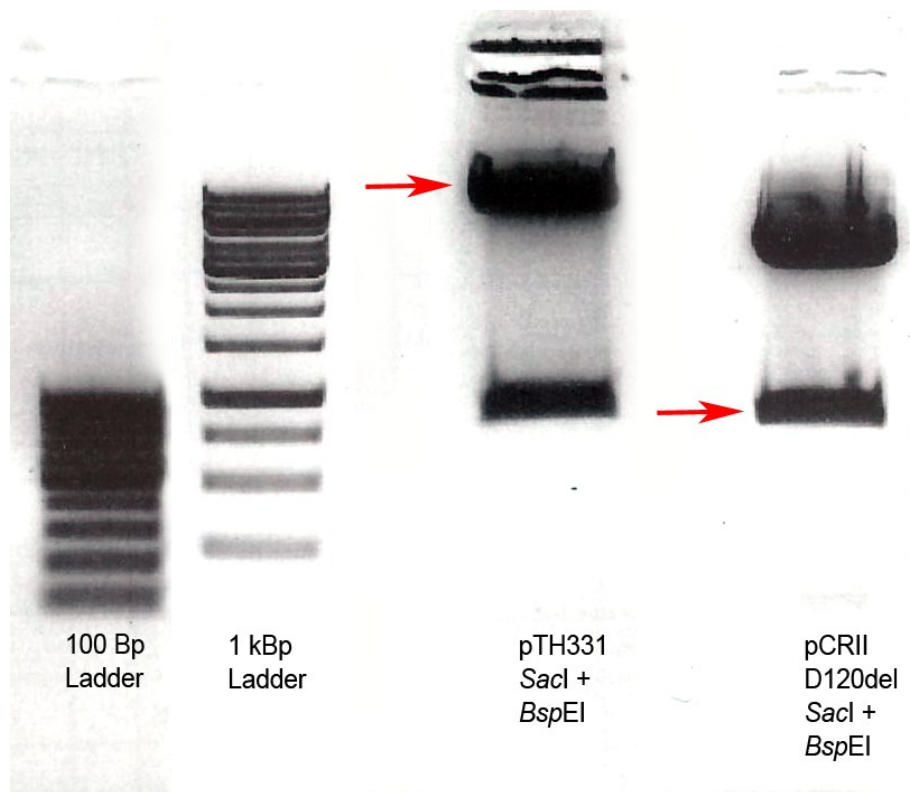


Abb. 16 Agarosegel zum Auftrennen der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau

Nach Ligation der Fragmente konnte der nun fertige Vektor pKR334 (*VCP* D120del) in kompetente DH5 α *E. coli* transformiert werden, die über Nacht auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin auf 37°C inkubiert wurden. Die Selektion der Kolonien am nächsten Tag erfolgte über die Kolonie-PCR (s. 3.7.3). Aus den positiven Kolonien wurden Vorkulturen angelegt aus denen am Folgetag unter Verwendung des Mini-Prep-Kits (Qiagen) die Plasmid-DNA extrahiert wurde. Zur Verifikation der Plasmid-DNA wurde ein Kurzverdau mit dem Enzym *XcmI* angesetzt und die entstandenen Fragmentlängen im Agarosegel beurteilt.

Zur Kontrolle, ob die jeweiligen Vorkulturen auch den Klon enthalten, der das Plasmid enthält, wurde aus jeder Kultur eine kleine Probe für die Kolonie-PCR (s. 3.7.3) asserviert. Mit einer der korrekten Vorkulturen wurde zuletzt ein Plasmid-Maxi-Prep durchgeführt um größere Plasmidmengen für die folgenden Experimente zu gewinnen.

3.7.2. Sequenzen der Mutagenese-Primer

Name	Länge (bp)	Tm (°C)	%GC	Sequenz
KR334_1257s	18	62	56	5'-TGC GTGAGCGGAAAGATG-3'
D120del (Mismatch Primer)	48	61	50	5'-CCAGTAATGCCTTCCACTGTGTC---AATGGGCAGCACATGGATACGTTTG-3'
c750s	22	60	50	5'-GACACAGTGAAGGCATTACTG-3'
c1033s	19	60	58	5'-TGAGCTAGCTGCTTCCTGC-3'

Tab. 3 Sequenzen der Mutagenese-Primer

3.7.3. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein elegantes und schnelles Hilfsmittel, um festzustellen, ob die jeweilige Vorkultur auch wirklich den Klon enthält, der amplifiziert werden soll. Dazu gibt man zum jeweiligen PCR-Ansatz 2 µl der Bakteriensuspension aus der Vorkultur. Als Primer kamen ausgewählte *VCP*-cDNA-Primer zum Einsatz. Nach Ablauf der normalen PCR (s. PCR-Programm Kolonie-PCR), wurden die verschiedenen Ansätze auf ein Agarose-Gel geladen. Anhand der Basenlänge des zu erwartenden PCR-Produkts kann darauf rückgeschlossen werden, ob sich die betreffende *VCP*-cDNA in den Bakterien befunden hat. Dies ist dann ein deutlicher Hinweis darauf, ob die Transformation erfolgreich war.

Ein typischer PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

dH ₂ O	35 µl
10xThermoPol Puffer	5 µl
dNTPs	5 µl
Vorwärts-Primer	1 µl
Reverser Primer	1 µl
Bakteriensuspension	2 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Ein typisches PCR Programm zur Amplifikation während der Kolonie-PCR umfasst:

1. Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase	95°C: 6 min	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	95°C: 30 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	55°C: 30 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60-180 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

3.8. LIGATION

Die Ligation von Insert und Vektor wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden dafür über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* wurde die Ligase durch Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten inaktiviert.

3.9. TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Unter Transformation versteht man das Einführen fremder Plasmid-DNA in kompetente Bakterien. Die Transformation wurde an Zellen des kompetenten *E. coli* Bakterienstammes DH5 α (Invitrogen, Darmstadt) nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Dabei wurde zunächst 1 μ l des Ligationsansatzes zusammen mit den Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin für 45 sec in einem Wasserbad (42°C) erhitzt. Zuletzt wurde die Probe 2 Minuten auf Eis abgekühlt.

3.10. BAKTERIENKULTUR

Nach der Transformation wurde der *E. coli* Bakterienstamm DH5 α (Invitrogen, Darmstadt) auf LB-Platten kultiviert. Aufgrund des Resistenzgens des verwendeten Plasmids wurden LB-Platten verwendet, die das Antibiotikum Ampicillin enthalten (Endkonzentration 100 μ g/ml). Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in Röhrchen mit 4 ml LB-Medium und 4 μ l Ampicillin überimpft. Diese Vorkulturen wurden über Nacht auf einem Schüttler auf 37°C inkubiert. Nach Überprüfung des Klons in der Kolonie-PCR wurden, falls zur Plasmid-DNA-Extraktion eine Maxiprep notwendig war, ausgewählte Vorkulturen in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium und 250 μ l Ampicillin überimpft und über Nacht auf 37°C im Schüttler inkubiert.

3.11. EXTRAKTION VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde für kleinere Mengen mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, 4 ml Bakterienkultur), für größere Mengen mit Hilfe des NucleoBond PC 500 Maxiprep Kits (Macherey-Nagel, Düren, 200 ml Bakterienkultur) anhand der Herstellerangaben durchgeführt.

3.12. BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) bestimmt. Dazu wurden 1,5 μ l der unverdünnten Probe auf die Detektiereinheit des Gerätes gegeben. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen), wobei der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ Auskunft über die Reinheit der Probe gibt. Der Nullabgleich erfolgte mit dem Lösungsmittel der Nukleinsäureprobe (Elutionbuffer NE, Macherey-Nagel, Düren).

4. Zellkultur

4.1. KULTIVIERUNG DER ZELLEN

HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) (C 1974; Lucey et al. 2009) und C2C12 (Mausmyoblasten) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), angereichert mit 2 mmol/L L-Glutamin, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (beide PAA Laboratories), PMI28-Zellen (Mausmyoblasten) in Ham's F10 Medium (PAA Laboratories) nach Zugabe von 2 mmol/l L-Glutamin, 20% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (beide PAA Laboratories) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wurden die Zellen in DMEM mit 2% Pferdeserum (HS), 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert.

4.2. TRANSFEKTION

Alle Zelllinien wurden zur Transfektion in 6- oder 12-Well Kulturschalen überführt und nach 12 Stunden mit dem Polyplus jetPEI Transfektions-Kit (Biomol, Hamburg) laut den Angaben des Herstellers transfiziert. 28 bis 36 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zur Proteingewinnung geerntet bzw. für die Mikroskopie fixiert.

5. Herstellung der Proteinextrakte

Für die Immunodetektion (Westernblot) wurden die Zellen 48 bis 72 Stunden nach Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers (Rubber Policeman) aus der Kulturschale gewonnen, in PBS gewaschen und abzentrifugiert (20.000 x g, 5 min., 4°C). Das Zellpellet wurde unter Verwendung eines SDS-Lyse-Puffers lysiert (10 mM Tris-Cl, pH 7,4, 1% SDS) und homogenisiert. Das so entstandene Lysat wurde wiederum abzentrifugiert und der Überstand für die Westernblotexperimente bei -80°C asserviert.

6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (Western Blot)

Nach Aufschluss der Zellen wurde zur Analyse der Zellproteine eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Hierbei werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS geelektrophoretisch aufgetrennt.

Um eine bessere Auflösung im Bereich der kleinen Proteine (1-100 kDa) zu erhalten, wurden zudem Gele nach Schägger und Jagow (Schaggar and von Jagow 1987) verwendet.

6.1. HERSTELLUNG DES LAEMMLI-GELS

Zur Herstellung des Gels werden zwei verschiedene Ansätze benötigt, da sich das Gel in ein Sammelgel (stacking gel) und ein Trenngel (separating gel) unterteilt, die sich hauptsächlich in der Konzentration des Polyacrylamids und im pH-Wert unterscheiden. Das Sammelgel befindet sich im oberen Bereich und dient zur Formierung einer scharfen Linie auf der Laufstrecke bis zum Trenngel, um eine homogene Trennung der Proteine zu gewährleisten. Ammoniumpersulfat (APS) wird erst ganz am Ende hinzugegeben um die Polymerisierungsreaktion zu starten. Die Gele wurden nach den Angaben in der Literatur und den Herstellerangaben (BioRad) in Gelapparaturen gegossen.

6.2. HERSTELLUNG DES SCHÄGGER UND JAGOW-GELS

Die Herstellung unterscheidet sich geringfügig von der Herstellung der oben genannten Gele. Vor allem wird anstelle des oben verwendeten Laufpuffers eine Kombination aus Anoden- und Kathodenpuffer verwendet, die in die jeweiligen Kammern des Westernblotsystems (BioRad) gefüllt werden.

Es wurden folgende Lösungen verwendet [Nach (Schaggar and von Jagow 1987)]:

Buffer A (Stock): 3M Tris-HCl, pH 8,49 (106g Trizma, 97,7g Tris-HCl)

0,3% SDS

in 500ml H₂O gelöst

Kathodenpuffer: 0,1M Tris-HCl

0,1M Tricine

0,1% SDS

Anodenpuffer: 0,2M Tris-Cl, pH 8,5

Für die Herstellung der Gele wurden folgende Mengen eingesetzt:

Trenngel		2 Gele	Sammelgel		2 Gele
8%	Acrylamid (30%)	4,8 ml	5%	Acrylamid (30%)	3,0 ml
	Buffer A	6,0 ml		Buffer A	4,5 ml
	TEMED	24,0 µl		TEMED	45,0 µl
	APS (10%)	90,0 µl		APS (10%)	90,0 µl
	H ₂ O	7,2 ml		H ₂ O	10,5 ml
Gesamtvolumen		18,0 ml	Gesamtvolumen		18,0 ml

Das APS wird wie oben beschrieben im letzten Schritt hinzugegeben um die Polymerisierungsreaktion zu starten. Die Gele wurden nach den Angaben in der Literatur und den Herstellerangaben in Gelapparaturen (BioRad) gegossen.

6.3. GELEKTROPHORESE

Die Proteinkonzentration der Proteinproben wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Essay Kits (Bio-Rad) bestimmt. Daraufhin wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt, bei 95°C denaturiert, auf das Gel geladen und per Gelelektrophorese aufgetrennt.

6.4. WESTERN BLOTTING

Laut den Angaben des Herstellers wurden die Proteine unter Verwendung des Wetblot-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht in TBS Puffer mit 1% BSA und 5% Milchpulver bei 4°C geblockt. Der primäre Antikörper wurde am nächsten Tag für 60 min in der Blockierlösung verdünnt und bei 4°C inkubiert, gefolgt von einem 25 minütigen Waschschrift in TBS mit 0,1% Tween 20 (Pufferwechsel alle 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls 60 min in der Blockierlösung verdünnt und inkubiert und 5x5 min in TBS-T gewaschen. Zum Nachweis von spezifisch gebundenen Primärantikörpern mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“- (ECL)-Detektion, müssen Sekundärantikörper verwendet werden, an die das Enzym Peroxidase gekoppelt ist (Meerrettichperoxidase, HRP, horseradish peroxidase). Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivate) in seine oxidierte Form Perhydrol, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Detektion erfolgte mit einem ChemoCam Chemilumineszenzsystem (INTAS, Göttingen).

7. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie-Experimente wurden die Zellen auf Glas-Deckgläschen (Durchmesser 1 cm) kultiviert. Dabei wurde die gleiche Vorgehensweise wie bei den Zellen für die Westernblotexperimente gewählt. Die Transfektion wurde nach 12 Stunden Kultivierung mit Hilfe des Polyplus jetPEI Transfektions-Kits (Biomol, Hamburg) laut den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Coverslips kurz in 1x PBS-Puffer (PAA Laboratories) gewaschen, in Cytoskelett-Puffer (CSK-Puffer: 20 mM Pipes, pH 6.8; 600 mM Sucrose; 200 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 2 mM EGTA) mit 3,7% Formaldehyd (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) 15 min auf Raumtemperatur fixiert und daraufhin in CSK-Puffer mit 0,1% Triton X-100 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem kurzem Waschen in 1x PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen eine Stunde lang bei 4°C in CSK-Puffer mit 5% Pferdeserum geblockt. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in 1x PBS mit 5% Pferdeserum über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid H 33258 (40 µg/ml) angefärbt bevor die Deckgläschen mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) auf Objektträger montiert wurden und bis zur Mikroskopie lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Digitalkamera. Für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie kam ein Olympus FluoView FV1000 Confocal Microscope zum Einsatz.

8. Antikörper

Für die Westernblot- und Immunfluoreszenz-Experimente wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Maus anti-VCP monoklonal (Westernblot (WB): 1:250, Immunofluorescence (IF): 1:25; BD Biosciences, Heidelberg); LC3 Kaninchen antiserum polyklonal (WB: 1:1000; Novus, Cambridge, England); p62 Kaninchen Antiserum polyklonal (WB: 1:1000, IF: 1:500; Sigma-Aldrich, München); Maus anti-GAPDH monoklonal (WB 1:500; Millipore, Schwalbach, Germany).

Für die Westernblot-Experimente wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet (alle konjugiert mit Horseradish Peroxidase (HRP)): goat anti-rabbit HRP (Cell Signaling via New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany; 1:10000); rabbit anti-mouse HRP (Dako, Glostrup, Denmark; 1:10000).

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Isotyp-spezifische sekundäre Antikörper verwendet, jeweils konjugiert mit Alexa488 und Alexa594 (beide Invitrogen; 1:200) sowie zur Darstellung von Actinfilamenten Fluoroisothiocyanate (FITC)-gekoppeltes Phalloidin (Sigma, 1:100).

9. Transdifferenzierung von Fibroblasten mit MyoD

Der adenovirale Vektor Ad5.f50.AdApt.MyoD wurde uns im Rahmen eines „material transfer agreements“ freundlicherweise von der Firma Crucell (Leiden, Niederlande) zur Verfügung gestellt (Havenga et al. 2002). Die Fibroblasten stammen von der Patientin mit der Mutation D120del im *VCP*-Gen. Für die entsprechenden Kontrollfibroblasten wurde in unserer Datenbank eine bezüglich Alter und Geschlecht passende Probe ausgewählt.

Die Fibroblasten wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), angereichert mit 2 mmol/L L-Glutamin, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin (beide PAA Laboratories) bis zur gewünschten Dichte (ca. 80% Konfluenz) in 6-Well-Platten auf mit Laminin beschichteten Glas-Deckgläschen kultiviert. Um eine MOI (multiplicity of infection) von 50-75 zu erreichen wurden ca. $1,6 \times 10^8$ Viruspartikel pro Well eingesetzt. Der Ansatz wurde mit dem Adenovirus über Nacht bei 37°C/5% CO₂ inkubiert und am nächsten Tag zweimal mit 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen bis zur gewünschten Ausdifferenzierung (Myotubenbildung) in Differenzierungsmedium [DMEM mit 2% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin (beide PAA Laboratories)] kultiviert.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Deckgläschen nach dem Standard-Protokoll (s. oben) fixiert und permeabilisiert. Für die Färbung kamen als primäre Antikörper monoklonaler anti-Desmin (Dako, 1:50) und anti- α -Aktinin-Antikörper zum Einsatz (Piercy et al. 2007). Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst 33258.

IV) ERGEBNISSE

Mittlerweile ist bekannt, dass die beiden Erkrankungen GNE-Myopathie und IBMPFD, die in dieser Arbeit genauer untersucht werden, auf genetischen Ursachen beruhen. Für die GNE-Myopathie, früher auch als HIBM2 bezeichnet, ist das *GNE*-Gen maßgeblich, für IBMPFD das *VCP*-Gen. Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer hereditären oder bioptisch gesicherten Myopathie wurden im Friedrich-Baur-Institut München untersucht und anhand der klinischen Manifestationsmuster beurteilt. Daraufhin wurde genomische DNA aus Blutproben der Patienten von unserer Arbeitsgruppe auf Mutationen in Kandidatengen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA von 26 Patienten molekulargenetisch auf Mutationen in den Genen *VCP* oder *GNE* untersucht. Dabei konnten auch zwei in der Literatur bisher nicht vorbeschriebene Mutationen identifiziert werden, von denen eine anschließend ausführlich funktionell charakterisiert wurde. Des Weiteren wurden die gefundenen Mutationen mit dem klinischen Erscheinungsbild in Korrelation gesetzt und untereinander sowie mit den in der Literatur beschriebenen Fällen verglichen.

1. Mutationen im *GNE*-Gen

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA von 13 Patienten, bei denen der Verdacht auf eine GNE-Myopathie bestand auf Mutationen im *GNE*-Gen untersucht. Das Gen umfasst 12 Exons, wobei Exon 1 nicht kodierend ist. Alle kodierenden Exons wurden untersucht. Dabei konnten bei vier Patienten Mutationen nachgewiesen werden, drei davon sind von besonderem Interesse und werden im Folgenden vorgestellt.

1.1. PATIENT A: DIE MUTATION V331G (I200F) IM *GNE*-GEN

1.1.1. Klinische Daten

Bei diesem Patienten handelt es sich um einen irischstämmigen 47-jährigen Mann aus England, dessen DNA uns zur Analyse aus dem Newcastle upon Tyne Hospital, England übersandt wurde. Dem Patienten fiel ab Mitte 30 eine Gangstörung bei sich selbst auf. Vor allem das Heben der Beine beim Gehen mit einem schlurfenden Gang war auffällig. Des Weiteren machte sich beim Sport ein Absinken der Belastungsgrenze mit schnellerer Ermüdbarkeit bemerkbar. Hinzu kam eine Schwäche in den Armen, verbunden mit intermittierenden Muskelschmerzen. Der Patient war im Alltag allerdings noch gut belastbar und konnte seiner körperlich anstrengenden Arbeit in einem Lagerhaus weiter nachgehen.

Die körperliche Untersuchung zeigte eine Fußheberschwäche im Gangbild. Das Aufstehen aus der Hocke war erschwert. Der Zehenstand war uneingeschränkt möglich, während der Fersenstand nicht durchführbar war. Eine Scapula alata zeigte sich rechts ausgeprägter als links. Bei atrophierter Schultermuskulatur war die Kraft der oberen Extremität proximal

mehr als distal reduziert. Bei der Untersuchung der unteren Extremität zeigte sich die charakteristische Aussparung des M. quadriceps, während die Knieflexoren von der Muskelschwäche betroffen waren (Kraftgrad rechts 2-3/5, links 3/5). Auch weiter distal zeigte sich eine ausgeprägte Muskelschwäche.

Familienanamnestisch bestanden bei der etwas jüngeren Schwester seit ihrem 30. Lebensjahr ähnliche Symptome, sodass hier von einer familiären Häufung ausgegangen werden kann. Klinische Untersuchungsbefunde lagen nicht vor.

Insgesamt ist der klinische Untersuchungsbefund des beschriebenen Patienten mit dem Bild einer GNE-Myopathie vereinbar.

1.1.2. Molekulargenetische Untersuchung

Aufgrund der klinischen Symptomatik, die wegweisend für eine GNE-Myopathie war, wurde primär der kodierende Bereich des *GNE*-Gens sequenziert. Dabei wurde in Exon 6 ein heterozygoter Basenaustausch (c.1085T>G) identifiziert. Diese Veränderung in der Sequenz führt zu dem Aminosäureaustausch p.V331G in der Kinase-Domäne des Enzyms. An gleicher Position haben bereits Nishino et al. eine Mutation beschrieben (c.1085T>C), die jedoch zu einem Aminosäureaustausch p.V331A führt. (Nishino et al. 2002). Bei den durchgeführten Normalkontrollen (insgesamt n>50) fand sich an Position c.1085 keine Mutation. Somit kann hier eine unseres Wissens in der Literatur bisher nicht vorbeschriebene Mutation im *GNE*-Gen gezeigt werden.

Diese Mutation trat gemeinsam mit einem heterozygoten Basenaustausch in Exon 3 (c.691A>T) auf, der zu einem Aminosäureaustausch p.I200F in der Epimerase-Domäne des Enzyms führte. Diese Mutation wurde bereits u.a. von Eisenberg et al. beschrieben (Eisenberg et al. 2003).

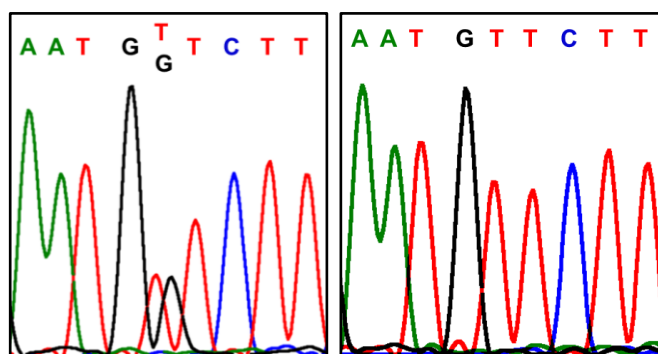


Abb. 17 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 6 des *GNE*-Gens Links ist die Analyse der Patienten-DNA mit dem heterozygoten Basenaustausch c.1085T>G dargestellt, der zu der Mutation p.V331G führt, rechts der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle.

1.2. PATIENT B: DIE MUTATION D378Y (V696M)

1.2.1. Klinische Daten

Bei diesem Patienten handelte es sich um einen 50-jährigen Engländer, dessen DNA uns zur Analyse aus dem Newcastle upon Tyne Hospital, England übersandt wurde. Vor einigen Jahren fiel bei einer Untersuchung wegen eines Bandscheibensyndroms eine diskrete Gangstörung auf. Weitere Untersuchungen ergaben das typische klinische Bild einer GNE-Myopathie mit myopathischen Veränderungen und einer relativen Aussparung des M. quadriceps. Der Patient war allerdings trotz seiner ausgeprägten Fußheberschwäche weitgehend mobil. Eine zu Beginn aufgetretene Fallneigung war dank physiotherapeutischer Übungsbehandlung gut kompensiert. Die subjektiv größten Einschränkungen beklagte der Patient allerdings im Bereich seiner Handmuskulatur. Bei der körperlichen Untersuchung zeigte sich eine Schwäche vor allem im Bereich der Fingerflexoren sowie eine globale Schwäche der Mm. interossei und einer eingeschränkten Beweglichkeit des Daumens. Die Kraftgrade im Bereich des M. quadriceps femoris waren bei massiver Muskelschwäche der Flexorengruppe am Oberschenkel weiterhin sehr gut, was die gut erhaltene Gehfähigkeit erklären kann.

Des Weiteren klagte der Patient über starke, eng umschriebene Rückenschmerzen, die möglicherweise mit einer radikulären Symptomatik bei Bandscheibenproblemen in der Anamnese oder aber auch mit dem stark abnormen Gangbild assoziiert sein könnten.

Insgesamt legte die klinische Symptomatik ebenfalls stark den Verdacht auf eine GNE-Myopathie nahe.

1.2.2. Molekulargenetische Untersuchung

Die molekulargenetische Untersuchung des kodierenden Bereiches des *GNE*-Gens ergab einen heterozygoten Basenaustausch (c.1225G>T) in Exon 7. Diese Veränderung in der Sequenz führte zu dem Aminosäureaustausch D378Y in der Epimerase-Domäne des Enzyms.

Diese Mutation trat gemeinsam mit einem heterozygoten Basenaustausch in Exon 12 (c.2179G>A) auf, was zu einem Aminosäureaustausch V696M in der Kinase-Domäne des Enzyms führte. Beide Mutationen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Eisenberg et al. 2001; Eisenberg et al. 2003).

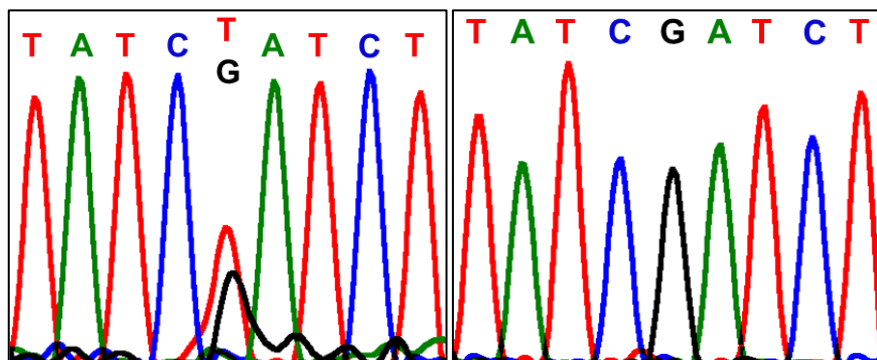


Abb. 18 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 7 des *GNE*-Gens Links ist die Analyse der Patienten-DNA mit dem heterozygoten Basenaustausch c.1225G>T dargestellt, der zu der Mutation p.D378Y führt, rechts der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle.

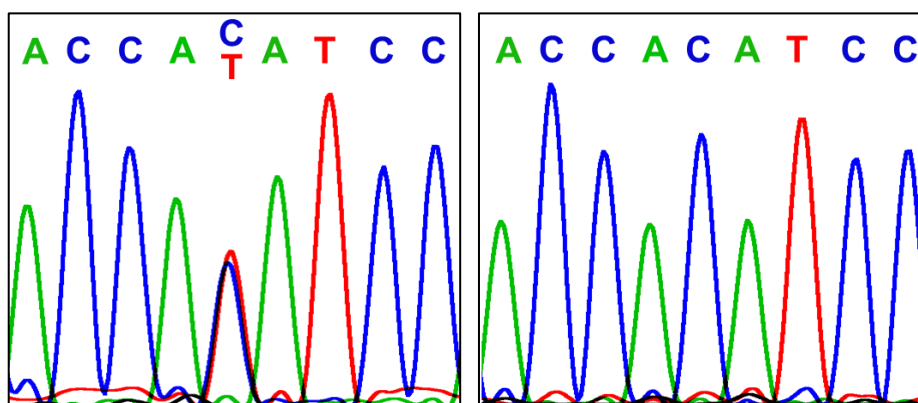


Abb. 19 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 12 des *GNE*-Gens Die Analyse erfolgte im Antisense-Strang. Dementsprechend ist links ist die Analyse der Patienten-DNA mit dem heterozygoten Basenaustausch C>T dargestellt, was dem Basenaustausch c.2179G>A im Sense-Strang entspricht. Dieser Basenaustausch führt zu der Mutation p.V696M. Rechts ist der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle dargestellt.

1.3. PATIENT C: DIE MUTATION V696M OHNE 2. MUTATION

Normalerweise treten die Mutationen im *GNE*-Gen als Compound-Heterozygote Mutationen auf, d.h. es liegen zwei unterschiedliche Mutationen auf den beiden Allellen des Gens vor. In Ausnahmefällen tritt auch Homozygotie auf, insbesondere bei der häufigsten Mutation in der Volksgruppe der persischen Juden (1:5000), der Mutation p.M712T (Eisenberg et al. 2001; Eisenberg et al. 2003). Auch die Mutation p.I587T, die wegen ihres gehäuften Auftretens in der Volksgruppe der Roma in der Literatur als „Gypsy-Mutation“ bezeichnet wird, tritt homozygot auf (Kalaydjieva et al. 2005). Bei diesem Patienten wurde in Exon 12 ein heterozygoter Basenaustausch c.2179G>A identifiziert, der zu einem Aminosäureaustausch p.V696M führte. Diese Mutation ist bereits beschrieben worden (Eisenberg et al. 2003). Allerdings konnte im kodierenden Bereich des *GNE*-Gens keine zweite Mutation nachgewiesen werden, weswegen erweiterte Nachweismethoden zum Einsatz kamen.

1.3.1. Molekulargenetische Untersuchung

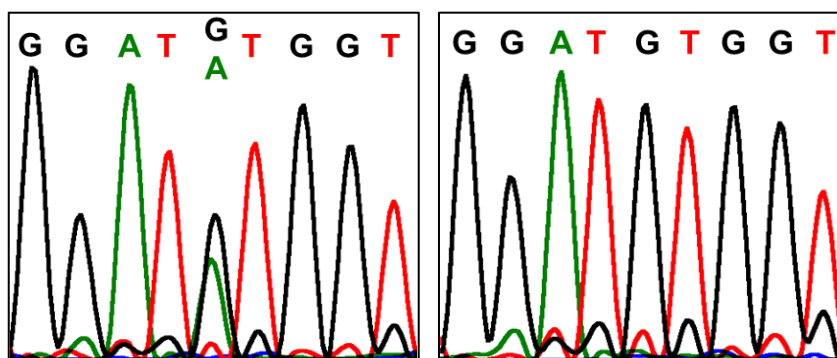


Abb. 20 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 12 des *GNE*-Gens Links ist die Analyse der Patienten-DNA mit dem homozygoten Basenaustausch c.2179G>A dargestellt, der zu der Mutation p.V696M führt, rechts der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle.

1.3.2. Klinische Daten

Bei diesem Patienten handelte es sich um einen 24-jährigen Patienten aus England dessen DNA uns zur Analyse aus dem Newcastle upon Tyne Hospital, England übersandt wurde. Bei diesem jungen Patienten fielen bereits im Alter von 18 Jahren eine Einschränkung der sportlichen Belastbarkeit sowie ein progredienter Schwund der Beinmuskulatur auf. Bei dem Bruder des Patienten wurde vor einigen Jahren eine Muskeldystrophie mit einer Myopathie vom distalen Typ diagnostiziert, wobei eine nähere Charakterisierung noch nicht abgeschlossen war.

Bei der klinischen Untersuchung fielen eine erhöhte Serum Kreatinkinase (1200 IU/l) sowie ein myopathisches EMG-Muster auf. Eine Muskelbiopsie ergab außer einem leichten myopathischen Erscheinungsbild mit unterschiedlichen Muskelfaserkalibern keinen wegweisenden Befund.

Bei der körperlichen Untersuchung zeigte sich eine ausgeprägte Gangstörung mit Steppergang und positivem Trendelenburgzeichen, das Treppensteigen war nur eingeschränkt möglich. Die Muskelschwäche konzentrierte sich hauptsächlich auf die untere Extremität mit einem sowohl proximal als auch distal betonten Verteilungsmuster. Der fehlende Befall des M. quadriceps femoris war auch hier wegweisend für die Verdachtsdiagnose einer GNE-Myopathie.

Im Bereich der oberen Extremität zeigte sich eine vor allem distal betonte Myopathie. Die Kraft im Bereich der Fingermuskulatur war eingeschränkt, die Hypothenarmuskulatur atrophisch.

1.3.3. RT-PCR/RNA-Gewinnung und Sequenzanalyse

Aus Muskelgewebe des Patienten wurde RNA gewonnen, aus der mit Hilfe der RT-PCR cDNA synthetisiert wurde. Mit dieser Methode ist es möglich, isoliert die translatierte DNA zu untersuchen. Mögliche Fehler bei der posttranslationalen Prozessierung der RNA, wie

z.B. beim Spleißen, die bei der Untersuchung der genomischen DNA unberücksichtigt bleiben, können so analysiert werden. Auch hier führte eine direkte Sequenzanalyse zu keinen weiterführenden Ergebnissen.

1.4. VERGLEICHSTABELLE

Patient	A	B	C
Mutation	GNE V331G, I200F	GNE D378Y, V696M	GNE V696M,x
Geschlecht	m	m	m
Untersuchungsalter	46	50 (2. Untersuchung)	24
Manifestationsalter	35	n.b.	18
Initialsymptomatik	Hinken	Gangstörung	Schwäche der Beinmuskulatur
Familienanamnese	positiv	n.b.	positiv
CK	n.u.	n.u.	1200 U/l
Gehfähigkeit	erhalten o. Hilfsmittel	erhalten	eingeschränkt
Scapula alata	r>l	rechts	nein
Muskelatrophie	Schultermuskulatur	Schultergürtel, rechter Thenar	Hypothenar
Zehenstand	+	+	-
Fersenstand	-	-	-
Untere Extremität			
Hüftflexion	r: 4/5, l: 4+/5	Schwäche	3-/3 bds.
Hüftextension	3-/5 bds.	Schwäche	r: 3-/5, l:4-/5
Hüftabduktion	r: 4+/5, l: 5/5	n.u.	3-/5 bds.
Hüftadduktion	r: 3-/5, l: 2/5	n.u.	r: 2-/5, l: 1/5
Knieflexion	r: 3-/5, l: 2/5	n.u.	2-/5 bds.
M. quadriceps fem.	5/5 bds.	5/5 bds.	5/5 bds.
Sprunggelenk dorsiflexion	0/5 bds	1/5 bds.	1/5 bds.
Sprunggelenk plantarflexion	5/5 bds.	4/5 bds.	3/5 bds.
Obere Extremität			
Schulter Abduktion	n.u.	n.u.	r: 4/5, l: 5/5
Schulter Adduktion	n.u.	n.u.	
Handgelenk Flexion	n.u.	links abgeschwächt	5/5 bds.
Handgelenk Extension	n.u.	links abgeschwächt	5-/5 bds.
Faustschluss	n.u.	4/5 bds.	4/5 bds.
Halsflexion	5/5	4-/5	4-/5
Halsextension	5/5		5/5
Fazialmuskulatur	nicht betroffen	Schwäche	nicht betroffen

Tab. 4 Vergleichstabelle der klinischen Symptomatik der Patienten mit einer *GNE*-Myopathie

2. Mutationen im *VCP*-Gen

Insgesamt wurde die DNA von 13 Patienten, bei denen der klinische Verdacht einer hereditären Einschlusskörpermyopathie geäußert wurde oder bereits eine hinweisende Muskelbiopsie vorlag, genetisch untersucht. Dabei testeten wir im Sinne einer Stufendiagnostik primär als Hotspot-Regionen die Exons 3, 5 und 6. Bei negativem Resultat folgten dann die restlichen 14 Exons.

Eine IBMPFD, die durch eine Mutation im *VCP*-Gen verursacht wird, ist typischerweise durch die Trias Myopathie, Morbus Paget und Demenz charakterisiert. In unserem Patientengut fanden sich allerdings selten alle drei Symptome, vielmehr verlief die Erkrankung oft mono- oder bisymptomatisch. Obwohl die beobachtete Zahl der Fälle sicherlich viel zu gering für eine verlässliche Statistik ist, soll dennoch das hier verwendete Patientengut hinsichtlich einer Phänotyp-Genotyp-Korrelation beschrieben werden. Von den 13 Patienten konnte bei 4 Patienten eine Mutation im *VCP*-Gen nachgewiesen werden und somit die Verdachtsdiagnose einer IBMPFD bestätigt werden.

Neben der Hotspot-Mutation auf Position 155 in Exon 5, die zahlenmäßig am häufigsten diagnostiziert werden konnte, wurde auch eine Deletion in Exon 4 gefunden. Da es sich hierbei unseres Wissens nach um die erste beschriebene Deletion im *VCP*-Gen handelt, wurde diese Mutation eingehender untersucht und in *in vitro*-Experimenten versucht, die Pathogenität zu beurteilen.

2.1. DIE MUTATION R155H/L

Insgesamt wiesen 3 Patienten eine Mutation an Position R155 im *VCP*-Gen auf, davon zwei die häufigste Mutation überhaupt, die Mutation R155H.

Im Folgenden werden die klinischen Untersuchungsergebnisse und nähere Angaben zur Symptomatik und zum Verlauf in einer Tabelle zusammengefasst.

Patient	D	E	F
Mutation	R155H	R155H	R155L
Geschlecht	m	w	w
Untersuchungsalter	49	60	50
Manifestationsalter	30	45	43
Familienanamnese	positiv	positiv	positiv
Schluckstörung	nein	nein	nein
Scapula alata	ja	n.u.	ausgeprägt bds.
Gangbild	Trendelenburg-Hinken, Rollator-/Rollstuhlpflichtig	Trendelenburg	Trendelenburg
Sensibilitätsstörungen	ja	nein	nein
Paget (radiologisch und nuklearmed.)	nein	n.u.	nein
AP	n.u.	normal	normal
CK (U/l)	638	181	235
EMG	chronisch-neurogene Veränderungen	mäßige chronisch neurogene Veränderungen	Zeichen einer fortgeschrittenen Muskeldystrophie
NLG	schwere PNP der Beine	n.u.	n.u.
Muskelbiopsie	Muskelatrophie, Einzelfaserdegeneration, myopathisches Gewebsyndrom, rimmed vacuoles	n.u.	Muskelatrophie, rimmed vacuoles, Ansammlung filamentärer Aggregate und Myelinablagerungen
Neurologische Symptomatik/Demenz	Konzentrations- und Gedächtnisstörungen, beginnende Wesensveränderungen, ADHS	Dementielles Syndrom, vorwiegend frontal	radiologisch und nuklearmedizinisch kein Hinweis auf FTD, Neuropsychol. Testung unauffällig 0/5
Bauchdecken- muskulatur	n.u.	n.u.	
Untere Extremität:			
M. quadriceps femoris	3/5, atroph	3-4/5	r: 3/5, l: 5/5
M. iliopsoas	n.u.	3/5 bds	3-4/5 bds.
M. tibialis anterior	n.u.	n.u.	r: 3/5, l: 4/5
Aufstehen aus der Hocke	-	-	eingeschränkt
Zehenstand	-	+	eingeschränkt
Fersenstand	-	-	-
Obere Extremität			
Schulter Flexion/Extension	proximal betont, 3-4/5, Atrophie biceps, triceps	distal betont 3-4/5 bds	3/5 bds.
Schulter Elevation	3/5	n.u.	2/5 bds.
Handmuskulatur	normal	Atrophie der Handbinnenmuskulatur, des Thenars und Hypothenars	Atrophie und Schwäche (3/5) der Handbinnenmuskula- tur

Patient	D	E	F
Handgelenk Flexion		n.u.	5/5 bds.
Handgelenk Extension		n.u.	2-3/5 bds.
Fingerbeuger		n.u.	5-/5 bds.
Fingerstrecker		n.u.	r: 1/5, l: 0/5

Tab. 5 Vergleichstabelle der klinischen Symptomatik der Patienten mit der Mutation *VCP R155*

2.2. DIE MUTATION *D120DEL*

2.2.1. Klinische Daten

Klinik

Die 64 Jahre alte deutschstämmige Patientin litt seit dem 52. Lebensjahr unter einer progressiven Muskelschwäche, betont im Bereich des Schultergürtels und der Oberarme beidseits, sowie dem linken Bein. Klinisch vorstellig wurde sie erstmals im Alter von 57 Jahren. Die neurologische Untersuchung ergab eine symmetrische Muskelatrophie der Schulter- und Oberarmregion und eine Scapula alata. Die Armelevation war nur bis 90° möglich. An der unteren Extremität zeigte sich eine diskrete Parese von 4-5/5, der Fersen- und Zehenstand war eingeschränkt. Außerdem war ein Trendelenburgsches Gangbild zu beobachten. Sensorium und periphere Muskelreflexe waren unauffällig. Sprachstörungen und kognitive Einschränkungen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Im EMG-Befund waren positive sharp waves und myotone Entladungsmuster im M. biceps nachweisbar. Ebenfalls auffällig war eine pathologische Spontanaktivität im M. tibialis, gastrocnemius und vastus lateralis, sowie eine beinbetonte Amplitudenreduktion in der Nervenleitgeschwindigkeit. Dieser Befund ist insgesamt mit einer Myopathie vereinbar. Eine bereits damals durchgeführte Muskelbiopsie zeigte deutliche Kaliberschwankungen der Muskelfasern, vereinzelt „red ragged fibers“, jedoch ohne entzündliche Infiltrate, Zeichen von Apoptose, Nekrose oder Basophilie. Dieser Befund ist bei deutlich atrophischen Muskelfasern mit Umbau in Fettgewebe am ehesten mit einer unspezifischen Myopathie vereinbar. Die primäre Verdachtsdiagnose einer fazio-skapulo-humeralen Muskeldystrophie (FSHD) konnte molekulargenetisch ausgeschlossen werden.

Im Alter von 61 Jahren traten bei der Patientin sukzessive kognitive Begleitsymptome auf. Vor allem eine Aphasie mit Wortfindungsstörungen, Floskeln, Satzabbrüchen, syntaktischen und phonematischen Fehlern, Ein-Wort-Sätzen, Konfabulationen und falscher Benennung von Gegenständen. Eine ausgeprägte Dysphagie führte zu einer ungewollten Gewichtsreduktion von 15-20 kg in wenigen Monaten. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich der kognitive Zustand rapide. Hinzu kamen nun Verhaltensstörungen, inadäquate Stimmungslagen, apathisches Verhalten und Krankheitsuneinsichtigkeit. Das visuell-räumliche Gedächtnis war nicht betroffen, ebenso konnte eine allgemeine Gedächtnisstörung ausgeschlossen werden. Der Gesamtbefund ist vereinbar mit einer frontotemporalen Demenz.

Bei der Untersuchung der Patientin während des stationären Aufenthaltes im Friedrich-Baur-Institut zeigte sich eine weitere Verschlechterung des kognitiven Zustandes. Die neurologische Untersuchung war nur erschwert zu erheben. Dennoch konnte bei der Patientin eine vertikale Blickparese nach oben und unten, eine deutliche Gangunsicherheit, sowie eine Einschränkung der Abduktion der Arme, die nur bis etwa 60° möglich war, beobachtet werden. Eine bei einem früheren Krankenhausaufenthalt aufgefallene diskrete Erhöhung der Alkalischen Phosphatase im Serum konnte nicht bestätigt werden. Auch szintigrafisch konnte ein Morbus Paget ausgeschlossen werden (s.u.), sodass es sich hier um einen bisymptomatischen Verlauf einer IBMPFD handelt.

MRT des Schädels

Um differentialdiagnostisch andere Ursachen der dementiellen Symptomatik (maligner Prozess, entzündliche Veränderungen, Ischämie, Blutung) auszuschließen wurde eine magnetresonanztomographische Untersuchung des Gehirns durchgeführt.

Dabei fanden sich betont fronto-temporal erweiterte äußere Liquorräume, ein Befund, der grundsätzlich in diesem Alter als auffällig zu werten ist und mit der Verdachtsdiagnose einer Demenz des fronto-temporalen Typs vereinbar ist. Andere Ursachen der dementiellen Entwicklung konnten ausgeschlossen werden, insbesondere fanden sich keine Zeichen einer Ischämie oder Blutung, sowie keine Raumforderungen oder entzündliche Veränderungen.

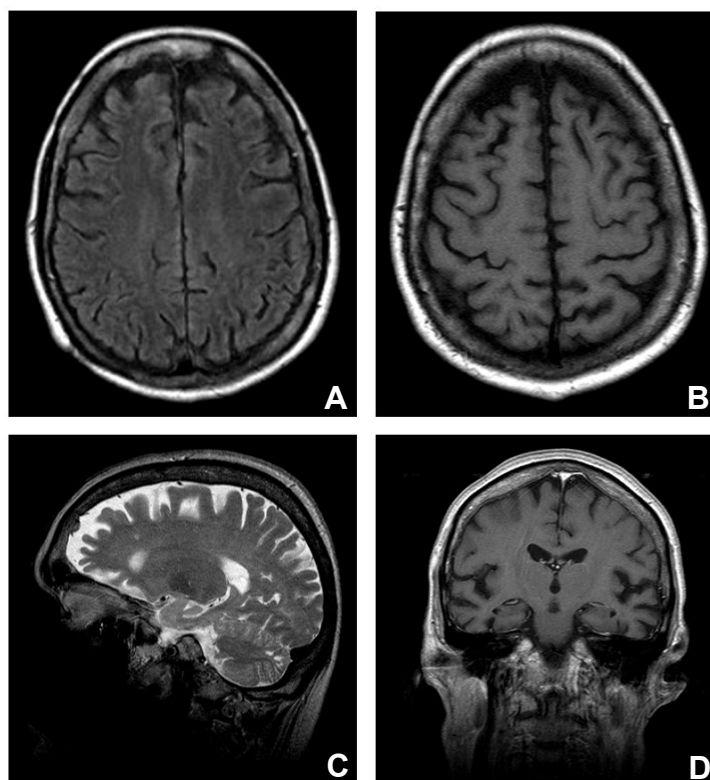


Abb. 21 Magnetresonanztomographie des Schädels. A, B und D zeigen T1 gewichtete Sequenzen, C eine T2 gewichtete Sequenz. A und B zeigen axiale Schnitte, C einen Sagittalschnitt, D eine Koronarschichtung. Es zeigen sich v.a. frontotemporal deutlich erweiterte äußere Liquorräume.

Positronenemissionstomographie (PET) mit F-18 markierter Deoxyglukose (FDG)

Für die Abklärung einer Demenz eignet sich als Goldstandard eine nuklearmedizinische Untersuchung mit Hilfe der Positronenemissionstomographie (PET). Dazu wurde der Patientin als Radiopharmakon F-18 markierte Deoxyglukose (FDG) intravenös verabreicht und nach 60 min. ein Scan im Tomographen durchgeführt.

In den rekonstruierten Schnittbildern in transversaler, koronarer und sagittaler Schichtung wurden Veränderungen im Glukosestoffwechsel detektiert.

Bei der Patientin fanden sich Glukosestoffwechseldefekte beidseits weitgehend symmetrisch orbitofrontal, temporal inferior bzw. polar sowie im Bereich des posterioren Gyrus cinguli. Cerebellär zeigten sich beidseits kranial symmetrische Glukosestoffwechseldefekte, die aber nicht sicher von Normalisierungsartefakten abgegrenzt werden konnten. Der Metabolismus der übrigen kortikalen und subkortikalen Strukturen (Striatum, Thalamus, Cerebellum) stellte sich überwiegend regelrecht dar.

Die an diesen Lokalisationen beschriebenen Glukosestoffwechsellinderungen sind positronenemissionstomographisch mit dem Vorliegen einer neurodegenerativen Erkrankung vereinbar, wobei das Befundmuster am ehesten für eine temporal ausgeprägte Verlaufsform einer Demenz aus dem frontotemporalen Formenkreis spricht.

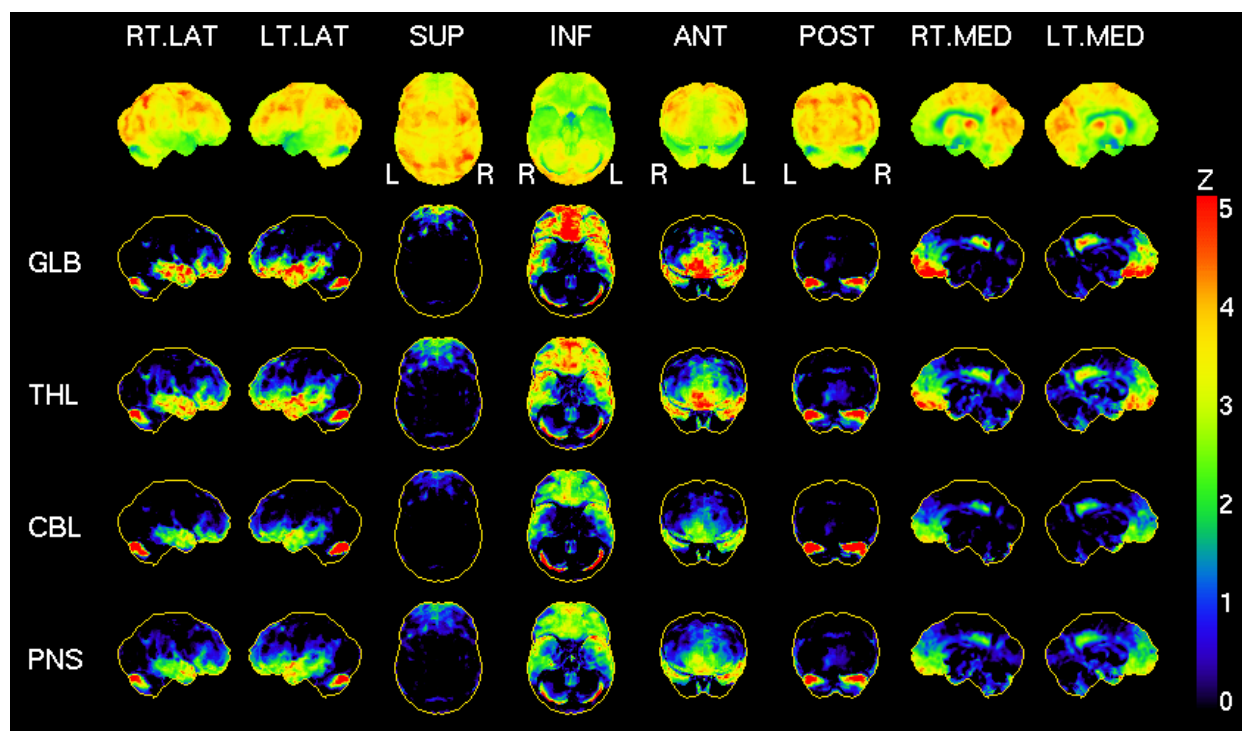


Abb. 22 Positronenemissionstomographie (PET) mit F-18 markierter Deoxyglukose (FDG). Beidseitige Glukosestoffwechseldefekte, weitgehend symmetrisch orbitofrontal, temporal inferior bzw. polar sowie im Bereich des posterioren Gyrus cinguli gelegen, weisen auf eine frontotemporale Demenz mit temporal ausgeprägter Verlaufsform bei der Patientin mit der neuen VCP D120-Deletion hin.

2.2.2. Molekulargenetische Untersuchung

Zur Mutationsanalyse wurde aus peripherem Blut der Patientin genomische DNA gewonnen, mit Hilfe der PCR amplifiziert und sequenziert. Durch datenbankgestützte Analyse konnte im Vergleich zur normalen Sequenz des *VCP*-Gens eine heterozygote Deletion der Basen Guanosin, Adenosin und Thyminid gefunden werden, die zu einem Verlust eines Aspartats in Position 120 führte. Abb. 23 zeigt deutlich den Verlust der Basen und die folgende Doppelsequenz im Vergleich zu einer Normalkontrolle. Diese Mutation ist unseres Wissens nach bisher in der Literatur noch nicht beschrieben, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass es sich hierbei um die erste beschriebene Deletion im *VCP*-Gen handelt.

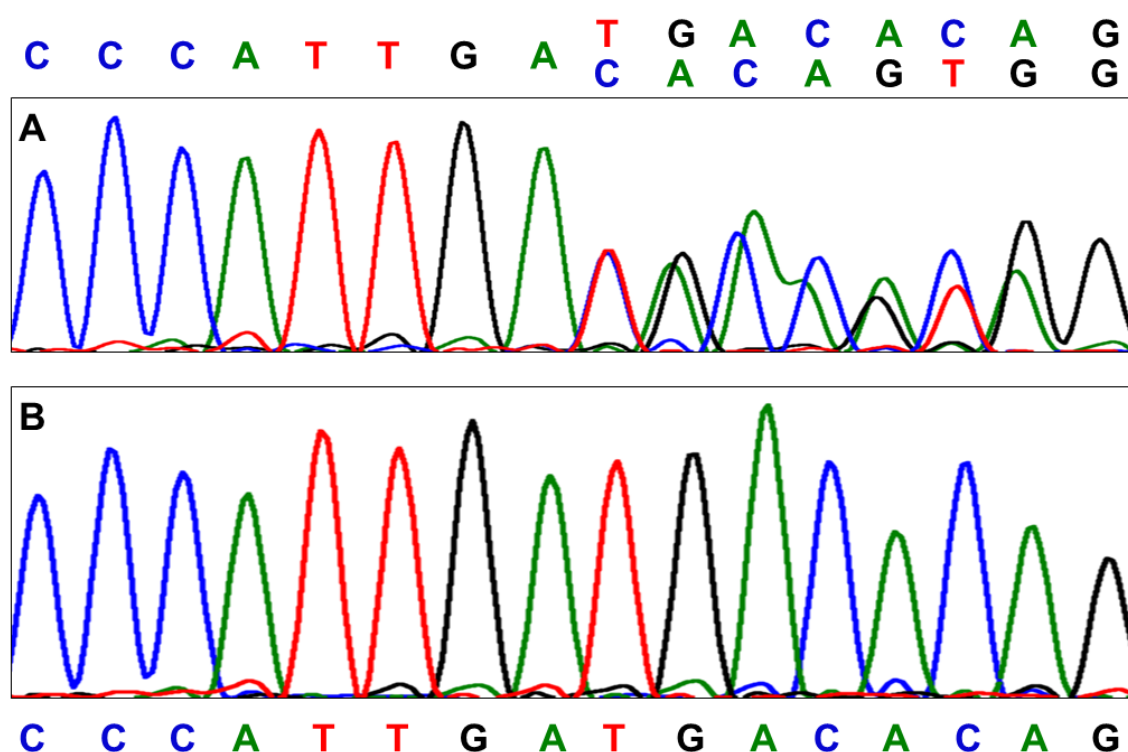


Abb. 23 Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 4 des *VCP*-Gens (A) zeigt den betreffenden Abschnitt der Patienten-DNA mit der Mutation, die eine heterozygote Deletion der Basen Guanosin (G), Adenosin (A) und Thyminid (T) verursacht und zu der Deletion eines Aspartats an Position 120 führt. (B) zeigt zum Vergleich den identischen Ausschnitt einer Normalkontroll-DNA.

2.2.3. Phylogenetische Relevanz

Durch Vergleich der DNA-Sequenzen verschiedener Organismen kann die genetische Persistenz von Genen oder bestimmten DNA-Mustern nachvollzogen werden. Je konservierter eine bestimmte DNA-Sequenz bei Organismen verschiedener Evolutionsstufen nachgewiesen werden kann, desto wichtiger scheint diese Sequenz vom evolutionären Standpunkt her gesehen zu sein. Dies wird als ein weiteres Kriterium der Beurteilung der Pathogenität von Mutationen herangezogen. Um die phylogenetische Relevanz der hier beschriebenen Mutation D120del zu beurteilen, wurde eine datenbankgestützte Analyse bei verschiedenen Organismen durchgeführt. *VCP* (p97 bei Mäusen, TER94 bei *Drosophila melanogaster* und CDC48 bei *Saccharomyces cerevisiae*) ist ein hochkonserviertes Protein. Wie Abb. 12 zeigt, lässt sich auch das Aspartat, das sich beim Menschen auf Position 120 befindet und das in der vorliegenden Mutation p.D120del deletiert ist, evolutionsgeschichtlich sehr weit zurückverfolgen und ist somit ebenfalls hochkonserviert.

D120							
L	P	I	D	D	T	V	
L	P	I	D	D	T	V	Homo Sapiens
L	P	I	D	D	T	V	Canis familiaris
L	P	I	D	D	T	V	Bos taurus
L	P	I	D	D	T	V	Gallus gallus
L	P	I	D	D	T	V	Rattus norvegicus
L	P	I	D	D	T	V	Mus musculus
L	P	I	D	D	T	V	Xenopus laevis
L	P	I	D	D	T	V	Drosophila melanogaster
L	P	I	D	D	T	V	Anopheles gambiae
L	P	I	D	D	T	I	Caenorhabditis elegans homolog 2
L	P	I	D	D	T	I	Plasmodium falciparum
L	P	V	D	D	T	V	Arabidopsis thaliana
L	P	I	D	D	T	V	Oryza sativa
L	P	I	D	D	T	I	Glycine max

Abb. 24 Konservierung des Aspartat D120 in der DNA verschiedener Organismen Übereinstimmungen in der Sequenz sind weiß hinterlegt, Abweichungen grün. Das Aspartat D120 im *VCP*-Gen ist bei Übereinstimmung gelb markiert.

2.2.4. Einfluss der Mutationen im *VCP*-Gen auf das Autophagosom

Die Pathomechanismen, die zu dem klinischen Bild der IBMPFD führen sind weitgehend unbekannt. Dennoch konnten einige Arbeitsgruppen in den letzten Jahren *VCP*-Mutanten mit signifikanten Störungen der Autophagie in Zusammenhang bringen. Bei näherer Betrachtung von vakuolären Strukturen in Patientenmyoblasten zeigte sich *in vitro*, dass in diesen unreife dysfunktionale nicht abbaubare Autophagosomen akkumulieren (Ju et al. 2009; Vesa et al. 2009; Tresse et al. 2010) Normalerweise werden ubiquitinierte Proteine und andere nicht mehr benötigte Zellbestandteile intrazellulär von Vesikeln umschlossen.

Das so entstandene Autophagosom fusioniert dann mit einem primären Lysosom zum Autolysosom. Bei einer Mutation im *VCP*-Gen ist dieser Schritt offensichtlich gestört sodass unreife Autophagosomen in der Zelle akkumulieren. Dabei beeinträchtigt ein Verlust der Funktion von *VCP* nicht die Induktion der Autophagie, sondern die Reifung von Autophagosomen zu Autolysosomen, entweder durch Defekte im intrazellulären Transport oder durch eine gestörte Fusion von Autophagosomen und Lysosomen (Ju et al. 2009). Diese These beruht auf der Beobachtung, dass durch einen Knockdown von *VCP* durch siRNA zum einen wie zu erwarten ist, die *VCP*-Menge im Immunoblot um 60-70% absinkt, gleichzeitig jedoch die Menge an LC3B-II und p62 ansteigt, die als Markerproteine für eine gestörte Autophagie gelten. Auch in den rimmed vacuoles lässt sich eine Akkumulation von p62 und LC3B-II nachweisen (Ju et al. 2009).

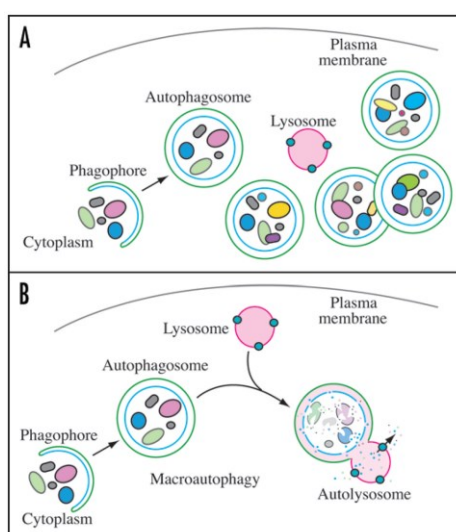


Abb. 25 Schematische Darstellung der Autophagie Übersicht (A) zeigt den Beginn der Autophagie, die mit der Formierung einer Phagophore, dem primären Sequestrationskompartiment beginnt, das sich zu einem Autophagosom entwickelt. Ein Defekt im Reifevorgang, z.B. durch einen Defekt in der Fusion mit Lysosomen, resultiert in einer Akkumulation von Autophagosomen. Übersicht (B) zeigt den normalen Ablauf der Autophagozytose mit Autophagosombildung, Fusion mit einem Lysosom und Abbau des Inhaltes im Autolysosom. Aus (Klionsky et al. 2008).

Bei Aktivierung der Autophagie wird das 18 kDa große Protein LC3B-I durch proteolytische Abspaltung und Lipidmodifikation in das 16 kDa große Protein LC3B-II umgewandelt. Da LC3B-II spezifisch an der Membran der Autophagosomen lokalisiert ist, eignet sich seine quantitative Bestimmung sehr gut als Marker für den korrekten Ablauf der Autophagie in der Zelle. Bei einer Akkumulation von Autophagosomen steigt nämlich gleichzeitig LC3B-II an. Bei funktionierender Autophagozytose wird LC3B-II mitabgebaut (Ju et al. 2009; Badadani et al. 2010). Dieses Resultat lässt sich auch bei Patientenmyoblasten und im Maus-Modell bestätigen. Auch hier steigt im Immunoblot die Menge an LC3B-II im Vergleich zu Kontrollmyoblasten signifikant an, ein deutlicher Hinweis, dass auch *in vivo* die Autophagie gestört ist (Ju et al. 2009; Tresse et al. 2010).

p62 ist ebenfalls ein Protein, das durch Autophagie abgebaut wird und somit bei fehlerhaftem Ablauf dieses Stoffwechselwegs in der Zelle akkumuliert. Des Weiteren ist p62 aber auch essentiell für den Transport ubiquitiniertes Proteine zum Autophagie-Lysosom-System (Moscat and Diaz-Meco 2009). Dazu bindet p62 ubiquitinierte Proteine und LC3B-II (Pankiv et al. 2007). Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass Mutationen im *p62/SQSTM1*-Gen einen Morbus Paget verursachen, der klinisch nicht von der Knochenerkrankung zu unterscheiden ist, die durch Mutationen im *VCP*-Gen verursacht wird (Hocking et al. 2002; Laurin et al. 2002).

Um eine wesentliche Rolle von *VCP* bei der Autophagie weiter zu bestätigen, wurde bei Myoblasten die Autophagosomenreifung selektiv mit den Medikamenten Chloroquin, das die lysosomale Protease inhibiert und Bafilomycin A, einem Makrolid-Antibiotikum, das durch Hemmung der H⁺-ATPase die Fusion von Autophagosom und Lysosom verhindert, gehemmt. Interessanterweise führt dies zu einem myopathischen Bild mit vakuolären Strukturen, einer Akkumulation von LC3B-II und p62, sowie zu einer Degeneration von Myofibrillen. Die Ergebnisse lassen sich nicht von den Beobachtungen bei IBMPFD-Patientenmyoblasten unterscheiden (Ju et al. 2009). Damit scheint ein Defekt in der Reifung von Autophagosomen zu Autolysosomen mitverantwortlich für die Pathologie der IBMPFD zu sein.

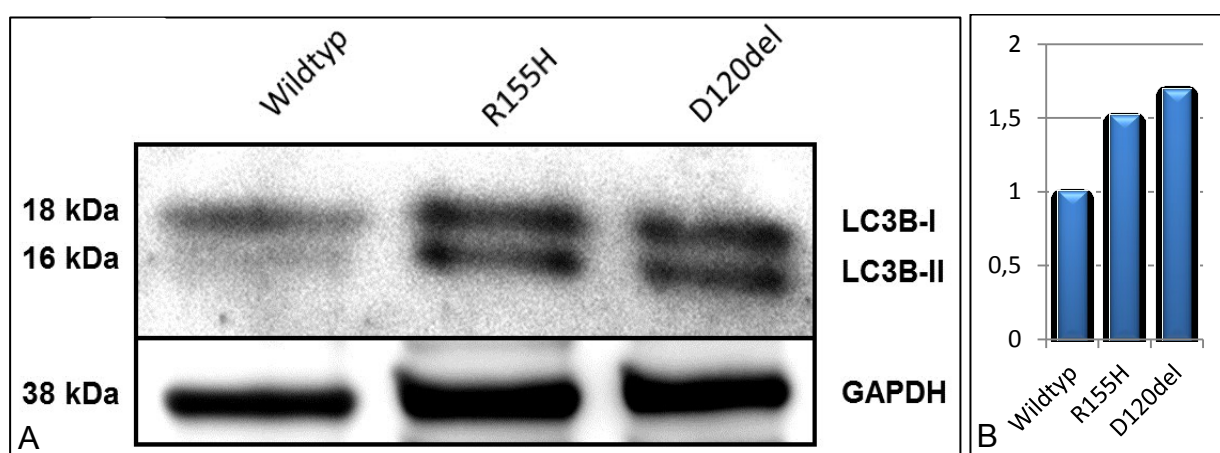


Abb. 26 Mutationen in *VCP* beeinträchtigen den Proteinabbau durch Autophagie: Markerprotein LC3B-II (A) Nach Transfektion der *VCP*-Konstrukte in PMI-28 Mausmyoblasten wurde nach 2 Tagen ein Gesamtproteinextrakt hergestellt und über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow aufgetrennt. Für den Westernblot wurde ein LC3-spezifischer Antikörper verwendet. Die Ladekontrolle erfolgte mit einem GAPDH-spezifischen Antikörper. Der Subtyp LC3B-II wird in den Zellen, die das *VCP*-Wildtypkonstrukt enthalten, nahezu komplett abgebaut, während dieser Abbau in den Zellen mit den Mutanten R155H und D120del weit weniger effizient abläuft. (B) Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Analyse des Blots. Die Werte sind auf das Signal der GAPDH-Ladekontrolle normalisiert. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der LC3B-II Isoform (~1,5-fach bei R155H und ~1,7-fach bei D120del).

Die beschriebenen Versuche wurden fast ausschließlich mit der häufigsten *VCP*-Mutante R155H durchgeführt. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurden in dieser Arbeit HeLa- und PMI-28-Zellen mit dem Plasmid pTH333 (*VCP*-Mutante R155H) und pKR334

(VCP-Mutante D120del) transfiziert und hinsichtlich der Akkumulation von LC3B-II und p62 mit Wildtypzellen verglichen. Dabei konnte LC3B-II im Vergleich zum Wildtyp $\sim 1,5$ -fach (R155H), bzw. $\sim 1,7$ -fach (D120del) erhöht im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 26). Bei p62 ließ sich eine ungefähre Verdopplung der Akkumulation beobachten (s. Abb. 27).

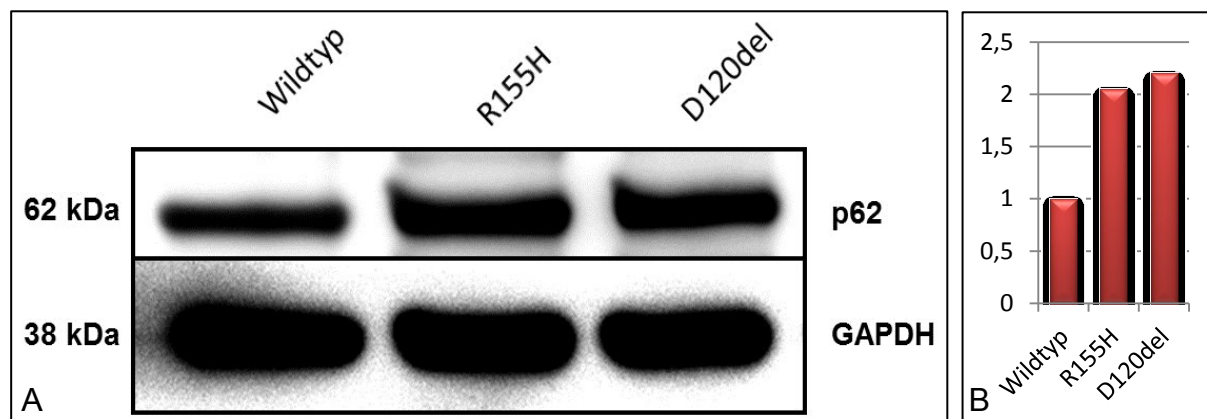


Abb. 27 Mutationen in VCP beeinträchtigen den Proteinabbau durch Autophagie: Markerprotein p62 (A) Der Versuchsansatz ist mit dem in Abb. 26 identisch. Für den Westernblot wurde ein p62-spezifischer Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (B) Bei der densitometrischen Analyse des Blots ist ein ~ 2 -facher Anstieg der Proteinmenge bei der Mutante R155H und ein $\sim 2,2$ -fachen Anstieg bei der Mutante D120del nachweisbar.

2.2.5. Transdifferenzierung von Patientenfibroblasten in Myoblasten mit MyoD

Patientenfibroblasten lassen sich in Myoblasten transdifferenzieren

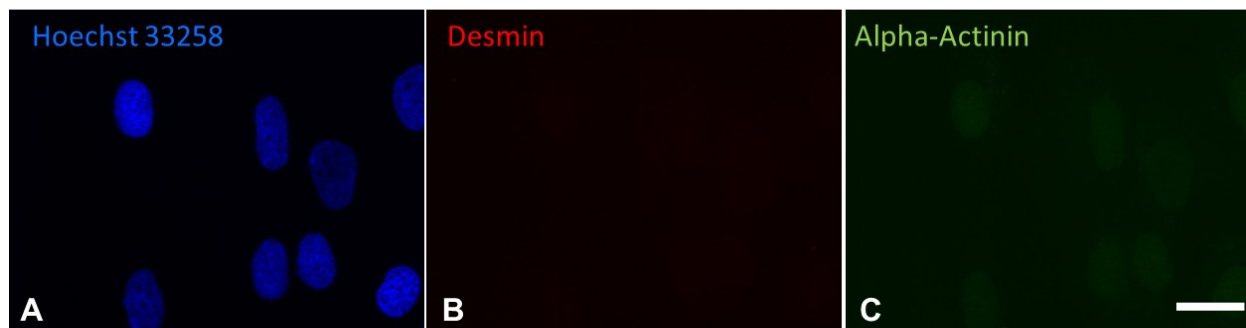
Die Gewinnung von Myoblasten ist ein invasiver Eingriff, der von Patienten oft abgelehnt wird. Seit einiger Zeit besteht die Möglichkeit mit Hilfe des Adenovirus Ad5fib50-MyoD Fibroblasten in Myoblasten zu transdifferenzieren (Havenga et al. 2002). Wir bedienten uns dieser Technik, um einerseits die Methode zu etablieren und andererseits, um die Myofibrillenbildung der mutierten Zellen mit Kontrollzellen vergleichen zu können.

Dazu haben wir im ersten Schritt gezeigt, dass die Methode mit den von uns verwendeten Fibroblasten funktioniert. Menschliche Fibroblasten in Kultur wurden mit dem Virus Ad5fib50-MyoD infiziert und über Nacht inkubiert, bevor die Ausdifferenzierung zu multinukleären Myotuben in Differenzierungsmedium angeregt wurde. Die Fixierung erfolgte an Tag 7. Als Negativkontrolle diente der gleiche Ansatz ohne Virus.

In der Immunfluoreszenzfärbung gegen Desmin und Alpha-Aktinin zeigte sich in der Positivkontrolle die Ausdifferenzierung in Form von Myotuben, in der Negativkontrolle fanden sich nur Einzelzellen (s. Abb. 28). Des Weiteren fiel die Färbung gegen Desmin, welches spezifisch in Myoblasten und vermehrt in Myotuben, nicht hingegen in Fibroblasten vorkommt, in der Positivkontrolle deutlich positiv aus, in der Negativkontrolle fand sich kein Nachweis von Desmin (s. Abb. 28 B, D, E). Somit konnte

gezeigt werden, dass die Transdifferenzierung auch mit den von uns verwendeten humanen Fibroblasten funktioniert.

Negativkontrolle: Menschliche Fibroblasten Tag 7



Ad5 MyoD Infektion: Menschliche Fibroblasten Tag 7

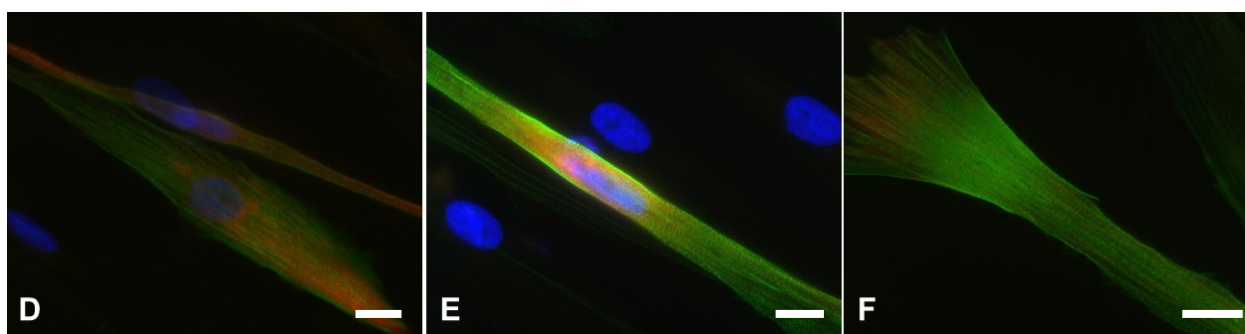


Abb. 28 Nachweis der Transdifferenzierung nach Ad5fib50-MyoD-Infektion. Ko-immunfluoreszenzfärbung von Desmin und Alpha-Actinin. In der Negativkontrolle zeigt sich im gleichen Bildausschnitt in (A) eine Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258, in (B) und (C) findet sich keine spezifische Anfärbung von Desminfilamenten oder alpha-Actinin. Das Spektrum der Myofibrillenbildung zeigt sich in drei verschiedenen Ausschnitten in (D)-(F) mit simultaner Darstellung aller drei Farbkanäle (Desmin: rot, Alpha-Actinin: grün, Zellkerne: blau). Maßstabsbalken 20 μ m.

Die Mutation D120del beeinflusst die Sarkomerstruktur in Myotuben

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der Mutation D120del auf die Bildung der Sarkomerstruktur. Dazu wurden Fibroblasten der Patientin mit der VCP-Mutation D120del mit Hilfe des Ad5fib50-MyoD-Virus zu Myoblasten transdifferenziert und in Differenzierungsmedium 10 Tage zu Myotuben ausdifferenziert. Als Kontrollzellen dienten Fibroblasten einer bezüglich Alter und Geschlecht passenden gesunden Kontrollperson, die identisch behandelt wurden. Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit Antikörpern gegen die myofibrillären Proteine α -Aktinin und Desmin. Wie Abb. 29 zeigt, bilden die Kontrollzellen, wie bereits in anderen Experimenten beobachtet, korrekt angeordnete Myofibrillen aus, so dass die charakteristische Sarkomerstruktur gut zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den Zellen der IBMPFD-Patientin eine gestörte Bildung der Sarkomerstruktur, insbesondere fehlt die typische regelhafte Anordnung der gegen α -Aktinin gefärbten Z-Banden-Bereiche. Ähnliche Beobachtungen

wurden bereits für die Mutante R155C beschrieben (Janiesch et al. 2007). Es bestätigt sich, dass VCP eine wichtige Rolle bei der Bildung von Myosinfibrillen spielt und auch die Mutation D120del zu einer entsprechenden Störung führen kann.

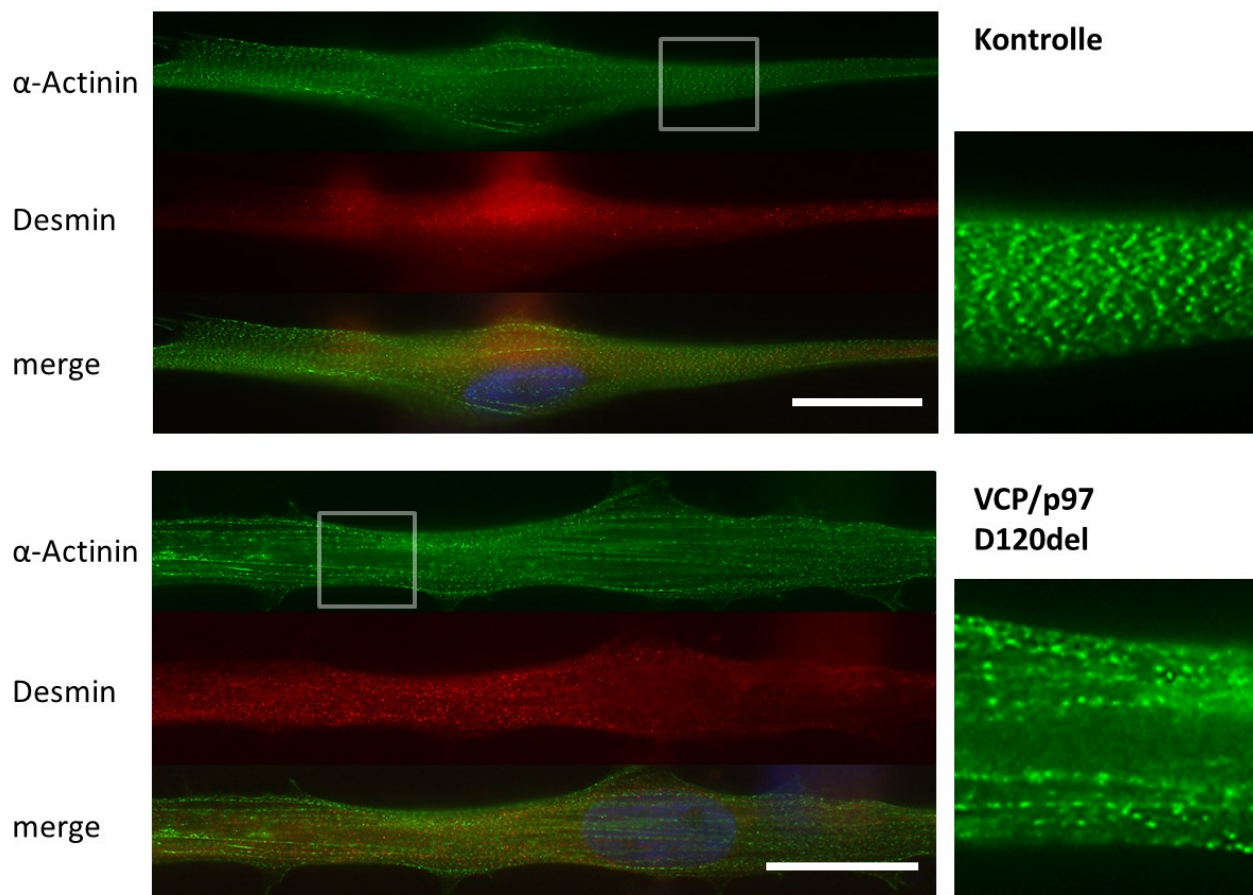


Abb. 29 Die Myofibrillenbildung ist bei der VCP-Mutation D120del gestört. Myoblasten wurden aus Fibroblasten mit Hilfe des Ad5fib50-MyoD-Virus transdifferenziert. 10 Tage nach Induktion der Zellfusion im Differenzierungsmedium zeigt die Fluoreszenz-Doppelfärbung gegen Alpha-Aktinin (grün) und Desmin (rot) bei den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle das Fehlen einer geordneten Myofibrillenordnung. Bei den Kontrollmyoblasten sieht man im Vergleich die charakteristische, regelhafte Sarkomerstruktur der gefärbten Filamente. Rechts ist jeweils ein vergrößerter Bereich der Alpha-Aktininfärbung gezeigt. Maßstabsbalken 20 μ m.

2.2.6. Pathogenitätsprognose mit MutationTaster®

Um eine weitergehende Aussage hinsichtlich der Pathogenität der Mutation D120del treffen zu können, wurde mit Hilfe des MutationTasters (<http://www.mutationtaster.org>) (Schwarz et al. 2010) *in silico* datenbankgestützt eine Pathogenitätsprognose berechnet. In die Analyse fließen verschiedene Faktoren ein wie Leserasterverschiebung, Einfluss der Mutation auf die Proteinstruktur, Speißstellenveränderungen, phylogenetische Konservierung und Strangabbrüche. Auf Basis dieser Daten wird eine Aussage darüber getroffen, ob die zu untersuchende Mutation Pathogenitätspotential aufweist. Der Algorithmus der Software MutationTaster wurde für einfache Mutationen (Basenaustausch, Deletion) mit 4937 Polymorphismen und 31182 krankheitsrelevanten Mutationen erstellt. Die Daten sind statistisch validiert. Die Angaben des Anbieters sind in Tab. 6 und Tab. 7 ersichtlich.

Genauigkeit	91.1%	± 0.1%
Präzision	93.0%	± 0.4%
Sensitivität	88.9%	± 0.3%
Spezifität	93.3%	± 0.1%

Tab. 6 Kreuzvalidierung: Vorhersagegenauigkeit von MutationTaster (Realistische Häufigkeit, über alle Varianten) aus <http://www.mutationtaster.org/documentation.html>

Genauigkeit	87.2 ±0.5%
Präzision	86.8 ±0.4%
Sensitivität	87.8 ±0.7%
Spezifität	86.6 ±0.4%

Tab. 7 Kreuzvalidierung: Vorhersagegenauigkeit von MutationTaster Modellen (gleichmäßige Frequenz) aus <http://www.mutationtaster.org/documentation.html>

Bei der Analyse ergibt sich für die Mutation D120del die Vorhersage „disease causing“ mit einem Wahrscheinlichkeitswert $p=1$. Der p -Wert ist von den Entwicklern intern entwickelt und ist nicht mit dem p -Wert statistischer Tests zu verwechseln. Ein Wert nahe 1 ist ein Indikator für eine hohe Vorhersagesicherheit. In der Zusammenfassung bestätigt MutationTaster, dass durch die Mutation die Aminosäuresequenz verändert und die Funktion des Proteins wahrscheinlich beeinträchtigt ist.

V)DISKUSSION

Die hereditären Einschlusskörpermyopathien stellen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe seltener Erkrankungen dar. Bei den untersuchten Patienten wurde das bisher bekannte phänotypische und genotypische Spektrum erweitert und näher charakterisiert.

1. Mutationen im *GNE*-Gen

1.1. *PATIENT A*:

Bei Patient A wurde ein heterozygoter Basenaustausch auf Position 1085T>G identifiziert, der zum Austausch eines Valins durch ein Glycin an Position 331 in der Kinase-Domäne von *GNE* führte. Auf dieser Position wurde bereits von Nishino et al. die Mutation 1085T>C (V331A) beschrieben. Leider ließen sich in der Literatur keine näheren klinischen Angaben zu diesem Patienten finden (Nishino et al. 2002). Als zweite heterozygote Mutation bei Patient A wurde die Mutation I200F identifiziert.

Der Krankheitsverlauf von Patient A ist als sehr typisch zu betrachten. Wie in den meisten Fällen fiel die *GNE*-Myopathie primär durch eine Gangstörung auf, der Krankheitsbeginn mit Mitte 30 liegt dabei im Durchschnitt. Typische klinische Befunde wie eine Fußheberschwäche mit deutlicher Parese der Zehenextensoren sowie die Aussparung des M. quadriceps femoris bei gleichzeitiger Parese der Knieflexoren sind als besonders charakteristisch zu erwähnen. Im Bereich der Muskulatur der Oberkörpers ist typischerweise vor allem der Schultergürtel betroffen. Es zeigt sich eine deutliche Scapula alata. Auch die Tatsache, dass der Patient 17 Jahre nach den ersten Symptomen immer noch berufstätig sein kann ist als klassisch zu werten, da eine Rollstuhlpflichtigkeit im Schnitt erst nach 2-3 Jahrzehnten auftritt (Huizing and Krasnewich 2009).

Die neu beschriebene *GNE*-Mutation V331G führt somit bei diesem Patienten zu dem klassischen Bild einer *GNE*-Myopathie.

1.2. *PATIENT B*:

Bei diesem Patienten konnten wir die Mutationen D378Y und V696M im *GNE*-Gen nachweisen. Auch hier war der klinische Verlauf weitgehend typisch, mit Betonung der Paresen in der unteren Extremität, Aussparung des M. quadriceps femoris und weitgehend erhaltener Gehfähigkeit. Im Vergleich zur Literatur zeigte sich daneben aber eine ausgeprägte axiale Schwäche. Die Fallneigung konnte mit Physiotherapie positiv beeinflusst werden.

Auffällig war auch eine ausgeprägte Schwäche der Handmuskulatur mit einer Schwäche der Fingerflexoren und Mm. interossei, die den Patienten im Alltag sehr einschränkt. Diese trat bereits früh im Krankheitsverlauf auf, normalerweise tritt diese Manifestationsform

eher im späteren Krankheitsverlauf auf. Eine Beteiligung der Fingerbeuger ist normalerweise charakteristisch für eine sporadische Einschlusskörpermyositis.

1.3. PATIENT C:

Die körperliche Untersuchung des Patienten und insbesondere der fehlende Befall des M. quadriceps femoris waren wegweisend für die Verdachtsdiagnose einer *GNE*-Myopathie. Durch direkte Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass der Patient heterozygoter Träger einer Mutation im *GNE*-Gen ist. Eine zweite heterozygote Mutation konnte mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Somit kann die Diagnose einer *GNE*-Myopathie mit der Methode der direkten Sequenzierung abschließend nicht gestellt werden. Die Sensitivität der direkten Sequenzierung liegt bei >95%. Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen werden dabei meist nicht untersucht, auch können nicht sämtliche regulatorisch wirkende Mutationen berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist die Detektion sehr großer Deletionen verfahrensbedingt nicht möglich.

Aus diesen Gründen sollte die Verdachtsdiagnose einer *GNE*-Myopathie bei diesem Patienten nicht abschließend verworfen werden.

1.4. ZUSAMMENFASSUNG

Insgesamt zeigten sich bei den untersuchten Patienten relativ klassische klinische Verlaufsbilder. Die interindividuellen Besonderheiten im Verlauf jedes einzelnen Patienten lassen sich auch in anderen Studien finden und unterstreichen, dass allein aufgrund der Mutationsanalyse keine Aussage über den Verlauf oder die Prognose gemacht werden kann.

2. Mutationen im *VCP*-Gen

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA von 13 Patienten mit Verdacht auf eine IBMPFD auf Mutationen im *VCP*-Gen untersucht. Dabei konnte der Verdacht bei 5 Patienten bestätigt werden. Die häufigste Mutation, die dabei gefunden wurde, lag analog zur Literatur auf Position 155. Bei einer Patientin fand sich eine Deletion von 3 Basen, die zu einem Verlust eines Aspartats auf Position 120 führte.

Das Krankheitsbild der IBMPFD ist ausgesprochen heterogen, ein Phänotyp mit allen drei Entitäten (IBM, frontotemporale Demenz und ossärer M. Paget) findet sich nur bei knapp 12% der Patienten. In unserem vergleichsweise kleinen Kollektiv (n=4) trat zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Myopathie in 100% der Fälle, ein Morbus Paget in keinem der Fälle und eine frontotemporale Demenz bzw. andere nicht näher bestimmte kognitive Symptomatik in 75% der Fälle auf. Alle drei Symptome gemeinsam zeigten sich bei keinem der Fälle, ein bisymptomatischer Verlauf in 75% der Fälle und ein monosymptomatischer Verlauf in 25% der Fälle. Mit Sicherheit ist dieses Kollektiv zu klein um anhand einer statistischen Auswertung eine valide Aussage zu treffen. Unsere Ergebnisse sind allerdings

gut kompatibel mit den in der Literatur beschriebenen Fällen. Unterschiede und Besonderheiten werden im Folgenden diskutiert.

2.1. DIE MUTATION AN POSITION R155

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei vier Patienten die Verdachtsdiagnose einer IBMPFD bestätigt, bei drei Patienten konnte eine Mutation an Position R155 festgestellt werden (Patienten D-F). Bei den Patienten D und E liegt die Mutation R155H vor, bei Patient F die Mutation R155L. Das untersuchte Kollektiv ist sehr klein, dennoch reihen sich die Ergebnisse gut in die Beobachtungen in der Literatur ein.

Das mittlere Manifestationsalter beträgt ca. 39 Jahre (30-45 J.), das mittlere Manifestationsalter ist in der Literatur mit 45 angegeben. Als Erstsymptomatik wurde von den Patienten eine Schwäche der Muskulatur genannt. Die Familienanamnese ist bei allen Patienten positiv für Muskelerkrankungen. Diese Beobachtungen sind kongruent mit den Angaben in der Literatur (Watts et al. 2004; Kimonis and Watts 2005). Die klinische Untersuchung ergab, sofern untersucht, bei allen Patienten eine Scapula alata und ein für die IBMPFD typisches Trendelenburg-Hinken, bei Patient D war die Myopathie schon so weit fortgeschritten, dass bereits eine Rollstuhlpflichtigkeit bestand. Interessanterweise war dies auch der Patient mit dem frühesten Erstmanifestationsalter (30 J.). Passend dazu zeigte sich hier bei der laborchemischen Untersuchung eine stark erhöhte Kreatinkinaseaktivität im Serum (638 U/l), der Normwert liegt bei <80 U/l (Renz-Polster et al. 2008). Die Patienten E und F wiesen ebenfalls erhöhte CK-Werte auf, allerdings deutlich niedriger als Patient D. Da die Höhe des Gesamt-CK-Wertes im Serum positiv mit dem Ausmaß der Muskelzerstörung korreliert, muss hier in Zusammenschau mit der Rollstuhlpflichtigkeit davon ausgegangen werden, dass zum Untersuchungszeitpunkt Patient D am stärksten von der Myopathie betroffen war.

Bei der körperlichen Untersuchung der Muskelkraft zeigten sich bei den Patienten eindeutige Einschränkungen, sowohl im Bereich der unteren als auch der oberen Extremitäten. Die Patienten E und F wiesen eine ausgeprägte Beteiligung der Handmuskulatur mit Atrophien und Muskelschwäche auf, die Handmuskulatur des Patienten D war dagegen normal.

Die apparative Diagnostik mit Hilfe des EMGs ergab bei allen Patienten Veränderungen, die mit einer Myopathie vereinbar waren, auch die Muskelbiopsie zeigte, sofern durchgeführt, das typische Bild einer IBM.

Somit zeigt sich bei allen Patienten das Bild einer ausgeprägten Myopathie, das Befallsmuster ist analog zur Literatur dabei sehr heterogen und offensichtlich nicht mit dem Ort der Mutation in Korrelation zu bringen.

47% der Patienten mit einer IBMPFD zeigen Symptome eines ossären M. Paget (Kimonis et al. 2008). In dem hier untersuchten Kollektiv konnte zum Zeitpunkt der Untersuchung ein

M. Paget in keinem der Fälle nachgewiesen werden. Weder waren radiologische oder nuklearmedizinische Untersuchungen positiv, noch die alkalische Phosphatase im Serum erhöht.

Ca. 37% der Patienten entwickeln im Verlauf Ihrer Erkrankung eine neurologische Symptomatik im Sinne einer Frontotemporalen Demenz (Kimonis et al. 2008). Auch in dem hier untersuchten Kollektiv fanden sich bereits Hinweise auf eine beginnende Demenz mit Wesensveränderungen (Patient D), bzw. bereits eine manifeste frontotemporal betonte Demenz (Patient E). Patient F litt zum Zeitpunkt der Untersuchung noch unter keinen kognitiven Einschränkungen.

Das untersuchte Kollektiv ist sicherlich zu klein um verlässliche Aussagen mit statistischer Signifikanz zu erlauben. Allerdings zeigt sich unter Einbeziehung der Beobachtungen in der Literatur bei allen drei Patienten das typische Bild einer IBMPFD. Sehr schön lässt sich zeigen, dass das Krankheitsbild in seiner Symptomatik sehr heterogen ist und sich allein aufgrund des Mutationslokus keine Aussage über die Beteiligung der verschiedenen Organsysteme oder den Schweregrad der Erkrankung treffen lässt. Dies unterstreicht die hohe Relevanz einer guten klinischen Untersuchung bei der Diagnostik.

2.2. DIE DELETION D120DEL

2.2.1. Klinischer Verlauf

Die klinische Symptomatik der Patientin mit myopathischen Veränderungen und der sehr früh aufgetretenen frontotemporalen Demenz deutete schnell auf das Vorliegen einer IBMPFD hin. Bei der Mutationsanalyse des *VCP*-Gens fanden wir eine heterozygote Deletion des Basentriplets GAT, die konsekutiv zu einem Verlust eines Aspartats in Position 120 führte. Dies ist unseres Wissens die erste Mutation auf Exon 4 des *VCP*-Gens, die beschrieben ist, sowie die erste Deletion im *VCP*-Gen überhaupt. Diese genetische Veränderung fand sich nicht in 100 Kontrollchromosomen und betraf einen phylogenetisch hochkonservierten Aminosäurerest. Somit konnte die Verdachtsdiagnose einer IBMPFD molekulargenetisch bestätigt werden.

Wie von Patientendaten aus größer angelegten Übersichtsarbeiten bekannt, ist auch der Verlauf dieser Patientin relativ typisch für eine IBMPFD (Kimonis et al. 2008; Wehl et al. 2009). Es handelt sich hierbei zum Zeitpunkt der Untersuchung um einen bisymptomatischen Verlauf einer IBMPFD mit Myopathie und FTD, wie er sich in der Literatur bei ca. 20% der Fälle finden lässt (Kimonis et al. 2008). Die Primärsymptomatik bestand in einer proximal ausgeprägten symmetrischen Muskelschwäche mit Scapula alata, Beeinträchtigung der Armelevation und auffälligem Gangmuster (Trendelenburg-Hinken entsprechend proximaler Schwäche der Hüftmuskulatur). Die myopathischen Veränderungen fanden sich auch in elektrophysiologischen Tests. Auch die unauffälligen Laborparameter, allen voran eine normale Kreatinkinase, stimmten mit den

Beobachtungen in der Literatur überein. Histologische Untersuchungen der Muskeln zeigten, wie auch in der Literatur beschrieben, ein eher diffuses myopathisches Bild. Typische rimmed vacuoles konnten zum damaligen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden.

Auffällig ist allerdings, dass die myopathischen Beschwerden als Erstsymptomatik relativ spät mit 52 Jahren einsetzten, dann aber sehr schnell progredient verliefen, sodass bereits nach ca. 8 Jahren die Gehfähigkeit fast vollständig eingeschränkt war. Auch die relativ rasche Verschlechterung im kognitiven Bereich, die innerhalb von 9-10 Jahren nach Auftreten der Myopathie zu dem Vollbild einer frontotemporalen Demenz mit weitgehendem Verlust der Alltagskompetenz und vollständiger Pflegebedürftigkeit geführt haben, sind im Vergleich eher untypisch, sodass insgesamt festgestellt werden kann, dass bei dieser Patientin ein später Beginn der Primärsymptomatik mit schneller progredienter Verschlechterung der Myopathie und Demenz vorliegt. Ob dies allein durch den Mutationstyp, die Deletion einer Aminosäure, erklärt werden kann oder ob es sich um einen individuell abweichenden Verlaufstyp einer IBMPFD handelt, lässt sich aufgrund der Erstbeschreibung einer Deletion im *VCP*-Gen und der Beschreibung dieses Einzelfalles nicht abschließend beurteilen.

2.2.2. Funktionelle Untersuchungen der Mutation

Da bisher nur Mutationen mit einzelner Basenaustausch näher charakterisiert wurden, wollten wir nun den Einfluss einer Deletion im *VCP*-Gen näher untersuchen. Die Funktionen von *VCP* sind mannigfaltig. Alle möglicherweise betroffenen Stoffwechselwege abzudecken, würde den Umfang dieser Arbeit sicherlich sprengen. Deshalb sollten exemplarisch zwei Fragestellungen herausgegriffen werden. Geeignete Fragestellungen dafür sind der Einfluss der Mutation auf die Autophagie in der Zelle, sowie der Einfluss dieser Mutation auf die Myosinfibrillenbildung und die Sarkomerstruktur ausdifferenzierter Myoblasten. Diese beiden Teilbereiche bieten sich besonders deshalb an, da sie bereits für die Hotspot Mutation an Position 155 gut untersucht sind und sich somit genügend Daten für Vergleichsanalysen finden lassen. Der Einfluss auf die Myofibrillenbildung ist zudem sehr anschaulich, da hier anhand der Strukturveränderungen gut darstellbar ist, warum diese Erkrankung zu einer Myopathie führen kann.

Auswirkungen der Mutation auf die Autophagie

Zwar ist die Rolle von *VCP* in der Pathogenese der IBMPFD weitgehend unbekannt, doch wurden in den letzten Jahren von einigen Arbeitsgruppen große Fortschritte gemacht, was die Aufklärung der Funktion des Proteins in der Zelle betrifft. Dabei scheint *VCP* eine Schlüsselrolle in der Regulation von Autophagiemechanismen, genauer der Autolysosomenreifung, zu spielen. Wie oben beschrieben, akkumulieren sowohl *in vivo* als auch in Zellkulturexperimenten dysfunktionale Autophagosomen in der IBMPFD-Zelle.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Störung der Autophagiemechanismen eine zentrale Rolle in der Pathologie spielt. Als Marker für eine gestörte Autolysosomenreifung und Akkumulation der Autophagosomen wurde das sehr kleine Protein LC3, genauer dessen Isotyp LC3B-II, sowie das Protein p62 vorgeschlagen (Ju et al. 2009; Badadani et al. 2010; Tresse et al. 2010). In den Versuchen zeigt sich im Vergleich zu Kontrollmyoblasten bei Zellen mit der *VCP*-Mutation R155H ein signifikanter Anstieg von LC3B-II und p62, was auf eine Störung bei Autophagiemechanismen hinwies (Ju et al. 2009; Badadani et al. 2010; Tresse et al. 2010). Unser Ziel war es, die Hypothese zu überprüfen, dass auch die *VCP*-Mutation D120del zu einer Störung der Autolysosomenreifung führt und demzufolge LC3B-II und p62 ansteigen. In *in vitro* Experimenten konnte analog zur Literatur ein signifikanter Anstieg beider Proteine nachgewiesen werden, sodass der Rückschluss nahe liegt, dass auch diese Deletion die Autophagie in der Zelle beeinträchtigt und so auf der gleichen Ebene zur Pathophysiologie beiträgt wie die in der Literatur untersuchten *VCP*-Mutanten. Aus Mangel an Patientenmyoblasten konnte dieser Versuch nur mit Mausmyoblasten in Kultur, in die eine *VCP*-D120del-Mutante transfiziert wurde, durchgeführt werden. Um weitere Aussagen über die Pathogenese treffen zu können, sollte dies in Experimenten mit menschlichen Kulturmyoblasten, bzw. mit Patientenmyoblasten überprüft werden. Auch die Etablierung eines Mausmodells mit der Mutante *VCP* D120del wäre sicherlich interessant und könnte zu ergänzenden Erkenntnissen bezüglich des Muskelphänotyps und des Einflusses der Mutation auf Gehirn und Knochenstoffwechsel führen.

Einfluss auf das Myosinassembling

95% der IBMPFD Patienten leiden an einer Muskelschwäche (Kimonis et al. 2008). Myopathische Symptome sind dabei auch fast immer die Primärsymptomatik und schränken die Patienten frühzeitig in ihrer Lebensqualität massiv ein. Darüber hinaus sind es muskuläre Komplikationen, die in den meisten Fällen im Endstadium der IBMPFD zum Tod führen. In histologischen Untersuchungen wird gelegentlich die Ursache der Muskelpathologie mit dem Auftreten der rimmed vacuoles in den Muskelzellen erklärt. Dennoch sind auch Patienten, bei denen sich keine rimmed vacuoles in der Biopsie finden, von den Folgen des bindegewebigen Umbaus und der Atrophie der Muskulatur stark betroffen. In einigen Publikationen der letzten Jahre wurde deshalb verstärkt der Fokus auf den Einfluss der *VCP*-Mutationen auf die Myofibrillenbildung gelegt.

Janiesch et al. konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie im Vergleich zwischen Myoblasten eines Patienten, der Träger der *VCP*-Mutation R155C war, und Myoblasten einer gesunden Kontrollperson deutliche Störungen in der Myofibrillogenese nachweisen. Vor allem die Anordnung der Aktinfilamente schien im Vergleich zu den Kontrollmyoblasten deutlich beeinträchtigt (Janiesch et al. 2007).

Für unsere Versuche standen keine Patientenmyoblasten zur Verfügung. Deshalb bedienten wir uns der Methode der Transdifferenzierung. Mit Hilfe des Adenovirus

Ad5.f50.AdApt.MyoD wurden Fibroblasten der Patientin mit der VCP-Mutation D120del zu Myoblasten transdifferenziert und zu Myotuben ausdifferenziert. Dabei konnte analog zu den Ergebnissen von Janiesch et al. gezeigt werden, dass die Myofibrillenbildung bei den mutierten Zellen im Vergleich zu passend ausgewählten Kontrollzellen, deutlich gestört ist. Dies zeigte sich besonders gut in der FITC-Phalloidin-Färbung, die spezifisch die Aktinfilamente anfärbt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch die Deletion D120del zu Störungen bei der Myosinfibrillenbildung führt und damit einen Aspekt der Myopathie erklärt. Daneben konnte gezeigt werden, dass sich transdifferenzierte Fibroblasten als Modell für funktionelle Untersuchungen hervorragend eignen und zu ähnlichen Ergebnissen führen, wie aus Skelettmuskel isolierte humane Myoblasten. Zwar sollten auch hier noch Vergleichsversuche mit Myoblasten angeschlossen werden, sowie Patientenmyoblasten mit der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden, dennoch geben bereits diese Ergebnisse gute Hinweise darauf, dass bei der Deletion ähnliche muskuläre Pathogenitätsmechanismen eine Rolle spielen können wie vorbeschrieben (Janiesch et al. 2007). Des Weiteren soll hier die adenovirale Transdifferenzierung von Fibroblasten als ergänzende Alternativmethode zu der gängigen Muskelbiopsie vorgeschlagen werden. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass funktionelle Untersuchungen in Myotuben, die aus Fibroblasten abgeleitet wurden, äquivalente Ergebnisse wie Myoblasten liefern. Dies wurde auch bei Untersuchungen der mitochondrialen DNA bestätigt (Bulst et al. 2012).

Eignung von transdifferenzierten Fibroblasten in der Diagnostik

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die Methode der adenoviralen Transdifferenzierung von humanen Fibroblasten in Myoblasten mit anschließender Differenzierung in Myotuben etabliert werden. Durch den Nachweis von Desmin in der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich zum einen tatsächlich Myoblasten bilden, zum anderen funktionierte auch die Differenzierung zu Myotuben, wie sich anhand der Ausbildung einer charakteristischen regelhaften Sarkomerstruktur belegen ließ. Für unsere Untersuchungen musste der Patientin keine invasive Muskelbiopsie zugemutet werden, sondern lediglich eine Hautbiopsie zur Gewinnung der Fibroblasten. Nun stellt sich die Frage, ob man nicht grundsätzlich auf Muskelbiopsien in der Diagnostik verzichten könnte. Dies ist für die Untersuchungen hinsichtlich der Myofibrillenbildung und mechanischer Eigenschaften sicherlich zu bejahen. Allerdings ist die Diagnostik vielschichtiger. Durch die Transdifferenzierung greift man elementar in den Zellzyklus ein und verändert die Reifungseigenschaften der Zelle. Deshalb lassen sich Fragestellungen zum regenerativen Potential sowie zu den Reifungseigenschaften selbst sicherlich nur sehr kritisch beurteilen. Die Abgrenzung zu entzündlichen Muskelerkrankungen und die Beurteilung der Muskelarchitekturstörungen können auf diese Weise nicht durchgeführt werden. Daher wird eine klassische histologische Untersuchung des Muskelzellverbandes weiterhin ihren wichtigen Stellenwert in der Differentialdiagnose der hereditären Myopathien behalten.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist der Weg zur Diagnose einer IBMPFD erfahrungsgemäß lang. Oft ist er begleitet von primären Fehldiagnosen. Zu Gunsten des Patienten und um wichtige therapeutische Schritte nicht unnötig zu verzögern, überwiegt deshalb in der Diagnostik immer noch der Nutzen einer Muskelbiopsie gegenüber den Risiken. Für rein wissenschaftliche Fragestellungen oder falls aufgrund fehlenden Einverständnisses von Seiten des Patienten eine Muskelbiopsie nicht möglich ist, kann die Transdifferenzierungsmethode allerdings sehr wertvoll sein und könnte deshalb in Zukunft eine größere Rolle spielen.

3. Bedeutung der genetischen Diagnostik

Die Rolle der genetischen Diagnostik erblicher Erkrankungen wird gegenwärtig sehr kontrovers diskutiert. Besonders stellt sich die Frage inwiefern Patienten, die an nach aktuellem Forschungsstand unheilbaren Erkrankungen leiden, von einer solchen Testung profitieren. Für Patienten mit hereditären Muskelerkrankungen gilt dies natürlich im Besonderen. So erscheint eine flächendeckende Testung der asymptomatischen Bevölkerung unter ökonomischen und gesundheitspolitischen Gesichtspunkten auch weiterhin mehr als fragwürdig und sollte nicht empfohlen werden. Bereits symptomatische Patienten profitieren jedoch enorm von genetischer Diagnostik. Auch wenn bis heute für die meisten Erkrankungen keine kausale Therapie angeboten werden kann, so hilft es den behandelnden Ärzten und dem Patienten meist immens, wenn die Erkrankung in eine medizinische Klassifikation eingeordnet werden kann. Allein den Fragestellungen, die sich für Patienten mit Erbkrankheiten im Bereich der Familien- und Lebensplanung ergeben, können nur dank einer qualifizierten humangenetischen Beratung, der eine qualitativ hochwertige Gendiagnostik vorausgegangen ist, begegnet werden.

Darüber hinaus kann dem betroffenen Patienten durch Erkenntnisse und Erfahrungen, die weltweit mit diesen seltenen Erkrankungen gewonnen werden, auch ganz akut in seiner Situation geholfen werden. Beispiele hierfür sind die Prävention von Komplikationen durch engmaschiges Monitoring, medikamentöse Therapie und Umstellung von Lebensgewohnheiten (z.B. Kardiomyopathie bei der IBMPFD). Ohne eine sinnvolle Klassifikation dieser seltenen Erkrankungen und international korrespondierenden Netzwerken spezialisierter Kliniken, wären solche Erkenntnisse nur schwer zu beschaffen und untereinander zu vergleichen.

4. Ausblick

Aktuell beschränken sich die Möglichkeiten für Patienten mit GNE-Myopathie und IBMPFD weitgehend auf humangenetische Beratung, supportive Maßnahmen und Prävention von Komplikationen. Eine kausale Therapie ist derzeit leider noch nicht vorhanden und in absehbarer Zukunft scheint dies auch so zu bleiben, da sich der Stand der Forschung in diesem Bereich noch in einem sehr frühen Stadium befindet. Erste Mechanismen wurden aber bereits verstanden und konnten in Modellstudien und histologischen Untersuchungen

bestätigt werden. Auch schreitet die Klassifikation der Erkrankungen weiter voran, was die Grundlage für eine vernünftige Diskussion und Wissensaustausch internationaler Forscher ist.

Dass dieses Vorgehen durchaus Erfolg hat und auch sehr plötzlich in kausalen Therapien niederschlagen kann, hat sich in der Vergangenheit u.a. bereits bei zwei hereditären Muskelerkrankungen gezeigt: Die Muskeldystrophie Duchenne und der Morbus Pompe können bereits heute relativ erfolgreich durch Exon-Skipping in eine weniger beeinträchtigende Form der Erkrankung verändert werden (Duchenne) oder durch Supplementierung des defekten Enzyms (M. Pompe) therapiert werden (Toscano and Schoser 2012; Verhaart and Aartsma-Rus 2012).

Diese beiden Krankheitsbilder stehen exemplarisch dafür, wie durch präzise Diagnostik und hartnäckige Forschung auf molekularer Ebene Therapien für betroffene Patienten entwickelt werden können.

Welches die besten Strategien bei GNE-Myopathie und IBMPFD sein werden, bleibt weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

VI) ZUSAMMENFASSUNG

Die Gruppe der hereditären Einschlusskörpermyopathien (*hereditary inclusion body myopathy; hIBM*) umfasst eine Vielzahl an erblich bedingten Muskelerkrankungen mit dem Hauptsymptom der Muskelschwäche, die im frühen bis mittleren Erwachsenenalter auftritt. Dabei handelt es sich um sehr seltene Erkrankungen mit einer heterogenen klinischen Symptomatik.

Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Einschlusskörpermyopathie die Kandidatengene *GNE* und *VCP* auf krankheitsrelevante Mutationen hin zu überprüfen und durch klinische und molekularbiologische Charakterisierung einzelner Mutationen die molekulare Pathogenese der Erkrankung näher zu analysieren.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA von 26 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer *GNE*-Myopathie oder IBMPFD (Einschlusskörpermyopathie assoziiert mit M. Paget und frontotemporaler Demenz) auf Mutationen untersucht. Zusammengesetzt heterozygote oder homozygote Mutationen im *GNE*-Gen führen zum Krankheitsbild der *GNE*-Myopathie (früher als HIBM2 bezeichnet), während für die IBMPFD eine autosomal dominante Mutation im *VCP*-Gen ursächlich ist.

Drei Patienten trugen unterschiedliche Mutationen im *GNE*-Gen, das für das bifunktionale Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) kodiert. Eine der neu identifizierten Mutationen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Das mittlere Manifestationsalter der *GNE*-Myopathie beträgt 20 Jahre. Als Erstsymptomatik fällt dabei primär eine Muskelschwäche und -atrophie der distalen und proximalen Muskulatur auf, wobei der M. quadriceps femoris typischerweise ausgespart bleibt. Die Krankheit verläuft progredient und führt im Schnitt nach ca. 15 Jahren zur Rollstuhlpflichtigkeit.

Bei insgesamt vier der untersuchten Patienten konnte eine Mutation im *VCP*-Gen, das für das Valosin-containing protein (*VCP*) kodiert, festgestellt werden. Mutationen in diesem Gen führen zu einer IBMPFD, die durch die Symptomtrias Einschlusskörpermyopathie, Morbus Paget und früh einsetzender frontotemporaler Demenz gekennzeichnet ist. Mit einem mittleren Manifestationsalter von 45 Jahren zeigen sich bei den Patienten Symptome einer langsam progredienten distalen und proximalen Muskelschwäche, die sich initial vor allem im Bereich der Hüftmuskulatur und des Schultergürtels mit Auftreten einer Scapula alata manifestiert und meist durch eine Gehschwäche auffällt. Im weiteren Verlauf können dann fakultativ Symptome eines ossären M. Paget und einer frontotemporalen Demenz hinzutreten.

VCP gehört zur Gruppe der AAA-ATPasen, die in der Zelle mannigfaltige Funktionen erfüllen, die bisher nicht vollständig verstanden sind. *VCP* spielt auch eine Schlüsselrolle

bei der Autophagie der Zelle. Durch Mutationen im *VCP*-Gen wird die Autophagosomenreifung gestört, was zu einer intrazellulären Akkumulation von Proteinen und zur Vakuolenbildung führt. Dadurch ist die Myofibrillenbildung beeinträchtigt und könnte damit einen Teil des Pathomechanismus der IBMPFD erklären. Diese Mechanismen sind für die häufigste humane Mutation im *VCP*-Gen (R155H) bereits gut untersucht. Unsere Versuche konnten bestätigen, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit weltweit erste beschriebene Deletion im *VCP*-Gen (D120del) Störungen im Bereich der Autophagie verursacht. Auch auf struktureller Ebene wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Störung der Myofibrillenbildung nachgewiesen. Daraus ergaben sich neben der klinischen Symptomatik gute Hinweise, dass die Deletion D120del auf einer ähnlichen Ebene wie die Mutation R155H pathophysiologische Mechanismen der IBMPFD beeinflusst.

Für Patienten mit hereditären Myopathien spielt die genetische Diagnostik eine große Rolle, sei es in Hinblick auf Prognose, Familienplanung, humangenetische Beratung oder Therapieoptionen. Die konsequente systematische Charakterisierung neuer Mutationen auf klinischer sowie zell- und molekularbiologischer Ebene und die enge internationale Zusammenarbeit spezialisierter Zentren werden zum weiteren Verständnis dieser komplexen Krankheitsbilder beitragen und bilden die Grundlage für einen therapieorientierten Forschungsansatz.

LITERATUR

- Argov, Z., I. Eisenberg, et al. (2003). "Hereditary inclusion body myopathy: the Middle Eastern genetic cluster." Neurology **60**(9): 1519-1523.
- Argov, Z., E. Tiram, et al. (1997). "Various types of hereditary inclusion body myopathies map to chromosome 9p1-q1." Ann Neurol **41**(4): 548-551.
- Argov, Z. and R. Yarom (1984). ""Rimmed vacuole myopathy" sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews." J Neurol Sci **64**(1): 33-43.
- Badadani, M., A. Nalbandian, et al. (2010). "VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease." PLoS One **5**(10).
- Boyault, C., B. Gilquin, et al. (2006). "HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover." EMBO J **25**(14): 3357-3366.
- Bulst, S., E. Holinski-Feder, et al. (2012). "In vitro supplementation with deoxynucleoside monophosphates rescues mitochondrial DNA depletion." Mol Genet Metab.
- C, B. J. (1974). "HeLa (for Henrietta Lacks)." Science **184**(4143): 1268.
- Confalonieri, F., J. Marsault, et al. (1994). "SAV, an archaeobacterial gene with extensive homology to a family of highly conserved eukaryotic ATPases." J Mol Biol **235**(1): 396-401.
- Dalal, S., M. F. Rosser, et al. (2004). "Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the secretory pathway." Mol Biol Cell **15**(2): 637-648.
- Darin, N., M. Kyllerman, et al. (1998). "Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia, and rimmed vacuoles." Ann Neurol **44**(2): 242-248.
- DeLaBarre, B. and A. T. Brunger (2003). "Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains." Nat Struct Biol **10**(10): 856-863.
- Dennis, J. W. and S. Laferte (1985). "Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells." Cancer Res **45**(12 Pt 1): 6034-6040.
- Dubourg, O., J. Wanschitz, et al. (2011). "Diagnostic value of markers of muscle degeneration in sporadic inclusion body myositis." Acta Myol **30**(2): 103-108.
- Edelman, G. M. and K. L. Crossin (1991). "Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology." Annu Rev Biochem **60**: 155-190.
- Eisenberg, I., N. Avidan, et al. (2001). "The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy." Nat Genet **29**(1): 83-87.
- Eisenberg, I., G. Grabov-Nardini, et al. (2003). "Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps." Hum Mutat **21**(1): 99.

- Eisenberg, I., H. Hochner, et al. (2001). "Physical and transcriptional map of the hereditary inclusion body myopathy locus on chromosome 9p12-p13." Eur J Hum Genet **9**(7): 501-509.
- Feiler, H. S., T. Desprez, et al. (1995). "The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells." EMBO J **14**(22): 5626-5637.
- Ferreiro, A., C. Ceuterick-de Groote, et al. (2004). "Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene." Ann Neurol **55**(5): 676-686.
- Forman, M. S., I. R. Mackenzie, et al. (2006). "Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations." J Neuropathol Exp Neurol **65**(6): 571-581.
- Goebel, H. and M. Fardeau (2004). "121st ENMC International Workshop on Desmin and Protein Aggregate Myopathies. 7-9 November 2003, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **14**(11): 767-773.
- Greenberg, S. A., G. D. Watts, et al. (2007). "Nuclear localization of valosin-containing protein in normal muscle and muscle affected by inclusion-body myositis." Muscle Nerve **36**(4): 447-454.
- Guyant-Marechal, L., A. Laquerriere, et al. (2006). "Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features." Neurology **67**(4): 644-651.
- Halawani, D. and M. Latterich (2006). "p97: The cell's molecular purgatory?" Mol Cell **22**(6): 713-717.
- Haubenberger, D., R. E. Bittner, et al. (2005). "Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene." Neurology **65**(8): 1304-1305.
- Havenga, M. J., A. A. Lemckert, et al. (2002). "Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease." J Virol **76**(9): 4612-4620.
- Hinderlich, S., M. Berger, et al. (2001). "Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase." Biol Chem **382**(2): 291-297.
- Hocking, L. J., G. J. Lucas, et al. (2002). "Domain-specific mutations in sequestosome 1 (SQSTM1) cause familial and sporadic Paget's disease." Hum Mol Genet **11**(22): 2735-2739.
- Hubbers, C. U., C. S. Clemen, et al. (2007). "Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle." Brain **130**(Pt 2): 381-393.
- Huizing, M. and D. M. Krasnewich (2009). "Hereditary inclusion body myopathy: a decade of progress." Biochim Biophys Acta **1792**(9): 881-887.
- Janiesch, P. C., J. Kim, et al. (2007). "The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy." Nat Cell Biol **9**(4): 379-390.
- Ju, J. S., R. A. Fuentealba, et al. (2009). "Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease." J Cell Biol **187**(6): 875-888.
- Kalaydjieva, L., H. Lochmuller, et al. (2005). "125th ENMC International Workshop: Neuromuscular disorders in the Roma (Gypsy) population, 23-25 April 2004, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **15**(1): 65-71.

- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, et al. (2003). "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress." Cell **115**(6): 727-738.
- Kimonis, V. E., E. Fulchiero, et al. (2008). "VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder." Biochim Biophys Acta **1782**(12): 744-748.
- Kimonis, V. E., S. G. Mehta, et al. (2008). "Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia." Am J Med Genet A **146A**(6): 745-757.
- Kimonis, V. E. and G. D. Watts (2005). "Autosomal dominant inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia." Alzheimer Dis Assoc Disord **19 Suppl 1**: S44-47.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." Autophagy **4**(2): 151-175.
- Kovach, M. J., B. Waggoner, et al. (2001). "Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia." Mol Genet Metab **74**(4): 458-475.
- Krause, S. (2011). Pathogenese und Diagnostik hereditärer Proteinaggregat-Myopathien. Friedrich-Baur-Institut der Klinik für Neurologie, Ludwig-Maximilians-Universität München. **Habilitation**.
- Krause, S., T. Gohringer, et al. (2007). "Brain imaging and neuropsychology in late-onset dementia due to a novel mutation (R93C) of valosin-containing protein." Clin Neuropathol **26**(5): 232-240.
- Krause, S., B. Schlotter-Weigel, et al. (2003). "A novel homozygous missense mutation in the GNE gene of a patient with quadriceps-sparing hereditary inclusion body myopathy associated with muscle inflammation." Neuromuscul Disord **13**(10): 830-834.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Laurin, N., J. P. Brown, et al. (2002). "Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone." Am J Hum Genet **70**(6): 1582-1588.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees, et al. (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." Arch Pathol Lab Med **133**(9): 1463-1467.
- Martinsson, T., N. Darin, et al. (1999). "Dominant hereditary inclusion-body myopathy gene (IBM3) maps to chromosome region 17p13.1." Am J Hum Genet **64**(5): 1420-1426.
- Martinsson, T., A. Oldfors, et al. (2000). "Autosomal dominant myopathy: missense mutation (Glu-706 --> Lys) in the myosin heavy chain IIa gene." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14614-14619.
- Matrosovich, M. and H. D. Klenk (2003). "Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding." Rev Med Virol **13**(2): 85-97.
- Moscat, J. and M. T. Diaz-Meco (2009). "p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer." Cell **137**(6): 1001-1004.

- Neumann, M., I. R. Mackenzie, et al. (2007). "TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations." J Neuropathol Exp Neurol **66**(2): 152-157.
- Neumann, M., D. M. Sampathu, et al. (2006). "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." Science **314**(5796): 130-133.
- Nishino, I., M. C. Malicdan, et al. (2005). "Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles." Acta Myol **24**(2): 80-83.
- Nishino, I., S. Noguchi, et al. (2002). "Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy." Neurology **59**(11): 1689-1693.
- Nonaka, I., N. Sunohara, et al. (1981). "Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation." J Neurol Sci **51**(1): 141-155.
- Pandey, U. B., Z. Nie, et al. (2007). "HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS." Nature **447**(7146): 859-863.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, et al. (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." J Biol Chem **282**(33): 24131-24145.
- Park, K. Y., M. C. Dalakas, et al. (2000). "Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy." J Med Genet **37**(11): 851-857.
- Penner, J., L. R. Mantey, et al. (2006). "Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy." Biochemistry **45**(9): 2968-2977.
- Piercy, R. J., H. Zhou, et al. (2007). "Desmin immunolocalisation in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **17**(4): 297-305.
- Pinter, M., G. Jekely, et al. (1998). "TER94, a Drosophila homolog of the membrane fusion protein CDC48/p97, is accumulated in nonproliferating cells: in the reproductive organs and in the brain of the imago." Insect Biochem Mol Biol **28**(2): 91-98.
- Rens-Domiano, S. and T. Reisine (1991). "Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors." J Biol Chem **266**(30): 20094-20102.
- Renz-Polster, H., S. Krautzig, et al. (2008). *Basislehrbuch Innere Medizin : kompakt - greifbar - verständlich*. München [u.a.], Elsevier.
- Saito, F., H. Tomimitsu, et al. (2004). "A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins." Neuromuscul Disord **14**(2): 158-161.
- Salama, I., S. Hinderlich, et al. (2005). "No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 221-226.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.

- Schroder, R., G. D. Watts, et al. (2005). "Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia." Ann Neurol **57**(3): 457-461.
- Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, et al. (2010). "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." Nat Methods **7**(8): 575-576.
- Sparks, S. E., C. Ciccone, et al. (2005). "Use of a cell-free system to determine UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase activities in human hereditary inclusion body myopathy." Glycobiology **15**(11): 1102-1110.
- Toscano, A. and B. Schoser (2012). "Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review." J Neurol.
- Tresse, E., F. A. Salomons, et al. (2010). "VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD." Autophagy **6**(2): 217-227.
- Untergasser, A., H. Nijveen, et al. (2007). "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W71-74.
- Verhaart, I. E. and A. Aartsma-Rus (2012). "Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy." Curr Opin Neurol **25**(5): 588-596.
- Vesa, J., H. Su, et al. (2009). "Valosin containing protein associated inclusion body myopathy: abnormal vacuolization, autophagy and cell fusion in myoblasts." Neuromuscul Disord **19**(11): 766-772.
- Wang, Q., C. Song, et al. (2004). "Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions." J Struct Biol **146**(1-2): 44-57.
- Watts, G. D., D. Thomasova, et al. (2007). "Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia." Clin Genet **72**(5): 420-426.
- Watts, G. D., J. Wymer, et al. (2004). "Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein." Nat Genet **36**(4): 377-381.
- Weihl, C. C., A. Pestronk, et al. (2009). "Valosin-containing protein disease: inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia." Neuromuscul Disord **19**(5): 308-315.
- Wojcik, C., M. Rowicka, et al. (2006). "Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells." Mol Biol Cell **17**(11): 4606-4618.
- Wojcik, C., M. Yano, et al. (2004). "RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis." J Cell Sci **117**(Pt 2): 281-292.
- Zhang, X., A. Shaw, et al. (2000). "Structure of the AAA ATPase p97." Mol Cell **6**(6): 1473-1484.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich möchte ich für die Möglichkeit zur Dissertation und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut herzlich danken.

Allen voran möchte ich mich bei Frau Professor Maggie Walter für die Überlassung dieses Themas, die Zuteilung der Patienten und das rege Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

Auch allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Myologie möchte ich für ihre kompetente Hilfe, Unterstützung und Geduld sowie das hervorragende Arbeitsklima im Laboralltag danken. Insbesondere vielen Dank an Rolf Stucka, Anja und Cordula Pertl, Tina Kubny, Marina Dusl und Steffi Bulst.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Dr. Sabine Krause für die Etablierung dieses Promotionsthemas, die Einarbeitung und unermüdliche Hilfe bei wissenschaftlichen und technischen Fragen, sowie die hervorragende Betreuung und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 27. Januar 2013

Markus Simon Heitzer

Dissertation eingereicht am: 27.01.2013