
**Zur genetischen Heterogenität der Muskeldystrophien:
alternative genetische Ursachen der Myotonen Dystrophie und FSHD**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON

MIRJAM LARSEN

GEBOREN IN WITZENHAUSEN

WÜRZBURG, JULI 2015

Eingereicht am _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2012 bis Juli 2015 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-Reible angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotions-Ordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Doktorarbeit in allen Teilen selbständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung sowie ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Weiterhin versichere ich an Eides statt, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre hiermit, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Die Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Hochschule oder in einem anderen Prüfungsverfahren mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Am 16. November 2011 wurde mir von der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg der akademische Grad „Diplombiologin“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, Juli 2015

Mirjam Larsen

INHALTSVERZEICHNIS

ERKLÄRUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Mutationen im menschlichen Genom.....	5
1.1.1 Diagnostik genetischer Erkrankungen	6
1.1.2 Methoden zum Nachweis von Mutationen.....	7
1.2 Neuromuskuläre Erkrankungen	9
1.2.1 Die Skelettmuskulatur	9
1.2.2 Symptomatik und Pathologie der Muskulatur	10
1.2.3 Diagnostische Ansätze	11
1.3 Genetische Heterogenität.....	13
1.4 Myotone Dystrophie (DM)	15
1.4.1 Klinische Merkmale	15
1.4.2 Genetik	16
1.4.3 Pathomechanismus	19
1.4.4 Diagnostik	23
1.5 Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD).....	26
1.5.1 Klinische Merkmale	26
1.5.2 Genetik	28
1.5.3 Pathomechanismus	32
1.5.4 Diagnostik	35
1.6 Zielsetzung	37
1.6.1 Projekt Myotone Dystrophie	37
1.6.2 Projekt FSHD	38

2	PATIENTEN UND METHODEN	41
2.1	Patienten.....	41
2.1.1	Myotone Dystrophie.....	41
2.1.2	FSHD.....	41
2.2	Allgemeine Methoden	42
2.2.1	Methoden zur Isolierung, Reinigung, Quantifizierung von Nukleinsäuren	42
2.2.2	Spaltung und Modifikation von DNA.....	44
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.4	Größenauftrennung von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese.....	50
2.2.5	Sequenzierung	51
2.3	Spezielle Methoden	54
2.3.1	NGS mit dem GS Junior.....	54
2.3.2	Spleißanalysen	57
2.3.3	Strukturanalyse von Proteinen.....	59
2.3.4	Charakterisierung des Haplotyps bei FSHD	59
2.3.5	Southern Blot.....	61
2.3.6	Untersuchung der Methylierung des D4Z4-Lokus.....	62
2.3.7	Untersuchung der X-Inaktivierung	63
2.3.8	Molecular Combing DM-Test.....	65
3	ERGEBNISSE.....	71
3.1	Projekt Myotone Dystrophie.....	71
3.1.1	Molecular Combing DM Test	71
3.1.2	Analyse von Kandidatengenomen als alternative Ursache von DM.....	77
3.2	Projekt FSHD	87
3.2.1	Charakterisierung der FSHD Typ 2.....	87
3.2.2	SMCHD1 und X-Inaktivierung	100
3.2.3	FSHD2 Ergebnisse – Zusammenfassung	104
4	DISKUSSION	107
4.1	Projekt Myotone Dystrophie.....	107
4.1.1	Molecular Combing DM-Test.....	107
4.1.2	Analyse von Kandidatengenomen als alternative Ursache von DM.....	112

4.2	Projekt FSHD	120
4.2.1	Charakterisierung der FSHD Typ 2.....	120
4.2.2	Auswirkung von Mutationen in <i>SMCHD1</i> auf die X-Inaktivierung	131
5	LITERATURVERZEICHNIS	134
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149
7	ANLAGE	152
7.1	Primerlisten.....	152
7.2	Gene des Muskelpanels	156
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	157
9	FACHKONFERENZEN	157
	LEBENS LAUF	158
	DANKSAGUNG	159

ZUSAMMENFASSUNG

Die klinische Symptomatik verschiedener erblicher Muskelerkrankungen verläuft oft erstaunlich ähnlich mit Muskelschwäche und -schwund als den hervorstechenden Alltagsproblemen. Dem gegenüber sind die genetischen Grundlagen sehr vielfältig mit > 250 bisher identifizierten Genen (muscle.genetable.org). Auch innerhalb eines definierten Krankheitsbildes werden verschiedene genetische Ursachen nebeneinander gefunden, was durch die Verknüpfung in einem gemeinsamen Pathomechanismus begründet sein kann. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Aspekten dieser genetischen Heterogenität am Beispiel der beiden häufigen Muskelerkrankungen Myotone Dystrophie (DM) und Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD), bei denen alternative genetische Ursachen, sowie anknüpfende Fragestellungen untersucht wurden.

Das erste Projekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit Fragestellungen, welche die DM betreffen. Die DM Typ 1 und Typ 2 (DM1 und DM2) bilden zusammen die häufigste Muskelerkrankung im Erwachsenenalter. Sie ist durch die gemeinsamen Symptome Myotonie, Muskelschwäche und Katarakt sowie die Beteiligung weiterer Organsysteme gekennzeichnet, was sie zu einer multisystemischen Erkrankung macht. Die genetische Ursache liegt für beide Formen in einer Repeatexpansion eines Mikrosatelliten in der untranslatierten Region zweier Gene (*DMPK* in DM1, *CNBP* in DM2). Dem gemeinsamen Pathomechanismus liegt eine toxische Funktionsgewinn-Mutation des expandierten RNA-Transkripts zugrunde.

Die beiden bekannten Formen der DM sind phänotypisch häufig nicht unterscheidbar, weshalb in vielen Fällen beide Erkrankungen molekulargenetisch untersucht werden müssen. Dabei ist die Diagnostik der DM durch die Notwendigkeit des Nachweises von sehr großen Repeatexpansionen recht aufwändig und die Bestimmung der Repeatlänge im Fall der DM2 nur eingeschränkt möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Test zum Nachweis der Repeatexpansionen auf der Basis der Methode des Molecular Combing entwickelt, welche den gleichzeitigen Nachweis der beiden Loci von DM1 und DM2 erlaubt und zusätzlich eine direkte Messung der Repeatlänge ermöglicht. Das Molecular Combing ist eine fluoreszenz-mikroskopische Einzelmolekül-Analysemethode, durch die es erstmals möglich wurde, die vermutete somatische Instabilität bei DM2 darzustellen.

Das zweite DM-Teilprojekt beschäftigt sich mit der Identifikation möglicher alternativer genetischer Ursachen für die Erkrankung. Dies wurde anhand einer Kohorte von 138 DM1- und DM2-negativen Indexpatienten mit dem typischen DM-Phänotyp untersucht. Ausgehend von dem gemeinsamen Pathomechanismus wurden die primären Krankheitsgene *DMPK* und *CNBP*, sowie *CELF1* und *MBNL1*, welche wichtige Rollen auf sekundärer Ebene des Pathomechanismus spielen, mittels *Next Generation Sequencing* untersucht. Dabei wurde eine auffällige Variante in *DMPK* gefunden, keine Varianten in *CNBP* oder *CELF1* und drei Varianten in *MBNL1*, was auf *MBNL1* als Kandidatengen einer alternativen Ursache für DM hinweist. *MBNL1* ist ein gewebespezifischer Spleißregulator, welcher einen Wechsel von einem fetalen zu einem adulten Spleißmuster im Muskel steuert. Die

Pathogenität einer der Varianten wurde in einem RNA-Spleißassay mit MBNL1-Targetgenen untersucht. Dabei konnten keine spezifischen Spleiß-Effekte festgestellt werden, aber eine Verminderung des Expressionsniveaus im Sinne einer Haploinsuffizienz. Die 3D-Modellierung dieser Variante deutet auf Änderungen der Oberflächenladungen in MBNL1 hin. Der Nachweis der Pathogenität der Varianten und somit die Ursächlichkeit von MBNL1-Mutationen für DM konnte hiermit nicht abschließend geklärt werden. Die gefundenen Ergebnisse regen jedoch hoffentlich zu nachfolgenden Studien an.

Das zweite Projekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit Fragestellungen um die FSHD. Diese bildet die dritthäufigste Muskelerkrankung, charakterisiert durch eine oft asymmetrische Schwäche der Muskulatur von Gesicht, Schultergürtel und Oberarmen. Genetisch ist die FSHD Typ 1 (FSHD1) mit einer Kontraktion des Makrosatelliten D4Z4 verknüpft, was eine Relaxation der Chromatinstruktur der Region mit sich bringt und damit die ektopische Expression des apoptotisch wirkenden Proteins DUX4 ermöglicht. Die pathogene Ausprägung dieser Funktionsgewinn-Mutation findet dabei nur in Verbindung mit einem FSHD-permissiven Haplotyp statt.

Auf der Grundlage des gleichen Pathomechanismus wurde eine zweite Form der FSHD (FSHD2) vorgestellt, bei der die Chromatinrelaxation unabhängig von der Länge von D4Z4 durch einen Defekt in dem an der DNA-Methylierung beteiligten Gen *SMCHD1* assoziiert sein soll. Die Vererbung von FSHD2 verläuft digenisch mit Mutationen in *SMCHD1* und dem FSHD-permissiven Haplotyp auf zwei unabhängigen Loci. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kohorte von 55 FSHD1-negativen Patienten mit dem typischen FSHD-Phänotyp untersucht. Dabei wurden der Haplotyp, die Methylierung von D4Z4 sowie das *SMCHD1*-Gen analysiert. Es konnten neun Patienten mit einem Defekt in *SMCHD1* identifiziert werden. In einer zweiten Kohorte von 45 FSHD1-positiven Patienten wurde untersucht, ob *SMCHD1*-Mutationen auch in Kombination mit einer Kontraktion von D4Z4 vorkommen. Dieser Fall von FSHD1+2 konnte für drei Patienten gezeigt werden, welche außerdem einen auffällig schweren Phänotyp zeigten. *SMCHD1* kann also als Modifier-Gen für die Schwere der Erkrankung bei FSHD1 angesehen werden. Damit wurden insgesamt zwölf *SMCHD1*-Mutationsträger identifiziert, davon sind zehn der Varianten noch nicht beschrieben worden. Für alle erkrankten Mutationsträger konnte eine Methylierung von D4Z4 $\leq 20\%$ ermittelt werden, was als diagnostisches Kriterium verwendet werden kann. Mit einem Anteil von 16,3 % Mutationsträger in der FSHD1-negativen Kohorte bildet FSHD2 einen bedeutenden Anteil an dem Krankheitsbild der FSHD, weshalb die entwickelten Analysen in die Routinediagnostik eingegliedert wurden.

Das zweite Teilprojekt der FSHD beschäftigt sich mit der Funktion des *SMCHD1*-Gens bei der X-Inaktivierung (XI). Es ist bekannt, dass *SMCHD1* bei weiblichen Mäusen an der Aufrechterhaltung der XI mitwirkt. Die Untersuchung der XI bei FSHD2-Frauen ergab eine extreme Verschiebung der erwarteten XI von 50:50 auf 0:100 oder 100:0 bei sechs von 13 Patientinnen. Die übrigen sieben zeigten eine XI im Normalbereich von $> 20:80$ oder $< 80:20$. Der Befund der einseitigen Verschiebung könnte auf einen negativen Selektionsdruck gegenüber Zellen mit unvollständiger XI hindeuten. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich der gleiche Effekt auch in einer größeren Kohorte wiederfindet und ob er sich mit der Art der Mutation korrelieren lässt.

SUMMARY

The clinical presentation of many inherited muscular disorders is often remarkably similar with muscle weakness and wasting as the most prominent everyday problems. By contrast, the genetic basis is highly heterogeneous with so far > 250 identified genes (muscle.genetable.org). Even within a defined disease group different genetic causes are found side by side which can be explained by linking into a common pathomechanism. The present thesis deals with different aspects of this genetic heterogeneity using the two common muscular disorders myotonic dystrophy (DM) and facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) as examples. It addresses questions on alternative genetic causes and related issues.

The first project of this work is focused on issues related to DM. DM type 1 and DM type 2 (DM1 and DM2) together represent the most frequent muscular disorder in adulthood. Clinically, the disease is characterized by the common symptoms myotonia, muscular weakness and cataract as well as multi organ involvement, making it a multisystemic disorder. The genetic cause of both forms is the expansion of a microsatellite repeat in the untranslated regions of two different genes (*DMPK* in DM1, *CNBP* in DM2). The common pathogenic mechanism is based on a toxic gain of function mutation of the expanded RNA transcript.

The two known forms of DM are phenotypically often not distinguishable which is why in many cases molecular genetic testing for both forms must be performed. In addition, the diagnosis of DM is quite challenging due to the need of detecting very large repeat expansions. Furthermore, an exact determination of repeat length in DM2 has so far not been possible. In this study, a test based on the method Molecular Combing was developed for detection of the repeat expansions, which allows for the simultaneous detection of the two loci of DM1 and DM2 in a single assay and in addition for a direct measurement of the repeat length. The Molecular Combing is a fluorescence microscopic single-molecule method which enables for the first time the visualization of the suspected somatic instability in DM2.

The second DM-project deals with the identification of possible alternative genetic causes of the disease. This was investigated by a cohort of 138 DM1- and DM2-negative index patients displaying the typical DM-phenotype. Based on the common pathogenic mechanism, the primary disease genes *DMPK* and *CNBP*, as well as *CELF1* and *MBNL1* which play important roles on a secondary level of the pathomechanism were examined by Next Generation Sequencing. One candidate variant was found in *DMPK*, no variants in *CNBP* or *CELF1* and three variants in *MBNL1*, suggesting that *MBNL1* is an alternative candidate gene for DM. *MBNL1* is a tissue-specific splicing regulator which controls the change from a fetal to an adult splicing pattern in muscle. Pathogenicity of one of the variants was tested in an RNA splicing assay with *MBNL1* target genes. No alternative splicing patterns were observed but a reduction in expression levels suggests a haploinsufficiency mechanism. 3D-modelling of this variant suggests a change in surface charge of *MBNL1*. However, the proof of the

pathogenicity of the three variants and thus the causality of MBNL1 mutations as a cause for DM still remains to be confirmed. Hopefully, our observations may foster further studies into this direction.

The second project of this thesis deals with the genetic causes of FSHD. This is the third most common muscular disorder, characterized by often asymmetric weakness of the muscles of the face, shoulder girdle and upper arms. Genetically, FSHD type 1 (FSHD1) is associated with a contraction of the macrosatellite repeat D4Z4 which induces a relaxation of the chromatin structure of the region and thus allows ectopic expression of the apoptotic DUX4 protein. Pathogenicity of this gain-of-function mutation is exclusively associated with a permissive FSHD haplotype.

Based on the same pathomechanism, a second form of FSHD (FSHD2) has been described in which chromatin relaxation is caused by a defect in the *SMCHD1* gene that is involved in DNA methylation-independent of the D4Z4 repeat length. The inheritance of FSHD2 is therefore digenic with mutations in *SMCHD1* and a FSHD permissive haplotype, located on two different chromosomes. In this study, a cohort of 55 FSHD1-negative patients displaying the typical FSHD phenotype was studied. The haplotype, methylation of D4Z4 and the *SMCHD1* gene were analyzed. A number of nine patients with mutations in *SMCHD1* could be identified. In a second cohort 45 FSHD1-positive patients were examined, addressing the question, whether *SMCHD1* mutations also occur in combination with a contraction of D4Z4. The condition of FSHD1 + 2 was found in three patients who also showed a strikingly severe phenotype. *SMCHD1* therefore can be regarded as a modifier gene for disease severity in FSHD1. In total, twelve *SMCHD1* mutation carriers were identified in this study with ten novel variants. For all affected mutation carriers methylation of D4Z4 was found to be $\leq 20\%$ which can be used as a diagnostic criterion. With a proportion of 16.3 % mutation carriers in the FSHD1-negative cohort FSHD2 represents a significant part of the clinical spectrum of FSHD. Based on these findings, a modified algorithm for routine diagnostics of FSHD is presented.

The second FSHD-project deals with the function of the *SMCHD1* gene in X-inactivation (XI). It is known that in female mice *SMCHD1* is involved in the maintenance of XI. The investigation of XI in FSHD2-women showed an extreme shift of the expected XI of 50:50 to 0:100 or 100:0 in six of 13 patients. The remaining seven patients showed XI in the normal range of $> 20:80$ or $< 80:20$. The finding of this one-sided shift could indicate a negative selection pressure against cells with incomplete XI. It would be interesting to investigate whether this effect can be confirmed in a larger cohort and whether it can eventually be correlated with the type of mutation.

1 EINLEITUNG

Die Genome verschiedener Menschen sind zu 99,5 % identisch. Die übrigen 0,5 % machen all unsere Unterschiede aus. Der allergrößte Teil wird durch Einzelnukleotid Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) und strukturelle Variationen wie Kopienzahl Veränderungen (*copy number variations*, CNVs) bestimmt. Jeder Mensch trägt ca. 3 Millionen SNPs, die vermutlich mehr als 80 % der menschlichen Vielfalt ausmachen, wie die Augen- und Haarfarbe, Größe, aber auch Prädispositionen für Erkrankungen. Der Prozess von Mutationen führt ständig zu Veränderungen in einer Population. Abhängig von der Auswirkung der Mutation kann diese in der Population bestehen und sich ausbreiten, oder nicht. Viele Veränderungen werden toleriert und tragen zu der großen phänotypischen Vielfalt bei. Wird eine genetische Veränderung nicht toleriert, kommt es zur Ausprägung einer genetischen Erkrankung [Stranger *et al.* 2007, Roberts 2010].

1.1 Mutationen im menschlichen Genom

Pathogene Veränderungen im menschlichen Genom treten in jeder Organisationsebene auf. Bei Chromosomenmutationen liegt eine Veränderung der Anzahl und/oder der Struktur eines gesamten Chromosoms vor. Als Genmutationen werden Veränderungen in einem einzelnen Gen bezeichnet. Dies können Substitutionen – Veränderungen einer einzelnen Base, Deletionen – der Verlust einer Basensequenz oder Insertionen und Duplikationen – zusätzlich eingefügte Basen sein. Betrifft diese Veränderung eine einzelne Base, wird dies als Punktmutation bezeichnet, was die häufigste Art der Mutation im menschlichen Genom darstellt. Innerhalb des kodierenden Bereiches können Mutationen als synonyme Mutation auftreten, wenn sie keine Auswirkung auf die Proteinsequenz haben, Missense-Mutationen (nicht synonym) führen zu einem Austausch der Aminosäure (AS), Nonsense-Mutationen führen zu einem Stop-Codon und damit zum vorzeitigen Abbruch des Proteins. Bei Spleiß-Mutationen liegt eine Veränderung in einer für das Spleißen essenziellen Basenposition an den Exon-Intron-Grenzen vor. Durch Mutation können aber auch weit im Intron oder innerhalb von Exons neue Spleißstellen entstehen. Durch Deletionen und Insertionen sowie durch Spleiß-Mutationen kann es zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) kommen, wodurch es zu der Bildung einer falschen AS-Sequenz und meist zu einem vorzeitigen Stop-Codon kommt. Auch Veränderungen in nichtkodierenden Sequenzen können pathogene Auswirkungen haben, z.B. in regulatorischen Sequenzen, die direkt die Aktivität eines Genprodukts beeinflussen, intronische Mutationen können das Spleißverhalten beeinträchtigen und auch Veränderungen in der Repeatzahl von repetitiven Sequenzen können sich negativ auswirken. Als repetitive Sequenzen oder Mikrosatelliten-DNA (Desoxyribonukleinsäure) wird die mehrfache Wiederholung einfacher Sequenzmotive bezeichnet, z.B. (CA)_n oder (GCC)_n, die auch innerhalb einer kodierenden Sequenz liegen und in RNA transkribiert werden können. Repeatsequenzen sind bei der Rekombination und Replikation der DNA weniger stabil als singuläre Sequenzen, daher kann es zu Repeatzahl-

verändernden Fehlern kommen. Dadurch bleibt die Repeatzahl in der Keimbahn oder auch in somatischem Gewebe nicht stabil. Ab einer bestimmten Anzahl von Wiederholungseinheiten kann dies eine pathologische Manifestation zur Folge haben.

Makrosatelliten-DNA besteht typischer Weise aus mehrfachen Wiederholungen längerer Sequenzeinheiten, die eine Funktion in der Chromosomenstruktur haben. Die Veränderung der Repeatzahl einer Makrosatelliten-DNA kann damit eine Auswirkung auf die Aktivität einer bestimmten Region haben. Epigenetische Mutationen, wie die Änderung des Methylierungszustandes eines Gens, können Auswirkungen auf die Expression dieses Gens haben und damit die Genexpression verändern.

Funktionell gesehen können Mutationen auf den Organismus verschiedene Auswirkungen haben. Es kann zwischen Funktionsgewinn (*Gain-of-Function*) Mutationen, bei denen ein Genprodukt eine neue oder gesteigerte Funktion erhält und Funktionsverlust (*Loss-of-Function*) Mutationen unterschieden werden, bei denen das Genprodukt seine Funktion verliert. Außerdem gibt es dominant negative Mutationen, bei denen im heterozygoten Zustand das mutierte Genprodukt die Funktion des wildtypischen Genprodukts aufhebt oder beeinträchtigt. Bei dem Phänomen der Haploinsuffizienz ist eine einzelne funktionierende Genkopie zur Aufrechterhaltung der Funktion nicht ausreichend.

Mutationen können in der Entwicklung an unterschiedlicher Stelle neu auftreten und haben dementsprechend eine unterschiedliche Auswirkung und Tragweite. Tritt eine Mutation während der Reifung der Keimzellen oder in der Meiose auf, so betrifft die Auswirkung der Mutation erst die nachfolgende Generation (Keimzell-Mutation). Kommt es zu einer Veränderung während der mitotischen Teilungen in der Embryonalentwicklung, so sind die entsprechenden Gewebe betroffen, die aus diesen Zellen hervorgehen (somatische Mutationen). Bei somatischen Mutationen bilden die Körperzellen ein Mosaik aus gesunden und mutationstragenden Zellen. [Holinski-Feder 2011b]

1.1.1 Diagnostik genetischer Erkrankungen

Die Indikation zur humangenetischen Diagnostik einer Person wird durch die klinische Verdachtsdiagnose einer erblichen Erkrankung gestellt. Dabei kann die Person selbst bereits Symptome einer Erkrankung zeigen (Index-Patient), oder ein verwandtes Familienmitglied kann erkrankt sein. Häufige Fragestellungen sind die Frage nach der Ursache für eine bestimmte Symptomatik und das Wiederholungsrisiko bei Kinderwunsch. Neben der Untersuchung eines Betroffenen können auch prädiktive und pränatale Testungen durchgeführt werden. Nach den Vorgaben des deutschen Gendiagnostikgesetzes soll einer humangenetischen Diagnostik immer eine Beratung vorausgehen, bei der durch eine nicht direktive Beratung eine individuelle Entscheidungshilfe gegeben werden soll. Für die meisten genetischen Erkrankungen führt das Wissen, um welche Erkrankung es sich handelt, nicht zur Heilung des Patienten, jedoch zu einem besseren Verständnis und Umgang mit der Erkrankung, einer Berücksichtigung in der Familienplanung und einer angemessenen Therapie bzw. Behandlung. [Murken und Zerres 2011]

Aus historischen und methodischen Gründen wird zwischen der Zytogenetik und der Molekulargenetik unterschieden, wobei erstere genetische Defekte auf der Ebene der Chromosomen behandelt und letztere auf der Ebene der Nukleinsäuren. Als Untersuchungsmaterial stehen alle kernhaltigen Gewebe zur Verfügung, wobei in den meisten Fällen Blut verwendet wird. Bei ungeborenen Kindern können kindliche Zellen aus dem Fruchtwasser oder aus Chorionzotten untersucht werden. Bei Erkrankungen, die sich gewebespezifisch manifestieren, kann es sinnvoll sein, auch die funktionellen Produkte der DNA – RNA oder Proteine, aus dem entsprechenden Gewebe (z.B. Muskel, Haut oder Speichel) zu untersuchen. Die Nachweismethode, die in der genetischen Diagnostik zum Einsatz kommt, richtet sich nach dem Mutationstyp, der der jeweiligen Erkrankung zugrunde liegt. [Murken *et al.* 2011]

1.1.2 Methoden zum Nachweis von Mutationen

In der Molekulargenetik kommen viele verschiedene Methoden zur Untersuchung der DNA zum Einsatz. Abhängig von der Verdachtsdiagnose bei einem Patienten werden meist Methoden zur gezielten Detektion einer bestimmten Mutation oder Screening Verfahren zur Identifizierung einer unbekannt pathogenen Mutation in einem (oder mehreren) bekannten Krankheitsgen(en) angewandt.

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische Regionen von wenigen Kilobasen (kb) angereichert werden, um diese durch Sequenzierung oder Fragmentanalyse genauer zu untersuchen. Besteht z.B. der Verdacht auf eine Punktmutation in einem bestimmten Gen, kann dieses mittels Sanger Sequenzierung sequenziert werden, um die Basensequenz des Patienten mit der Wildtyp-Sequenz vergleichen zu können. Hier werden kleinräumige Mutationen in Abschnitten bis zu 800 bp je Ansatz analysiert. Mit der Fragmentanalyse können PCR-Produkte entsprechend ihrer Länge voneinander getrennt werden, wie sie z.B. durch die Variabilität eines Mikrosatelliten-Repeats zustande kommen. Es können bereits Unterschiede von 1 bp detektiert werden. Größere Deletionen und Duplikationen z.B. ganzer Exons, können mittels MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) detektiert werden. Die zuvor genannten Methoden sind alle PCR-basiert und eignen sich nicht zum Nachweis von großräumigen genomischen Umbauten oder von Veränderungen in ausgedehnten Repeatregionen, da die Polymerase bei deren Amplifikation fehleranfällig ist oder ganz versagt. Eine Ausnahme bildet die TP-PCR (*triplet/tetraplet repeat-primed PCR*), mit der Expansionen in z.B. Triplet-Repeats detektiert werden können. Für den Nachweis ausgedehnter genomischer Umlagerungen sowie großer Kontraktionen oder Expansionen von Repeatregionen, ist die Southern Blot-Hybridisierung (SB) die Methode der Wahl. Hierbei lassen sich nicht amplifizierte genomische Sequenzen nach Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen mittels markierter Sonden spezifisch detektieren. Eine alternative Methode zur Detektion von größeren genomischen Umbauten, Kontraktionen und Expansionen ist das Molecular Combing. Durch die Hybridisierung spezifischer, markierter Sonden auf DNA-Einzelmolekülen, die uniform auf einer festen Oberfläche gestreckt vorliegen, lassen sich größere Loci im Fluoreszenz-Mikroskop darstellen und ggf. auch direkt vermessen [Michalet *et al.* 1997].

Eine neuere Methode zur Sequenzanalyse der DNA stellt das *Next Generation Sequencing* (NGS) dar. Mit dieser Hochdurchsatz Sequenziermethode lässt sich das gesamte Genom eines Menschen sequenzieren. Für diagnostische Ansätze wird dies jedoch auf kodierende Bereiche - das Exom, beschränkt, oder es werden gezielt Gene, die mit einem bestimmten Krankheitsbild assoziiert sind, betrachtet (Paneldiagnostik). Besonders für Erkrankungen mit einem unspezifischen Phänotyp oder bei genetischer Heterogenität in einem Krankheitsbild, ist dies von großem Wert, da viele Differenzialdiagnosen auf einmal analysiert werden können.

Eine wichtige Aufgabe der humangenetischen Diagnostik nach der Analyse der DNA ist die Interpretation der Daten und das Verfassen eines Befundes. Gefundene Varianten in dem untersuchten Gen eines Patienten können wie unter 1.1 beschrieben klassifiziert werden. Referenzsequenzen des menschlichen Genoms sind in den Datenbanken von NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) [Cunningham *et al.* 2015] und UCSC *Genome Bioinformatics* (<https://genome.ucsc.edu/>) [Kent *et al.* 2002] zu finden. Viele gefundene Varianten stellen nichtpathogene SNPs dar, welche in der Datenbank dbSNP aufgeführt sind. Das *1000 Genomes Project* (<http://www.1000genomes.org/>) [Genomes Project *et al.* 2012], das *NHLBI Exome Sequencing Project* (ESP) [ESP 2015] und der ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) Browser [ExAC 2015] liefern Daten zur Häufigkeit genetischer Varianten in verschiedenen ethnischen Gruppen. Literaturbekannte pathogene Varianten sind in Datenbanken wie HGMD (*The Human Gene Mutation Database*,) und LOVD (*Leiden Open Variation Database*) [Fokkema und den Dunnen 2015] eingetragen. Alle unbekanntenen Varianten stellen zunächst UVs (*unclassified variants*) dar, die mit Hilfe von Software-Tools interpretiert werden müssen. Dabei wird die Änderung der biochemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren verglichen, die evolutionäre Konservierung wird betrachtet und die Position der Aminosäure in dem Protein in Bezug auf funktionelle Domänen berücksichtigt. Vorhersageprogramme geben eine Prognose darüber ab, ob eine Variante potentiell pathogen ist, oder nicht.

Die verschiedenen Vorhersageprogramme stimmen nicht immer in ihrer Prognose überein und nur durch eine funktionelle Analyse kann die Auswirkung der Variante festgestellt werden. Zur Analyse der Auswirkung einer Spleiß-Mutation wird die RNA des entsprechenden Gens analysiert. Das Wegfallen oder die Neubildung einer Spleißstelle lässt sich auf cDNA-Ebene (komplementäre DNA) nachweisen. Die Auswirkung von AS-Austauschen ist dagegen schwieriger funktionell zu beurteilen. Die eleganteste Möglichkeit ist das Einbringen des Defekts in ein *in vivo* Modell (z.B. Zellkultur oder Modellorganismus) um die phänotypischen Auswirkungen der Mutation zu studieren. Auch die Analyse weiterer verwandter und nicht verwandter Personen kann auf die Pathogenität einer Variante hindeuten. Tragen alle erkrankten Personen den gleichen Genotyp, der den gesunden Personen fehlt und findet sich die gleiche Genotyp-Phänotyp-Korrelation auch in anderen Familien, so kann von der Pathogenität einer Variante ausgegangen werden. [Radvansky und Kadasi 2010, Holinski-Feder 2011a]

1.2 Neuromuskuläre Erkrankungen

1.2.1 Die Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur bildet zusammen mit dem Knochenskelett den Bewegungsapparat des Menschen. Daneben finden sich noch die glatte Muskulatur der Eingeweide und Gefäße sowie der Herzmuskel. Die Skelettmuskulatur ist maßgeblich an der Gestaltgebung beteiligt und ermöglicht die willkürliche Bewegung des Körpers. Dies beinhaltet die Grob- und Feinmotorik, die zum Laufen und Greifen, für Mimik, Schlucken und Sprechen benötigt wird. Diese Fähigkeiten sind von erheblicher Wichtigkeit für eine selbstständige Lebensweise, den Ausdruck und die Kommunikation mit unseren Mitmenschen. Bei Erkrankungen dieses Organsystems gehen durch den Verlust von Muskulatur diese Fähigkeiten teilweise verloren, was eine erhebliche Einschränkung des Erkrankten bedeuten kann.

Aufgebaut ist die Skelettmuskulatur aus einem Gefüge aus Bindegewebe und Muskelfasern, die über Blutgefäßen und Nerven versorgt werden. Die einzelne Muskelfaser stellt ein mehrkerniges Synzytium dar, welches sich über die gesamte Länge des Muskels erstreckt. Innerhalb dieser Muskelzellen liegen Bündel aus Myofibrillen, welche aus repetitiven Einheiten der funktionellen Grundeinheit der Muskulatur - dem Sarkomer, gebildet werden. Bei der Muskelkontraktion verkürzt sich das Sarkomer durch ein Aneinandervorbeigleiten von dicken und dünnen Filamenten, was als Gleitfilamenttheorie bezeichnet wird. Durch diese Verkürzung der Muskelfasern wird eine aktive Kraft gegen das starre Knochenskelett ausgeübt, welche als Bewegung genutzt werden kann. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau der Skelettmuskulatur gezeigt.

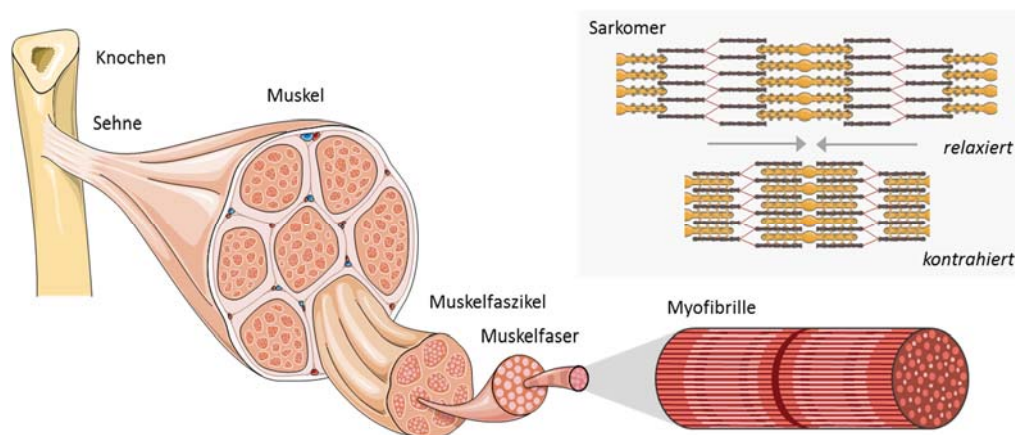


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Skelettmuskulatur. Dargestellt ist die Verankerung des Muskels über straffes Bindegewebe an den Knochen. Der Muskel besteht aus Muskelfaszikeln, die wiederum aus Muskelfasern aufgebaut sind. Jede Muskelfaser wird aus Myofibrillen gebildet, die in repetitiven Einheiten die funktionelle Grundeinheit aus Sarkomeren enthalten. Dieses kann sich durch ein Aneinandervorbeigleiten der dicken und dünnen Filamente kontrahieren, was die Grundlage für die Bewegung der Muskulatur ist. (Abbildung erzeugt mit Hilfe von Servier Medical Art, <http://www.servier.com>)

Der Muskel ist aus einer Vielzahl struktureller und funktioneller Proteine aufgebaut. Jeder Defekt in einem für Muskelproteine kodierenden Gen kann eine Einschränkung der Muskelfunktion zur Folge

haben. Trotz eines anatomisch vergleichbaren Aufbaus aller Skelettmuskeln, unterscheiden sich die einzelnen jedoch nicht nur in ihrer Form und Funktion, sondern auch in ihrer Schadenanfälligkeit gegenüber endogenen und exogenen Einflüssen. Daraus resultieren Muskelerkrankungen mit ganz unterschiedlichen, jedoch charakteristischen Verteilungsmustern.

Grundsätzlich kann eine Muskelerkrankung myogene oder neurogene Ursachen haben, je nachdem ob eine Schädigung der Muskulatur selbst oder ihrer Innervierung durch das Motoneuron vorliegt. [Müller und Zierz 2014a]

1.2.2 Symptomatik und Pathologie der Muskulatur

Die Skelettmuskulatur zeigt unter pathologischen Bedingungen nur eine begrenzte Anzahl an Symptomen und morphologischen Reaktionsweisen. Gleiche Zeichen können dabei durch unterschiedliche Prozesse bedingt sein, Ursache und Wirkung sind also nicht immer eindeutig.

Das häufigste Symptom einer Muskelerkrankung ist die Muskelschwäche, bei der die Kraft bestimmter Muskeln oder Muskelgruppen vermindert ist. Typisch ist eine spezifische Verteilung, z.B. mit einer betont proximalen (Schulter- und Beckengürtel, Oberarme und Oberschenkel) oder distalen (Unterarme, Unterschenkel, Hand- und Fußmuskulatur) Muskelschwäche, die Schwäche kann auch asymmetrisch sein. Ursache der Muskelschwäche kann eine Dystrophie, also eine degenerative Veränderung der Muskulatur sein. Dabei kann der Muskel atrophisch werden, was einen wahrnehmbaren Muskelschwund bedeutet, oder auch hypertrophieren. Im Gegensatz zu einer Zunahme der Muskelmasse bei der echten Muskelhypertrophie findet sich bei der Pseudohypertrophie ein Umbau in Binde- und Fettgewebe. Ein für manche Erkrankungen charakteristisches Symptom ist die Myotonie. Sie äußert sich durch das Unvermögen des Patienten unmittelbar nach einer willkürlichen Kontraktion den Muskel wieder zu relaxieren. Ist der Muskel dauerhaft kontrahiert, wird dies als Kontraktur bezeichnet. Auch unwillkürliche Kontraktionen (Krampi) und spontane Kontraktionen (Faszikulationen) können auftreten. Der Muskeltonus beschreibt den Spannungszustand der Muskulatur. Ist diese Grundspannung vermindert, wird von Hypotonie gesprochen, was in zahlreichen Erkrankungen eine Rolle spielt und bereits bei Neugeborenen auftreten kann (*floppy baby*). Daneben finden sich auch Muskelschmerzen (Myalgien) als mögliches Symptom.

Die eben beschriebenen Symptome werden durch verschiedene Prozesse verursacht, die im Gewebe durch histochemische Untersuchungen nachgewiesen werden können. Dabei treten unspezifische Befunde und krankheitsspezifische Einzelbefunde auf. Der häufigste Befund sind Veränderungen der Muskelfaser mit Änderungen des Muskelfaserdurchmessers oder der Verteilung sowie Kernanomalien. Bei dystrophischen Prozessen finden sich degenerative und nekrotische Muskelfasern in der Biopsie. Manche Strukturanomalien des Muskels finden sich als unspezifische Veränderungen bei vielen Grunderkrankungen, während andere spezifisch auf eine bestimmte Erkrankung hinweisen. Eine Ansammlung von Entzündungszellen kennzeichnet den Befund entzündlicher Infiltrate, der als unspezifisches Begleitphänomen bei vielen neuromuskulären Erkrankungen auftritt. Abbildung 2 zeigt beispielhaft histologische Bilder der normalen

Skelettmuskulatur im Vergleich zu einem dystrophischen Muskel. [Kraya und Zierz 2014, Müller und Zierz 2014b]

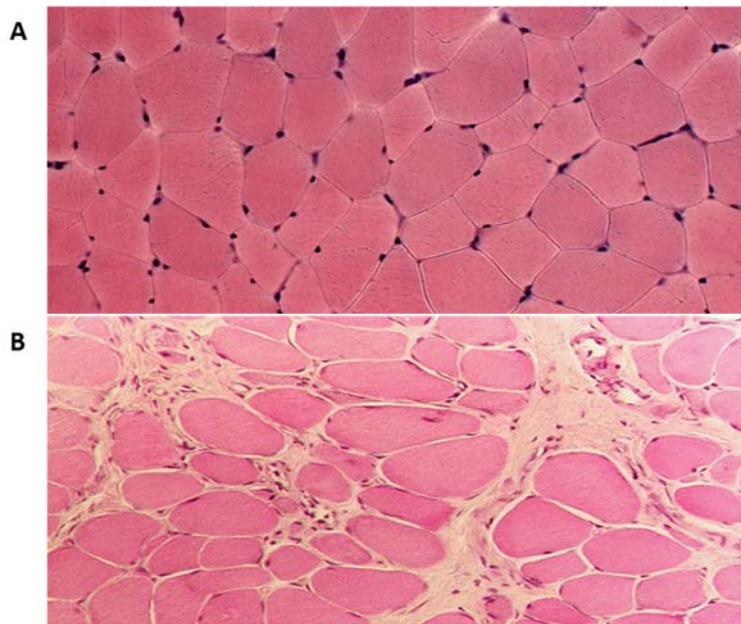


Abbildung 2: *Histologische Bilder der Skelettmuskulatur. (A) Normaler Muskel. (B) Dystrophischer Muskel mit Kalibervariation, Muskelfaserdegeneration mit atrophischen und hypertrophischen Fasern und entzündlichen Infiltraten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H+E). (Bilder freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Benedikt Schoser, Friedrich Baur Institut der Neurologischen Klinik LMU München)*

1.2.3 Diagnostische Ansätze

Die Diagnostik eines Patienten mit dem Verdacht auf eine neuromuskuläre Erkrankung beinhaltet verschiedene Untersuchungen. Bei der klinischen Untersuchung des Phänotyps des Patienten wird zunächst die Kraft der gesamten Muskulatur geprüft und auf Funktionsverluste hin beurteilt. Der Zustand und das Verteilungsmuster der betroffenen Muskelgruppen liefern einen ersten Hinweis auf die Art der Erkrankung. Auch der Krankheitsbeginn ist von großer Bedeutung, da viele Erkrankungen ein typisches Manifestationsalter zeigen. Besonders zu unterscheiden sind eine kongenitale Manifestation, der Erkrankungsbeginn im Kindes- oder Erwachsenenalter. Mittels einer ausführlichen Familienanamnese wird die familiäre Vorgeschichte abgeklärt. Eine positive Familienanamnese kann einen Hinweis auf den Vererbungsmodus geben.

Auch spezielle Untersuchungen und Laborwerte dienen der Diagnosefindung. Der biochemische Marker Creatinkinase (CK) aus dem Serum ist bei Membranschädigung, Nekrose und Regeneration von Muskelfasern erhöht, was einen Hinweis auf den Zustand des Muskels liefert. Für manche Muskelerkrankungen ist ein mäßig oder stark erhöhter CK-Wert charakteristisch.

Die MRT-Untersuchung (Magnetresonanztomographie) stellt ein nichtinvasives Bildgebungsverfahren dar, mit dem Aussagen über den Zustand der Muskulatur, wie Entzündungen und das Vorliegen und die Verteilung einer Muskelatrophie getroffen werden können.

Elektrophysiologische Untersuchungen sind invasive Verfahren, die zur Abklärung einer neurogenen oder myogenen Ursache genutzt werden. Bei der Elektromyographie (EMG) wird die elektrische Muskelaktivität durch Einstechen von Nadelelektroden in den Muskel gemessen. Bei manchen Muskelerkrankungen ergeben sich typische Muster, was richtungsweisend für eine Diagnose sein kann. Ein Normalbefund schließt jedoch eine Myopathie nicht aus.

Für eine histologische Untersuchung des Muskelgewebes ist es notwendig, eine Muskelbiopsie zu entnehmen. Dies stellt einen schmerzhaften invasiven Eingriff dar und die Notwendigkeit sollte sorgfältig mit dem Kenntnissgewinn abgewogen werden. Das Biopsat wird bevorzugt aus einem mittelschwer betroffenen Muskel entnommen. Histologisch können durch verschiedene Färbungen unterschiedliche Anomalien festgestellt werden. Viele Muskelerkrankungen zeigen jedoch nur unspezifische Befunde.

Die Sicherung der Diagnose erfolgt bei genetischen Muskelerkrankungen durch molekulargenetische Diagnostik und den Nachweis einer pathogenen Variante in einem Krankheitsgen oder Locus. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie unter 1.1.2 beschrieben.

Bei der Diagnosefindung muss auch die Häufigkeit einer genetischen Erkrankung berücksichtigt werden. Alle bekannten genetischen Muskelerkrankungen und deren assoziierte Gene oder Genloci sind in der *Muscle Gene Table* [Kaplan und Hamroun 2015] aufgeführt. [Kraya *et al.* 2014]

Tabelle 1: Daten zu den drei häufigsten genetischen Muskelerkrankungen.

Erkrankung	Gen	Inzidenz	Vererbung	Erkrankungsbeginn	CK-Wert
Dystrophinopathie ¹	<i>DMD</i>		X-chromosomal		
Muskeldystrophie Typ Duchenne		1/3500		1.-6. Lebensjahr	Sehr stark erhöht
Muskeldystrophie Typ Becker		1/18500		5.-15. Lebensjahr	10- bis 50fach erhöht
Myotone Dystrophie ²			Autosomal dominant		
Myotone Dystrophie Typ 1	<i>DMPK</i>	1/8000		Kongenital bis adult	Normal bis leicht erhöht
Myotone Dystrophie Typ 2	<i>CNBP</i>	1/8000		Juvenil bis adult	Leicht erhöht
Facioscapulohumerale Muskeldystrophie ³	<i>DUX4</i>	1/20000	Autosomal dominant	2. bis 3. Lebensdekade	Normal bis leicht erhöht

¹ Eger und Zierz (2014a)

² Kornhuber und Zierz (2014)

³ Eger und Zierz (2014b)

1.3 Genetische Heterogenität

Die genetische Erbinformation wird bei der Reproduktion an die Nachkommen weitergegeben. Dabei erhält jedes Kind eine Genkopie von der Mutter und eine vom Vater. Die Merkmalsausprägung erfolgt im klassischen Fall nach den Mendelschen Regeln, nach denen es dominante, rezessive, kodominante und intermediäre Erbgänge gibt. Viele genetische Merkmale werden monogen vererbt. Der Vererbungsmodus kann dabei autosomal oder geschlechtsgebunden sein, je nachdem auf welchem Chromosom das entsprechende Gen lokalisiert ist [Holinski-Feder 2011b]. Monogene Erkrankungen sind selten, hoch penetrant und dominieren den Phänotyp in dem Sinne, dass das betreffende Gen sowohl notwendig als auch ausreichend ist, um den Phänotyp zu erzeugen. Im Verlauf der vergangenen fast drei Jahrzehnte wurde durch Kopplungs-Analysen eine große Zahl von Einzelgen-Erkrankungen identifiziert [Roberts 2010].

Mit zunehmendem Verständnis von genetischen Erkrankungen und auch durch verbesserte technische Möglichkeiten wird immer deutlicher, dass oft nicht nur ein einzelner Faktor zu dem Phänotyp beiträgt. Dies ist der Fall für häufige multifaktorielle Erkrankungen, wie Diabetes oder Arteriosklerose, bei denen viele Gene in Interaktion mit der Umwelt gemeinsam zu einem Phänotyp beitragen. Jedes einzelne Gen erzeugt dabei einen minimalen Effekt, ist allein aber nicht notwendig und ausreichend, um den Phänotyp hervorzurufen. Solche komplexen Zusammenhänge können mit genomweiten Assoziationsstudien großer Patientenkohorten aufgedeckt werden [Roberts 2010].

Für die tatsächliche Ausprägung eines Phänotyps spielen also viele Faktoren eine Rolle. Die phänotypische Diversität mendelscher Merkmale wird durch die folgenden wesentlichen Faktoren mitbestimmt: der genetische Hintergrund mit stochastischen Ereignissen einschließlich somatischer Mutationen, Umweltfaktoren im weitesten Sinne und Modifier-Gene. Außerdem ist das Geschlecht ein weiterer modifizierender Faktor für genetische Erkrankungen [Utermann 2005]. Modifier-Gene tragen zusätzlich zu der pathogenen Variante in dem primären Krankheitsgen zu dem Phänotyp bei. Isolierte Defekte in dem Modifier-Gen allein wirken nicht pathogen. Auch häufige SNPs können modifizierende Varianten sein, welche die Anfälligkeit für eine Erkrankung beeinflussen. Ein Beispiel für eine Erkrankung zu deren Phänotyp verschiedene Modifier-Gene beitragen, ist die Hämochromatose [Rochette *et al.* 2010]. Ein und dieselbe Genvariante kann vor dem genetischen Hintergrund verschiedener Individuen unterschiedlich ausgeprägt sein, was als variable Expressivität oder verminderte Penetranz bezeichnet wird. Die Penetranz einer Erkrankung ist per Definition die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient mit einem bestimmten Genotyp den assoziierten Phänotyp ausprägt. Die Penetranz kann durch die gerade beschriebenen genetischen Faktoren, aber auch durch epigenetische oder umweltbedingte Faktoren beeinflusst werden [Holinski-Feder 2011b].

Wie bereits unter 1.2.2 erwähnt, findet sich bei der Erkrankung der Muskulatur nur eine begrenzte Zahl morphologischer Veränderungen. Gleiche oder ähnliche Phänotypen können dabei ganz unterschiedliche genetische Ursachen zur Grundlage haben. Ein Beispiel sind die Gliedergürtel-Muskeldystrophien (LGMD), denen allen Paresen und Atrophien der Becken- und/oder Schultergürtelmuskulatur gemeinsam sind. Bisher sind rund 25 verschiedene LGMD-Formen

beschrieben, die sich in dem ursächlichen Gendefekt und dem Vererbungsmodus unterscheiden [Kaplan und Hamroun 2015].

Ein weiteres Beispiel für genetische Heterogenität innerhalb eines Krankheitsbildes sind die Myotonen Dystrophien. Der Phänotyp der beiden Typen 1 und 2 ist sehr ähnlich, es liegt jedoch ein Defekt in zwei unterschiedlichen Genen vor. Über einen gemeinsamen Pathomechanismus lassen sich die Gemeinsamkeiten jedoch erklären [Udd und Krahe 2012]. Auch die FSHD ist ein Beispiel dafür, dass unterschiedliche Defekte in einem Pathomechanismus zur Ausprägung einer Erkrankung führen können [Lemmers *et al.* 2012b].

Durch die Betrachtung von Patienten mit dem gleichen definierten Phänotyp, aber ungeklärtem Genotyp, können seltene Varianten von häufigen Erkrankungen aufgedeckt werden, denen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Ansatzpunkte zur Identifikation solcher Gene sind die Suche nach gemeinsamen Varianten in Genom- oder Exom-weiten NGS-Studien oder die gezielte Analyse von Kandidatengenen, die in dem Pathomechanismus der Erkrankung eine Rolle spielen. Die Pathogenese kann dabei durch genetische Veränderungen oder alternative Mechanismen, wie Epigenetik, *downstream*-Mechanismen oder Funktionsgewinn-Mutationen modelliert werden.

1.4 Myotone Dystrophie (DM)

Die Myotonen Dystrophien (DM) stellen die häufigste Form der neuromuskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter dar. Die Inzidenz wird auf 2 : 8000 geschätzt (je 1 : 8000) [Udd *et al.* 2006]. Die DM wurde im Jahr 1909 erstmals von Hans Curschmann und Hans Gustav Wilhelm Steinert beschrieben. Es handelt sich um eine autosomal dominant vererbte, multisystemische Erkrankung mit Beteiligung von Muskulatur und ZNS (Zentralnervensystem) [Harper 2001]. Genetisch können zwei Formen abgegrenzt werden, die als Typ 1 (Myotone Dystrophie 1, Curschmann-Steinert, DM1; OMIM #160900) und Typ 2 (Myotone Dystrophie 2, Proximale Myotone Dystrophie (PROMM), DM2; OMIM #602668) bezeichnet werden. Die zweite Form wurde 1994 von Kenneth Ricker entdeckt [Ricker *et al.* 1994]. Beiden Erkrankungen liegt die instabile Expansion eines Mikrosatelliten in untranslatierten Bereichen zweier verschiedener Gene zugrunde – eine (CTG)_n-Expansion in dem *DMPK*-Gen bei DM1 und eine (CCTG)_n-Expansion in dem *CNBP*-Gen bei DM2. Beide Formen eint ein gemeinsamer Pathomechanismus, in dessen Zentrum eine Fehlregulation steht, das durch die expandierte prä-mRNA-Produkt verursacht wird [Udd und Krahe 2012].

1.4.1 Klinische Merkmale

Klinisch sind die beiden Formen der Myotonen Dystrophie nur schwer voneinander abzugrenzen. Zunächst ist eine weite Überlappung der Symptome festzustellen. Zu den Kernsymptomen Myotonie, Muskelschwäche und Katarakt kommen fakultativ multisystemische Symptome hinzu. Im Folgenden sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufgezeigt werden.

Die DM2 hat im Allgemeinen einen milderen Verlauf als die DM1 und eine kongenitale Form fehlt gänzlich. Muskuläre Schwäche und Schwund betreffen bei DM1 hauptsächlich die distalen Extremitäten, bei DM2 sind hingegen eher die proximalen Extremitäten betroffen. Die Hauptmerkmale Myotonie, Katarakt, gastrointestinale und endokrine Probleme sind ausgeprägter bei DM1 zu finden, Muskelschmerzen finden sich vermehrt bei DM2 Patienten [Kornhuber und Zierz 2014].

Die Myotone Dystrophie 1 ist in der Ausprägung sehr variabel, wobei der Schweregrad vom Krankheitsbeginn abhängig ist. Es können eine milde Form mit Manifestation im späteren Erwachsenenalter, eine klassische Form mit Beginn im Jugendalter und eine schwere kongenitale Form unterschieden werden.

Typische Charakteristika der DM1 sind muskuläre Probleme, wie Myotonie, Muskelschwäche und Atrophie in Kombination mit der Beteiligung weiterer Organsysteme.

Manifestiert sich die Erkrankung erst später im Erwachsenenalter, so zeigt sich eine milde Form mit leichten Paresen und einem Katarakt.

Bei der klassischen Form treten die ersten Symptome typischerweise im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter auf. Es findet sich ein langsam progredienter Verlauf mit Paresen, Myotonie und Katarakt. Die Muskelschwäche betrifft die distalen Extremitäten, den Hals und die mimische

Muskulatur. Auch Sprechen, Kauen und Schlucken sind beeinträchtigt. Im Verlauf des dystrophischen Prozesses sind auch die proximalen Muskelgruppen betroffen. Die namensgebende Myotonie ist bei den meisten Patienten zu finden, steht aber selten im Vordergrund der Beschwerden. Nachgewiesen werden kann sie durch charakteristische myotone Entladungen in einer EMG-Untersuchung. Neben der Skelettmuskulatur findet sich häufig eine Mitbeteiligung der glatten Muskulatur, die sich in Schluckbeschwerden und Obstipation äußert. Sehr häufig ist auch die Herzfunktion gestört, mit Reizleitungsstörungen und seltener auch Kardiomyopathien. Auch endokrine Störungen sind mit der DM1 assoziiert und führen bei Männern unter Umständen zur Hodenatrophie und einer damit einhergehenden Störung von Libido und Potenz und bei Frauen zu Menstruationsstörungen. Häufig ist bei Männern eine Stirnglatze auffällig. Außerdem kann durch Hyperinsulinismus ein Diabetes mellitus auftreten. Ein Teil der Patienten zeigt eine ZNS-Symptomatik in Form von kognitiven Defiziten und Hypersomnie, eine Form der Schlafstörung, die durch ein exzessives Tag-Schlaf-Bedürfnis gekennzeichnet ist.

Bei der schweren kongenitalen Form der DM1 sind bereits verminderte Kindsbewegungen im Mutterleib auffällig. Säuglinge zeigen eine ausgeprägte Hypotonie, die als *floppy baby* bezeichnet wird sowie eine Atem- und Trinkschwäche, es fehlt jedoch die Myotonie. Wird die Neonatalperiode (die ersten 28 Lebenstage) überwunden, so stellt sich meist die klassische Form ein. Die motorische und geistige Entwicklung sind deutlich verzögert und kognitive Defizite sind häufig.

Durch respiratorische und kardiale Störungen ist die Lebenserwartung von DM1-Patienten verkürzt. [Harper 2001, Udd und Krahe 2012, Kornhuber und Zierz 2014]

Die Myotone Dystrophie 2 ist durch eine ähnliche Symptomatik gekennzeichnet wie die DM1. Es kann hier jedoch keine klare Unterteilung in verschiedene Formen vorgenommen werden, da auch eine Korrelation des Krankheitsverlaufs mit der Repeatlänge fehlt. Der Schweregrad ist hoch variabel und reicht von schwer betroffenen Patienten mit Verlust der Gehfähigkeit bis hin zu sehr milder Muskelschwäche. Bislang wurden bei der DM2 keine kongenitalen Fälle beschrieben und auch das Phänomen der Antizipation kann nicht im gleichen Maße beobachtet werden. Typisch ist eine proximal betonte Schwäche der Muskulatur, was sich in der alternativ verwendeten Bezeichnung „Proximale Myotone Myopathie (PROMM)“ wiederfindet. Eine Beteiligung der Gesichtsmuskulatur ist typischerweise nicht zu finden. Myotonie und Katarakt können auftreten oder auch fehlen. Auch Hypogonadismus, Stirnglatze, mentale Beeinträchtigung und Hypersomnie wurden kaum beobachtet. Dafür treten bei der DM2 zusätzlich häufig Myalgien auf. Die Lebenserwartung von DM2 Patienten ist im Allgemeinen normal. [Ricker *et al.* 1994, Day *et al.* 2003, Udd und Krahe 2012]

1.4.2 Genetik

Die genetische Ursache der Myotonen Dystrophien Typ 1 und 2 ist ähnlich, aber nicht identisch. Beide Typen sind mit einer instabilen Expansion eines Mikrosatelliten-Repeats in untranslatierten Regionen zweier verschiedener Gene assoziiert.

1.4.2.1 Genetik der DM1

In der Myotonen Dystrophie 1 liegt eine Expansion des Trinukleotids (CTG)_n in der 5'-untranslatierten Region (UTR) des *DMPK*-Gens (*dystrophia myotonica-protein kinase*, MIM *605377) auf Chromosom 19q13 vor [Brook *et al.* 1992, Fu *et al.* 1992, Mahadevan *et al.* 1992]. Bei gesunden Menschen finden sich Normalallele mit 5 bis 37 Wiederholungseinheiten. Bei DM1 Patienten ist das Repeat über diese Zahl hinaus expandiert. Krankheitsbeginn und Schweregrad zeigen eine Korrelation mit dem Ausmaß der Repeat-Expansion, wodurch die unter 1.4.1 beschriebene Einteilung genetisch erklärt werden kann (siehe Abbildung 3): Patienten mit 50-200 Wiederholungseinheiten entwickeln eine milde DM1, 200-1000 Einheiten führen zu der klassischen Form, bei 1000-5000 Wiederholungseinheiten kommt es zur Ausprägung der kongenitalen Form der DM1 [Udd und Krahe 2012].

Das Repeat verliert mit zunehmender Länge an Stabilität, wobei 38 bis 50 Wiederholungseinheiten als Prämutation mit einer erhöhten Instabilität angesehen werden. (CTG)₅₁₋₁₀₀ wird als Protomutation bezeichnet, wobei die Patienten asymptomatisch bis mild betroffen sein können [Udd und Krahe 2012]. Das (CTG)_n Repeat ist nicht immer ein perfektes Repeat, es wird bei bis zu 4 % der DM1-Patienten durch alternative Triplets im 3'-Bereich der Expansion unterbrochen. Diese Unterbrechungen haben einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Repeats und wirken sich auch auf den Phänotyp aus [Braida *et al.* 2010].

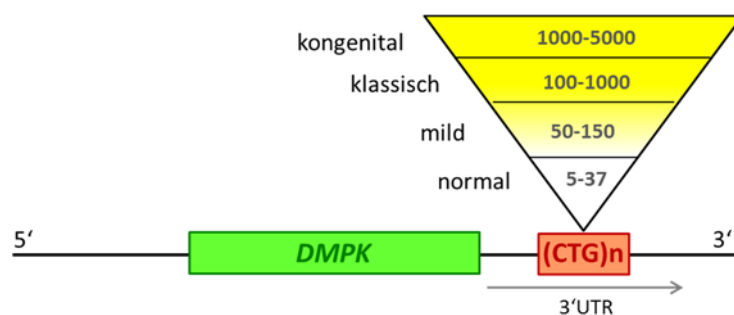


Abbildung 3: Der DM1 Locus. Schematische Darstellung des *DMPK*-Gens und der Repeat-Expansion in der 3'-UTR in unterschiedlichem Ausmaß mit der assoziierten klinischen Form.

1.4.2.2 Genetik der DM2

Die genetische Ursache der Myotonen Dystrophie 2 liegt in der Tetranukleotid Expansion (CCTG)_n in Intron 1 des *CNBP*-Gens (*CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein*; früher *ZNF9, zinc finger protein 9*; MIM *116955) auf Chromosom 3q21 [Ranum *et al.* 1998, Liquori *et al.* 2001]. Das Repeat ist sehr komplex aufgebaut und kann als (TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n dargestellt werden, wobei jedes Element eine hohe Variabilität besitzt. In der Normalbevölkerung ist das CCTG-Repeat stabil und wird zusätzlich von GCTG und TCTG Motiven unterbrochen. Bei DM2-Patienten fehlen die Sequenzunterbrechungen [Liquori *et al.* 2001]. In gesunden Menschen liegen Normalallele bis zu einer Größe von 30 Wiederholungseinheiten vor. Bei fehlenden Unterbrechungen sind aber bereits

(CCTG)₂₂₋₃₃ Repeats instabil, wobei die Neigung zur Expansion mit zunehmender Länge ansteigt. Die kleinsten berichteten Allele in DM2-Patienten zeigten eine Größe von (CCTG)₅₅₋₇₅, jedoch ist aufgrund einer enormen somatischen Instabilität weiterhin unklar, wo die Schwelle zu pathogenen Expansionen liegt. Bei den meisten Patienten liegt nämlich das expandierte Repeat nicht in einer konstanten Länge vor, sondern streut über eine größere Breite. Im Durchschnitt finden sich bei DM2-Patienten 5000 Wiederholungseinheiten, die größten berichteten Expansionen reichen bis zu 11000 Wiederholungen [Liquori *et al.* 2001, Liquori *et al.* 2003, Bachinski *et al.* 2009]. Abbildung 4 zeigt das DM2-Repeat im *CNBP*-Gen.

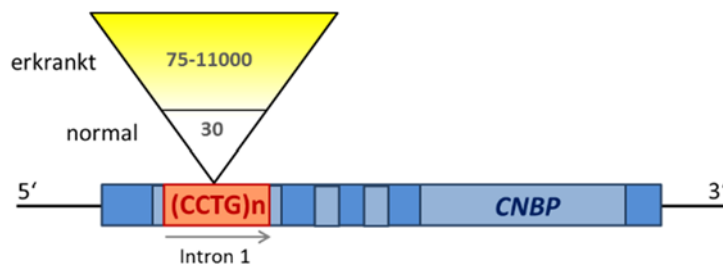


Abbildung 4: Der DM2 Locus. Schematische Darstellung des *CNBP*-Gens mit der Repeatexpansion im Intron 1 des Gens im gesunden und erkrankten Zustand.

1.4.2.3 Vererbung von Repeatexpansionen

Sowohl DM1 als auch DM2 werden autosomal dominant vererbt. Aufgrund der ungewöhnlichen Natur der Mutationen treten zudem einige Besonderheiten auf, die mit der Instabilität der Expansion in Zusammenhang stehen.

Die Expansion entsteht sowohl in der Keimbahn, als auch im somatischen Gewebe bei Prozessen der Replikation, Rekombination und Reparatur der DNA. Bei DM1 findet die Expansion wahrscheinlich prä-meiotisch in der Keimbahn während der Oogenese und post-zygotisch im Embryo ab dem zweiten Trimester statt. Die somatische Instabilität bleibt über das gesamte Leben bestehen [Pearson *et al.* 2005]. Der Mikrosatellit (CCTG)_n bei DM2 zeigt die größte bisher beobachtete somatische Instabilität mit einem signifikanten Anstieg der Länge über die Zeit von bis zu 2000 bp/3 Jahre [Liquori *et al.* 2001]. Neben diesem Altersfaktor wurden intra- und intergewebliche Unterschiede in der Repeatlänge und auch somatische Mosaik bei DM1 und DM2 Patienten gefunden. Proliferierende Gewebe zeigen oft größere Expansionen, was Unterschiede zwischen Geweben erklären kann [Pearson *et al.* 2005, Udd und Krahe 2012]. Bei DM1 sind die Expansionen in den betroffenen Geweben wie Muskel und Hirn deutlich größer als z.B. im Blut [Jansen *et al.* 1994, Thornton *et al.* 1994].

Die Penetranz der Myotonen Dystrophien liegt bei beinahe 100 % bei Expansionen oberhalb der pathogenen Schwelle. Im Bereich der Prä- und Protomutationen bei DM1 ist die Penetranz variabel mit asymptomatischen bis mild betroffenen Patienten [Udd *et al.* 2003, Udd und Krahe 2012]. Bei DM1 ist außerdem das Phänomen der Antizipation zu beobachten, was für eine Zunahme von Erkrankungsbeginn und Schweregrad von einer Generation zur nächsten steht. Genetisch kommt es

dabei in der Keimbahn zu einer Verlängerung der Repeatsequenz von einer Generation zur nächsten. Die Weitergabe des expandierten Allels erfolgt vermehrt über die mütterliche Linie, was vermutlich mit dem langen Zeitraum der weiblichen Meiose in Zusammenhang steht [Hunter *et al.* 1992, Ashizawa *et al.* 1994, Pearson *et al.* 2005]. Auf diese Weise kommt eine große, genetisch begründete Variabilität des Phänotyps zustande, die zusätzlich bei der genetischen Beratung berücksichtigt werden muss.

In der DM2 findet sich ebenfalls eine große Variabilität des Phänotyps, diese ist jedoch weniger genetisch nachvollziehbar. Es ist bisher keine klare Korrelation zwischen der Repeatlänge und dem Schweregrad beobachtet worden. Patienten mit einem mäßig expandierten Repeat können ähnlich stark betroffen sein wie Patienten mit einer großen Expansion. Außerdem fehlt eine kongenitale Form. Es treten sowohl Expansionen als auch Kontraktionen auf [Bachinski *et al.* 2003, Day *et al.* 2003]. Antizipation wurde für einzelne Familien vermutet [Schneider *et al.* 2000, Kruse *et al.* 2008]. Die große Instabilität des Repeats mit Unterschieden in verschiedenen Geweben und Veränderungen über das Alter sowie die Schwierigkeit, Expansionen dieser Größe überhaupt messen zu können, erschweren das Treffen exakter Aussagen und auch die genetische Beratung der Patienten.

1.4.3 Pathomechanismus

DM1 und DM2 unterscheiden sich darin, dass die genetische Ursache mit zwei ganz unterschiedlichen Genen verknüpft ist, deren Funktion nichts miteinander gemein hat. *DMPK* kodiert für eine Proteinkinase, welche den Transfer eines γ -Phosphats von z.B. ATP auf Aminosäurereste eines Proteins katalysiert, was eine Konformationsänderung des Zielproteins bewirkt und damit seine Funktion beeinflusst. Zu den Substraten gehören Myogenin, ein Calcium-Kanal und Phospholemman, welche alle eine Funktion in der Skelettmuskulatur erfüllen. *DMPK* ist auch an der Regulation der Calcium-Homöostase beteiligt, mit einer Auswirkung auf die kardiale Reizleitung. Zudem spielt es eine Rolle bei der Integrität der Kernhülle, was sich auf Struktur und Funktion des Muskels auswirkt. Damit verknüpft könnte auch eine Funktion in der Muskelzelldifferenzierung sein [Muranyi *et al.* 2001, Kaliman *et al.* 2005, Harmon *et al.* 2011].

CNBP dagegen codiert für ein RNA-bindendes Zinkfinger-Protein. Dieses fungiert als Aktivator in der cap-unabhängigen Translation und spielt eine Rolle in der Sterol-vermittelten Regulation der Transkription [Rajavashisth *et al.* 1989, Sammons *et al.* 2010].

Das Krankheitsbild von DM1 und DM2 ist jedoch so ähnlich, dass eine Verbindung über den Pathomechanismus auf der Hand liegt. Gemeinsam haben die beiden Erkrankungen die Expansion eines GC-reichen Mikrosatelliten, wie unter 1.4.2 erläutert wurde. Die Repeatexpansion befindet sich bei beiden Erkrankungen in einem untranslatierten Bereich des betreffenden Gens. Es wird eine prä-mRNA gebildet, welche das expandierte CUG/CCUG-Repeat (expRNA) enthält. Eine Translation in ein mutiertes Protein findet nicht statt. Die expRNA bildet Sekundärstrukturen in Form von Haarnadeln, in denen sich C-G Bindungen mit U-U Fehlpaarungen abwechseln [Napierala und Krzyzosiak 1997]. Lokalisationsstudien zeigten eine Anreicherung der mutierten RNA zu stabilen, unlöslichen Foci im Zellkern [Taneja *et al.* 1995, Liquori *et al.* 2001]. Daraufhin wurde die RNA-

Funktionsgewinn-Hypothese vorgestellt, nach der die expRNA allein, unabhängig vom Genkontext, für die Erkrankung verantwortlich ist. Begründet wurde die Hypothese durch Beobachtungen an Tiermodellen, bei denen (1) ein Funktionsverlust von *DMPK* nicht den Phänotyp reproduziert [Jansen *et al.* 1996], (2) die mutierte RNA in nukleären Foci akkumuliert [Taneja *et al.* 1995] und (3) allein die Transkription der *DMPK* 3'-UTR mit (CTG)₂₀₀ ausreichend ist, um den DM-Phänotyp zu reproduzieren [Mankodi *et al.* 2000]. Die RNA-Funktionsgewinn-Hypothese besagt, dass die expRNA-Speicherung in kernständigen Foci kommt es zu einer Fehlregulation von RNA-bindenden Proteinen. Die daraus resultierenden *downstream*-Effekte erzeugen schließlich den DM-Phänotyp. Zu den betreffenden Proteinen gehören CELF1 und MBNL1, deren Funktion und Fehlregulation in DM im Folgenden beschrieben werden sollen. Die komplexen Zusammenhänge werden außerdem in Abbildung 5 veranschaulicht.

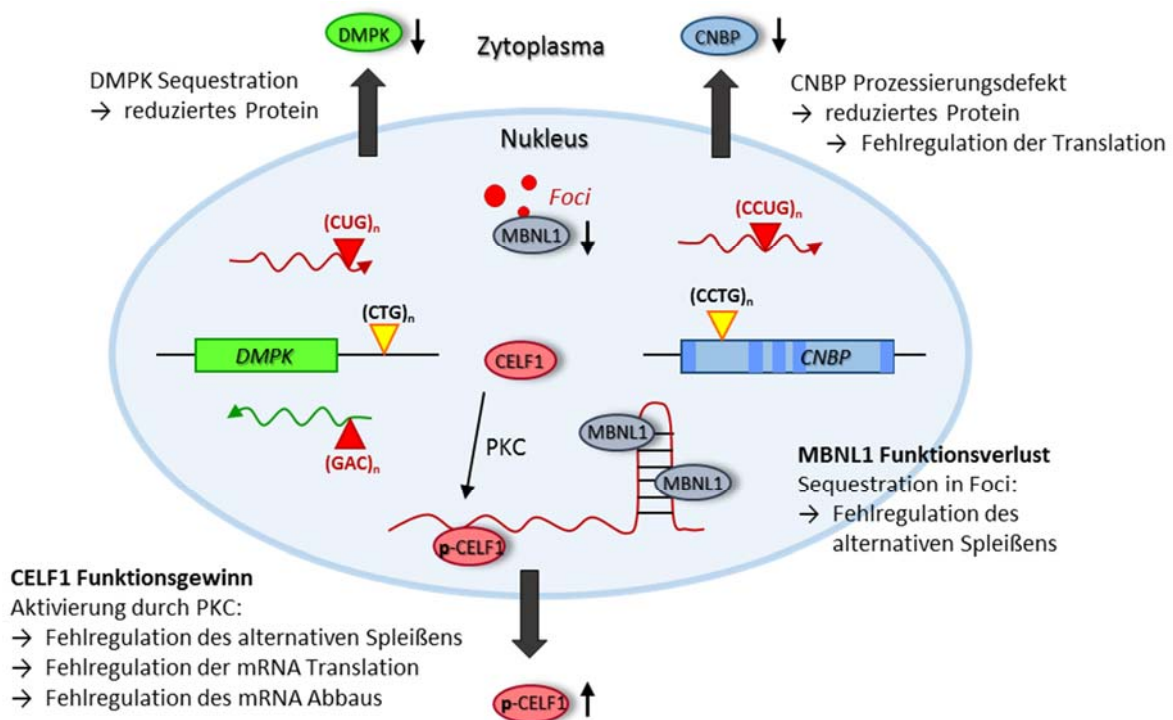


Abbildung 5: Pathomechanismus der Myotonen Dystrophien – das toxische RNA-Funktionsgewinn Modell. Durch die Expression von (C/CUG)_n in *DMPK* bzw. *CNBP* kommt es zur Bildung von expRNA. Diese bildet stabile Sekundärstrukturen, welche in kernständigen Foci aggregieren. Durch die Aggregation der RNA kommt es zu einer Reduktion der Proteine *DMPK* und *CNBP* im Zytoplasma. RNA-bindende Proteine wechselwirken mit der expRNA. *MBNL1* wird in den Foci gebunden, wodurch es zu einem Funktionsverlust kommt. *CELF1* wird durch die Proteinkinase C (*PKC*) aktiviert, wodurch es zu einem Funktionsgewinn kommt. (Verändert nach Udd und Krahe (2012))

Das *CELF1*-Gen (*CUGBP*, *Elav-like family member 1*, MIM *601074) kodiert für ein RNA-bindendes Protein und gehört zu einer Genfamilie, deren Mitglieder verschiedene Funktionen im RNA Metabolismus erfüllen, darunter die Regulation von alternativem Spleißen, mRNA-Reifung, -Abbau

und -Translation [Timchenko *et al.* 1996, Ladd *et al.* 2001, Lee *et al.* 2010]. CELF1 interagiert mit dem DMPK-Transkript, im speziellen mit dem (CUG)_n Repeat, wobei es jedoch nur einzelsträngige RNA bindet, nicht aber doppelsträngige. CELF1 colokalisiert nicht mit der expRNA in nukleären Foci [Fardaei *et al.* 2001]. In DM1-Patienten ist CELF1 im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht [Timchenko *et al.* 1996]. Es wird vermutet, dass die expRNA durch einen noch unbekanntem Mechanismus den Proteinkinase C (PKC) -Signalweg aktiviert. Die Erhöhung des CELF1-Levels kommt wahrscheinlich durch eine PKC-vermittelte Hyperphosphorylierung zustande, durch die das Protein stabilisiert wird [Kuyumcu-Martinez *et al.* 2007]. In Mausmodellen mit einer Überexpression an CELF1 wurden verschiedene typische histologische und molekulare Merkmale der Myotonen Dystrophie erzeugt (siehe Tabelle 2) [Timchenko *et al.* 2004, Ho *et al.* 2005].

Das *MBNL1*-Gen (*muscleblind-like splicing regulator 1*, MIM *606516) gehört zu einer Familie gewebespezifischer Regulatoren des RNA-Metabolismus und kodiert für einen Spleißfaktor mit wichtigen Aufgaben im alternativen Spleißen. Es wird vorwiegend in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskel exprimiert [Fardaei *et al.* 2002]. Durch die Bindung von MBNL1 an die expRNA kommt es zur Anreicherung des Proteins in den nukleären Foci und gleichzeitig zu seiner Verarmung im Kernplasma. Dies führt zu einer Verminderung des Proteins unterhalb der funktionellen Schwelle, was sich in fehlgespleißten Zielgenen zeigt [Miller *et al.* 2000]. Interessanterweise werden alle fehlgespleißten Gene in der Entwicklung reguliert, wobei ein Wechsel der Transkripte von der embryonalen Form zu einer adulten Form stattfindet [Lin *et al.* 2006]. Der funktionelle Effekt der MBNL1-Verarmung zeigt sich in *knock-out* Mausmodellen, welche sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene in vielfacher Weise das Krankheitsbild der Myotonen Dystrophie nachbilden (siehe Tabelle 2) [Kanadia *et al.* 2003].

Bei beiden oben beschriebenen Proteinen handelt es sich um Spleißfaktoren, deren Fehlregulation durch eine erhöhte Aktivität bzw. durch eine Verarmung zu einer abnormen Expression von embryonalen Spleißisoformen in adultem Gewebe führt. Untersuchungen an Muskelgewebe von DM-Patienten und verschiedenen Mausmodellen ergab eine Zahl von 50 potenziell misregulierten und fehlgespleißten Zielgenen [Ranum und Cooper 2006, Nakamori *et al.* 2013].

Auffällig ist außerdem die antagonistische Wirkung von MBNL1 und CELF1. Fördert der eine Spleißfaktor den Einbau eines Exons, so wird dieser durch den anderen Faktor unterdrückt. MBNL1 und CELF1 können demnach als postnataler Schalter fungieren [Kalsotra *et al.* 2008].

Für einige der Zielgene kann ein direkter Zusammenhang zwischen dem Spleißdefekt und der klinischen Symptomatik gefunden werden. Das *CLCN1*-Gen (MIM *118425) codiert für den Chlorid-Kanal, welcher für die spannungsabhängige Ionenleitfähigkeit des Muskels verantwortlich ist. Die Myotonie der DM-Patienten steht in direktem Zusammenhang mit einem Misspleißen von *CLCN1* [Mankodi *et al.* 2002]. Veränderungen im Insulin-Rezeptor-Gen (*INSR*, MIM* 147670) sind wahrscheinlich ursächlich für die Insulinresistenz in DM-Patienten [Savkur *et al.* 2001]. Das *BIN*-Gen (MIM *601248) wird mit Muskelschwäche in Verbindung gebracht [Fugier *et al.* 2011]. Und auch ein Fehlsplicing des *DMD*-Gens (MIM *300377) ist beobachtet worden, was in direktem

Zusammenhang mit den dystrophischen Prozessen bei DM gebracht wird [Rau *et al.* 2015]. Für andere fehlregulierte Gene sind die Zusammenhänge mit der DM Symptomatik jedoch unklar.

Abgesehen von den Effekten der *downstream*-Gene könnte auch ein Einfluss der direkt von der Mutation betroffenen Gene eine Rolle spielen. Bei DM1-Patienten akkumuliert, wie bereits erwähnt, die DMPK-mRNA mit dem expandierten Repeat in Foci im Zellkern. Diese mRNA wird jedoch nicht in das Protein translatiert, wodurch die Kinase in deutlich verminderter Konzentration vorliegt [Davis *et al.* 1997]. Ein Mausmodell zeigt jedoch, dass der Verlust von *DMPK* einen eher geringen Anteil an dem Phänotyp der Myotonen Dystrophie ausmacht [Jansen *et al.* 1996].

Bei DM2-Patienten liegt das CNBP-Protein deutlich vermindert vor, mit einem Level von 15-50 % im Vergleich zum Wildtyp [Raheem *et al.* 2010]. Diese Reduktion beruht auf dem expandierten CCUG-Repeat und führt schließlich zu einer verminderten Proteinsynthese von *downstream*-Targets [Salisbury *et al.* 2009]. Bereits die Haploinsuffizienz von CNBP zeigt im Mausmodell bedeutende Effekte, welche den DM-Phänotyp nachstellen, Spleißdefekte fehlen jedoch [Chen *et al.* 2007].

Um den komplexen Pathomechanismus der Myotonen Dystrophie nachvollziehen zu können, wurde eine Vielzahl an Tiermodellen etabliert, die teilweise mehr oder weniger Eigenschaften der Myotonen Dystrophie wiedergeben. Die wichtigsten Modelle sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Mausmodelle zum Verständnis der Myotonen Dystrophie.

Modell	Phänotyp	Interpretation	Referenz
<i>Knockout Modelle</i>			
<i>Dmpk</i> (-/-)	Geringe Muskelveränderungen im Alter, kardiale Reizleitungsstörungen, keine Atrophie, Myotonie oder Katarakt	reproduzieren nicht den DM-Phänotyp	Jansen <i>et al.</i> (1996)
<i>Cnbp</i> (+/-)	Myotonie, proximale und distale Myopathie, kardiale Reizleitungsstörung, Katarakt, kein Misspleißen	Haploinsuffizienz von CNPB reproduziert wichtige klinische Aspekte der DM, jedoch kein Misspleißen	Chen <i>et al.</i> (2007)
<i>Mbnl1</i> (-/-)	Myotonie, Myopathie, Kardio-myopathie, Katarakt, Misspleißen	Verlust von MBNL1 reproduziert Kernaspekte der DM, inklusive Misregulation und Misspleißen der RNA von MBNL1 Target-Genen	Kanadia <i>et al.</i> (2003), Osborne <i>et al.</i> (2009), Du <i>et al.</i> (2010)
<i>Transgene Modelle</i>			
<i>HSA^{LR}</i> (<i>CUG</i>) ₂₅₀ *	Myotonie, Myopathie, Atrophie, kernständige Foci mit Kolo-kalisation zu MBNL1, Misspleißen	Expression von (CUG) ₂₅₀ reproduziert wichtige klinische Aspekte der DM, inklusive Misregulation und Misspleißen von RNA von MBNL1 Target-Genen	Mankodi <i>et al.</i> (2000)
<i>Celf1</i>	Atrophie, Myopathie, Kardio-myopathie, kardiale Reizleitungsstörungen, Misspleißen	Überexpression von CELF1 reproduziert wichtige klinische Aspekte der DM, inklusive Misspleißen von CELF1 Target-Genen	Timchenko <i>et al.</i> (2004), Ho <i>et al.</i> (2005), Ward <i>et al.</i> (2010)

* *HSA^{LR}* (CUG)₂₅₀: (CUG)₂₅₀ Repeat eingebracht in die untranslatierte Region des *HSA*-Gens (*human skeletal actin*) zur Expression des CUG-Repeats in dem Muskel transgener Mäuse

1.4.4 Diagnostik

Für die Diagnostik der Myotonen Dystrophien werden klinische, labordiagnostische und genetische Untersuchungen mit einbezogen. Die Familienanamnese spielt eine wichtige Rolle, da sie Hinweise auf den Erbgang geben kann. Dabei müssen eine variable Ausprägung und Antizipation berücksichtigt werden. Klinisch wird auf die unter 1.4.1 erläuterten Merkmale hin untersucht. Es wird eine körperliche Untersuchung durchgeführt, bei der die Muskelkraft beurteilt wird. Die Verteilung der Muskelschwäche ist in der DM1 typischerweise distal, bei DM2 proximal. Eine Spaltlampenuntersuchung kann das Vorliegen einer Katarakt zeigen. Bei der labormedizinischen Untersuchung ist der CK-Wert typischerweise leicht bis mäßig erhöht, bei DM2 gelegentlich auch normal. Die Leberenzyme zeigen sich häufig erhöht, bei Männern evtl. zusätzlich die Gonadotropine. Außerdem kann eine Insulinresistenz vorliegen. In der elektrophysiologischen Untersuchung mittels EMG sind myopathische Veränderungen in Kombination mit myotonen Serien typisch. Bei DM2 ist die Myotonie allerdings weniger prominent oder kann auch fehlen. Mittels EKG

(Elektrokardiogramm) können kardiale Reizleitungsstörungen nachgewiesen werden. In dem Befund der immunhistochemischen Untersuchung einer Muskelbiopsie unterscheiden sich DM1 und DM2 bisweilen. Bei DM1 zeigt sich ein myopathisches Gewebesyndrom mit stark vermehrten zentralen Kernen, Ringfasern, sarkoplasmatischen Massen und moderater Atrophie der Typ I Fasern. Die DM2 zeigt myopathische Veränderungen mit geringen bis mäßig vermehrten zentralen Kernen, verstreute Fasern mit Zellklumpen und stark atrophierte Fasern vom Typ 2A. [Udd und Krahe 2012]

Aufgrund des variablen und heterogenen Krankheitsbildes ist für die eindeutige Diagnosestellung eine genetische Untersuchung erforderlich. Ziel ist der molekulare Nachweis des expandierten Repeats. Der Nachweis von Repeatsequenzen ist anspruchsvoll und wird allgemein dadurch erschwert, dass PCR-basierte Methoden nur bedingt angewandt werden können, da ab einer bestimmten Länge die Polymerase fehleranfällig wird oder vollständig versagt und dementsprechend die tatsächliche Länge des Repeats nicht wiedergegeben werden kann. Zum Nachweis der beiden DM-Loci wurden Methoden auf der Basis von *in situ*-Hybridisierung, PCR-Amplifikation und Southern Blot entwickelt (Überblick bei Radvansky und Kadasi (2010)). In der Routinediagnostik wird ein zweistufiger Ansatz verwendet, bestehend aus einer PCR-basierten Methode und einem Southern Blot [IDMC 2000, Carson 2009].

Zunächst wird eine Fragmentanalyse durchgeführt, mit der normale und grenzwertig expandierte Fragmente erfasst werden können. Verfügt ein Patient über zwei Normalallele, so ist er gesund, ist nur ein Normalallel vorhanden, könnte er homozygot für dieses Allel sein, was für den DM1-Lokus für ca. 20 % und DM2 für 10 % der Normalbevölkerung zutrifft, oder ein zweites, expandiertes Allel tragen. Besteht der Verdacht auf eine Repeatexpansion, so wird in einem zweiten Schritt ein Southern Blot zu deren Abklärung durchgeführt [Bachinski *et al.* 2003, Radvansky und Kadasi 2010]. Die Repeatlänge bei DM1 kann direkt aus dem amplifizierten Fragment berechnet werden. Bei DM2 liegt, wie unter 1.4.2.2 beschrieben, ein komplexes Repeat vor und die Repeatlänge wird als kombinierte Länge des gesamten Repeats in bp angegeben [Carson 2009].

Für den DM1 Southern Blot wird genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglI* in zwei parallelen Ansätzen gespalten (Abbildung 6). Die Fragmente werden anschließend in einer linearen Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Southern blotting auf eine Nylonmembran übertragen, wo sie für den Nachweis mit der markierten Sonde p5B1.4 zur Verfügung stehen. Die Fragmente erscheinen als diskrete Banden im Blot. Liegt ein Mosaik vor, sind auch mehrere oder verschmierte Banden möglich. Durch die Verwendung zweier verschiedener Restriktionsenzym-Systeme kann die Größe sowohl großer, als auch kleiner Fragmente zuverlässig bestimmt werden. Die zweistufige DM1 Diagnostik hat eine hohe Sensitivität und Spezifität ohne falsch positive Ergebnisse zu erzeugen [Shelbourne *et al.* 1993, IDMC 2000].



Abbildung 6: Restriktionsschnittstellen im DMPK-Gen. Gezeigt ist das DMPK-Gen mit seinen 16 Exons (grün) und dem (CTG)_n Repeat (gelb) in der 3'-UTR Region. Im Southern Blot wird die DNA mit zwei verschiedenen Enzymen gespalten - *EcoRI* und *BglI*, was Fragmente unterschiedlicher Größe erzeugt. Die Detektion erfolgt über die Sonde p5B1.4 (rot). Durch die Auflösung des Southern Blots ist die Größenbestimmung großer Expansionen im *EcoRI*-Verdau und kleiner Expansionen im *BglI*-Verdau möglich.

Für DM2 wird in der zweiten Diagnostikstufe eine TP-PCR angewandt, bei der die Repeatregion mit Hilfe von Oligorepeat-Primern amplifiziert wird. Die Strangverlängerung beginnt hier an jeder beliebigen Position im Repeat, was Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt. Nach Auftrennung in einer linearen Gelelektrophorese (LGE) werden die Fragmente auf eine Nylonmembran geblottet und über die Hybridisierung mit der Oligo-Sonde (CAGG)₅ detektiert. Im Blot ist ein breiter Schmier sichtbar, der maximal die Länge des Repeats wiedergibt. Für grenzwertige bis kurze Expansionen sind so Größenabschätzungen möglich, große Expansionen zeigen einen Schmier über den gesamten Trennbereich des Blots. Falsch positive Ergebnisse werden nicht erzeugt. Eine Bestimmung der tatsächlichen Repeatlänge und die Detektion von Mosaiken sind mit dieser indirekten Nachweismethode nicht möglich [Bonifazi *et al.* 2004]. Aufgrund dessen sollte im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Methode zur Längenbestimmung der Repeatexpansion entwickelt werden.

1.5 Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD)

Die Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD) wurde erstmals im Jahr 1884 von den französischen Medizinern Louis Landouzy und Joseph Dejerine beschrieben. Wie der Name bereits andeutet, beginnen die Muskelschwäche und Atrophie typischerweise im Gesicht, dem Schultergürtel und den Oberarmen. Im weiteren Verlauf, der sich langsam progredient äußert, sind auch die Bauch-, Beckengürtel- und Fußhebermuskulatur betroffen. Mit einer Prävalenz und Inzidenz von 1 : 20000 stellt die FSHD die dritthäufigste neuromuskuläre Erkrankung dar [Padberg 1982]. Sie wird autosomal dominant vererbt, wobei ca. 10-30 % auf Neumutationen zurückzuführen sind [Zatz *et al.* 1995]. Die genetische Ursache der FSHD ist sehr komplex und mit einer Derepression des *DUX4*-Gens assoziiert [Lemmers *et al.* 2010a]. Die Erkrankung tritt in zwei genetischen Formen auf – Typ 1 und Typ 2, die jedoch phänotypisch nicht zu unterscheiden sind [de Greef *et al.* 2010].

1.5.1 Klinische Merkmale

Die FSHD ist durch eine hohe Variabilität in der Ausprägung der Symptome und des Schweregrads der Erkrankung gekennzeichnet, die sowohl inter-, als auch intrafamiliär auftritt. Sie reicht von nahezu asymptomatischen Fällen bis hin zu schweren Verlaufsformen mit Verlust der Gehfähigkeit. Neben dem klassischen Phänotyp zeigen sich auch atypische Formen. Dennoch kann ein charakteristisches Bild der Erkrankung beschrieben werden. Typischerweise liegt der Erkrankungsbeginn im Jugend-, oder jungen Erwachsenenalter mit einer Manifestation der Erstsymptome in den namensgebenden Muskelgruppen. Eine Erkrankung im Kindesalter ist bekannt, aber selten und meist durch einen schweren Verlauf gekennzeichnet. Die Erkrankung verläuft langsam voranschreitend, sie beeinträchtigt in der Regel jedoch nicht die Lebenserwartung des Patienten.

Die Muskelschwäche beginnt meist im Gesicht und zeigt sich besonders durch eine schwach ausgeprägte Mimik, inkompletten Lidschluss (Zilienzeichen) und eine Schwäche der Ringmuskulatur des Mundes. Letztere bedingt ein Unvermögen zu pfeifen oder Schwierigkeiten bei der Artikulation von Lippenlauten. Die Kau- und Schluckmuskulatur sowie die Muskulatur des äußeren Auges sind nicht betroffen. Die Gesichtsbeteiligung kann jedoch auch fehlen. Die Schwäche der Oberarmmuskulatur ist oft die erste wahrnehmbare und funktionseinschränkende Symptomatik. Mit einer Schwäche der Schultergürtelmuskulatur sind häufig *Skapulae alatae* (dorsal vorstehende Schulterblätter) und seitlich abfallende Schlüsselbeine zu beobachten. Durch Atrophie der Brustmuskulatur tritt eine Achsel-Brust-Falte auf. Im späteren Verlauf der Erkrankung ist der Beckengürtel fast immer mitbetroffen. Haltungsanomalien der Wirbelsäule können zu einer Skoliose oder Lordose führen. Durch Bauchwandpareesen kann häufig ein positives Beevor-Zeichen (eine Verschiebung des Bauchnabels in Richtung des Kopfes beim Aufrichten aus dem Liegen) festgestellt werden. Auch die Oberschenkelmuskulatur kann im Verlauf betroffen sein. Durch die Beteiligung der Fußhebermuskulatur entwickelt sich ein Steppergang.

Bei der FSHD findet sich sowohl eine Dystrophie als auch Atrophie der Muskulatur. Die dystrophischen Prozesse manifestieren sich zwar immer beidseitig, es wird jedoch anfänglich häufig eine deutliche Asymmetrie beobachtet. Die Muskeleigenreflexe sind besonders bei stärker betroffenen Muskelgruppen abgeschwächt. Bei ca. zwei Drittel der Patienten treten Muskelschmerzen auf, besonders nach körperlicher Belastung; deren Ursache ist jedoch noch unklar [Padberg 1982, Pandya *et al.* 2008].

Auch eine Beteiligung anderer Organsysteme ist im Zusammenhang mit FSHD beschrieben worden. Mögliche assoziierte Symptome, die bei zwei Dritteln der Patienten auftreten, sind eine Innenohrschwerhörigkeit mit Hochtonverlust und retinale Gefäßveränderungen, die jedoch nur in wenigen Fällen Beschwerden verursachen [Padberg *et al.* 1995]. In Einzelfällen ist eine Herzbeteiligung mit kardialen Reizleitungsstörungen beschrieben worden [Laforet *et al.* 1998].

Die FSHD zeigt im Allgemeinen einen vergleichsweise milden Verlauf, bei 30 % der Patienten geht die Muskelschwäche nicht über den Schultergürtel hinaus, 80 % der übrigen Fälle zeigen Fußheberparesen, etwa 20 % aller Patienten sind im Krankheitsverlauf auf einen Rollstuhl angewiesen [Padberg 1982].

Klinisch sind die beiden Formen der FSHD nicht unterscheidbar. Es ist jedoch zu beobachten, dass die FSHD2 vergleichsweise milder verläuft und bisher keine Manifestationen im Kindesalter bekannt sind [de Greef *et al.* 2010].

Ein internationales Konsortium legte 1991 die klinischen, genetischen und labormedizinischen Kriterien der FSHD-Diagnostik fest. Diese lassen sich zu den folgenden vier Hauptkriterien zusammenfassen [Padberg *et al.* 1991]:

- Beginn der Erkrankung in der Gesichts- oder Schultergürtelmuskulatur unter Aussparung der extra-okularen, pharyngealen und lingualen Muskulatur und des Herzmuskels
- Faciale Muskelschwäche in über 50 % der betroffenen Familienmitglieder
- Autosomal dominante Vererbung in familiären Fällen
- Nachweis einer Muskelerkrankung durch EMG und Muskelbiopsie in mindestens einem betroffenen Familienmitglied, die Biopsie soll keine Anzeichen einer spezifischen alternativen Diagnose zeigen

Diese diagnostischen Kriterien sind auch heute noch von Gültigkeit, jedoch ist eine Muskelbiopsie aufgrund der unspezifischen Histologie nicht mehr angezeigt. Zur Sicherung der Diagnose wird stattdessen eine molekulargenetische Untersuchung durchgeführt.

1.5.2 Genetik

Die Genetik der FSHD ist sehr komplex und lässt sich nicht durch die einfache Assoziation mit einem Krankheitsgen erklären. Verantwortlich ist primär nicht eine Mutation in einem einzelnen Gen, sondern Veränderungen in einem größeren Locus, wobei auch die umliegenden Sequenzen und epigenetische Faktoren eine bedeutende Rolle spielen.

1.5.2.1 Organisation des FSHD-Lokus und assoziierte Gene

Die FSHD ist mit einem telomernahen Repeat-Lokus auf dem Chromosom 4q35 assoziiert (siehe Abbildung 7) [Upadhyaya *et al.* 1990, Wijmenga *et al.* 1990]. Dieser stellt einen Makrosatelliten dar, mit Wiederholungseinheiten von 3,3 kb Länge – den sog. D4Z4-Repeateinheiten, welche tandemartig in einer Kopf-Schwanz-Orientierung organisiert sind. Gesunde Menschen tragen eine Zahl von 11 bis 150 D4Z4-Repeateinheiten. Die D4Z4-Sequenz ist vorwiegend nicht-kodierend und typisch für konstitutives Heterochromatin [Hewitt *et al.* 1994]. Außerdem enthält jede Wiederholungseinheit eine Kopie des Retrogens *DUX4* (*Double homeobox 4*-Gen, MIM *606009) [Gabriels *et al.* 1999]. Die Homöobox-Gene zeichnen sich durch ein 180 bp langes DNA-Segment aus, welches für eine DNA-bindende Homöodomäne kodiert und damit als Transkriptionsfaktor wirkt [Gehring 1993]. Sie spielen in der Embryonalentwicklung eine Rolle bei der Organisation von Organen durch die Steuerung der Transkription von nachgeordneten Target-Genen, im adulten Zustand sind sie jedoch inaktiv. Evolutiv ist die Familie der *DUX*-Gene in den Eukaryoten hoch konserviert und weit verbreitet. Beim Menschen finden sich hunderte Kopien von *DUX*-Genen im Genom: in allen akrozentrischen Chromosomen, in dem D4Z4-Repeat auf Chromosom 4q35, in einer dazu homologen Repeatregion auf Chromosom 10q26, welche eine 98 %-ige Sequenzhomologie zu der 4q-Repeatregion zeigt und als *DUX4c* proximal des D4Z4-Repeats [Deidda *et al.* 1995, Beckers *et al.* 2001, van Geel *et al.* 2002].

Das *DUX4*-Gen entstand in der Primatenlinie durch Retrotransposition von *DUXC*, welches verloren ging und dessen Funktion *DUX4* nun einnimmt [Clapp *et al.* 2007]. Als Retrogen verfügt es weder über intronische Sequenzen, noch einen deutlich erkennbaren Promotor oder ein Polyadenylierungssignal (poly-A-Signal) [Hewitt *et al.* 1994]. *DUX4* wird im Hoden in unreifen Spermien exprimiert. Von allen vorhandenen Kopien auf Chromosom 4q und 10q wird unter Einbeziehung eines weit telomerwärts gelegenen, testes-spezifischen poly-A-Signals ein stabiles Produkt gebildet. *DUX4* zeigt demnach eine selektive Expression in der Keimbahn, nicht jedoch in somatischen Zellen, in denen die Expression durch epigenetische Mechanismen unterdrückt wird [Snider *et al.* 2010]. Als Transkriptionsfaktor erkennt *DUX4* eine Konsensussequenz aus zwei Homöodomänen und aktiviert so eine Reihe von Target-Genen aus der Stammzell-Biologie sowie der RNA- und Protein-Prozessierung, wie Spleißfaktoren und Ubiquitin-Ligasen [Geng *et al.* 2012]. Etwa ein Drittel der *DUX4*-Bindestellen liegen außerdem in repetitiven Elementen, wie LTR- (*long terminal repeat*) Elementen der MaLR- (*mammalian apparent LTR-Retrotransposons*) und ERV- (endogene retrovirale Elemente) Familie von Retrotransposons. Diese entstanden in der gleichen Zeit wie *DUX4*

selbst, wodurch DUX4 ein Primaten-spezifisches Gennetzwerk aktiviert, was bei der Verwendung von Modellen, wie der Maus oder dem Zebrafisch immer berücksichtigt werden muss [Young *et al.* 2013].

In den flankierenden Bereichen zu der Wiederholungseinheit und auch innerhalb finden sich verschiedene Sequenzvarianten. Die variablen Elemente sind dabei ein einfacher Sequenzlängen-Polymorphismus (SSLP), SNPs innerhalb des Repeats und verschiedene Varianten der distalen Sequenz.

Es sind die beiden distalen Haplotypen A und B zu unterscheiden, die mit etwa gleicher Häufigkeit vorkommen (44 % qA, 50 % qB der Chromosomen 4). Haplotyp A trägt eine 260 bp lange Sequenz mit einem potentiellen poly-A-Signal, genannt pLAM, gefolgt von einem 6,2 kb langen β -Satelliten direkt distal zu D4Z4. Beide Sequenzen fehlen bei Haplotyp B [van Geel *et al.* 2002, Lemmers *et al.* 2007]. Innerhalb des D4Z4-Repeats liegen SNPs, in denen sich die Chromosomen 4q und 10q unterscheiden. Diese werden auch zu diagnostischen Zwecken herangezogen. Der SSLP proximal zu D4Z4 ist aufgebaut aus relativ stabilen Mikrosatelliten-Repeats (CA oder CT), außerdem enthält er zwei SNPs und eine polymorphe Insertion von 8 bp. Über die SSLP-Sequenz können beinahe alle FSHD-Haplotypen unterschieden werden [Lemmers *et al.* 2007].

Diese eben beschriebenen Sequenzvarianten spielen eine große Rolle bei der Manifestation der FSHD, da nur bestimmte Haplotyp-Varianten mit der Erkrankung assoziiert sind. Darauf soll in Abschnitt 1.5.2.2 näher eingegangen werden.

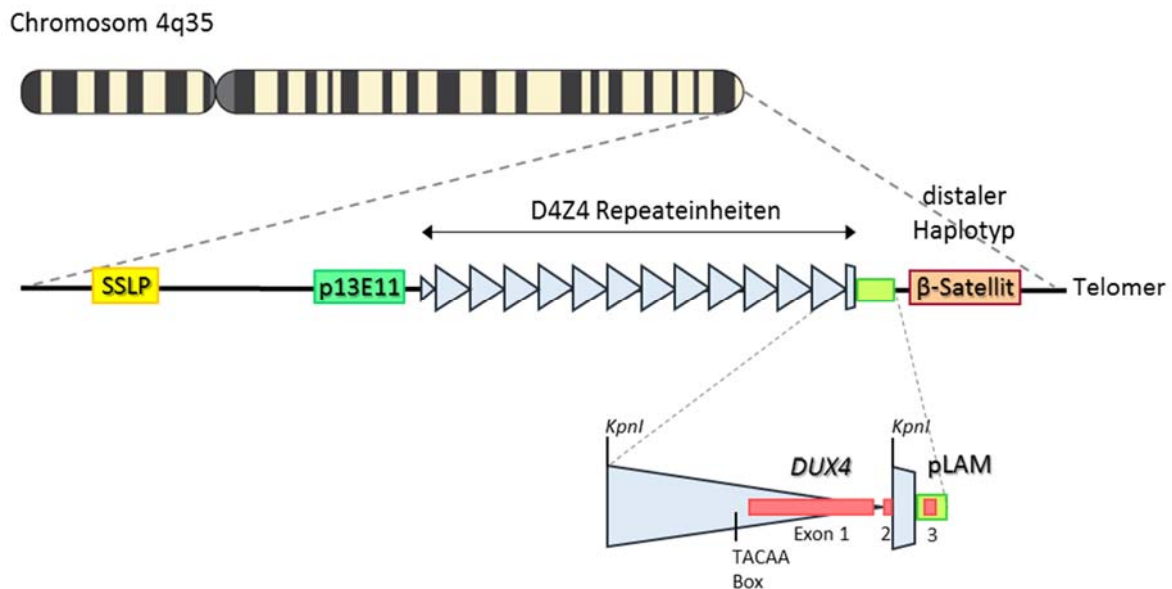


Abbildung 7: Der FSHD-Lokus auf Chromosom 4q35. Beispielhaft ist der Haplotyp A gezeigt, mit der direkt distal der D4Z4-Wiederholungseinheiten (blau) gelegenen pLAM Region (grün) und der Region, welche den distalen Haplotyp bestimmt. Proximal von D4Z4 liegt die Bindestelle der Southern Blot Sonde p13E-11 und ein SSLP, der in ca. 10 Varianten vorkommt. Die D4Z4-Einheiten werden durch die Schnittstelle von *KpnI* definiert. Jede Einheit trägt eine Kopie des *DUX4*-Gens (rot). Das distale D4Z4 Repeat ist im Detail gezeigt. Durch das terminal flankierende pLAM erhält das distale *DUX4* ein drittes Exon, welches ein poly-A-Signal trägt.

Für die FSHD2 spielt neben dem eben beschriebenen Locus auf Chromosom 4q35 außerdem das *SMCHD1*-Gen (*structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1*, MIM *614982) auf Chromosom 18p11.32 eine Rolle (siehe Abbildung 8). Das Gen kodiert für ein DNA-bindendes Protein aus der Familie der SMC-Proteine, welche eine Rolle in der strukturellen und funktionellen Organisation der Chromosomen spielen [Hirano 2006]. *SMCHD1* wurde erstmals über die Mausmutante Mommed1 beschrieben und charakterisiert. Diese trägt eine Nonsense-Mutation in dem *SMCHD1*-Gen, welche homozygot zu Letalität von weiblichen Embryonen führt, heterozygote Weibchen und alle Männchen sind jedoch lebensfähig [Blewitt *et al.* 2008]. *SMCHD1* besteht aus 48 Exons. Das Protein beinhaltet zwei bekannte funktionelle Domänen: eine ATP-bindende Domäne und eine SMC *flexible hinge*-Domäne, welche eine Funktion bei der Dimerisierung und Interaktion mit DNA hat [Hirano 2006]. *SMCHD1* spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der X-Inaktivierung bei Weibchen [Blewitt *et al.* 2008, Gendrel *et al.* 2012]. Der Verlust von *SMCHD1* zeigt zusätzlich einen Effekt auf die Expression verschiedener autosomaler Gencluster, die im Wildtyp eine monoallelische Expression zeigen [Gendrel *et al.* 2013, Mould *et al.* 2013]. Außerdem wirkt *SMCHD1* an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mit, der Verlust von *SMCHD1* zeigt im Zellsystem eine geringere Überlebensrate der Zellen nach Schädigung der DNA [Coker und Brockdorff 2014, Tang *et al.* 2014].



Abbildung 8: Das *SMCHD1*-Gen. Das Gen ist 8821 bp lang und besteht aus 48 kodierenden Exons (grau). Es kodiert für ein Protein mit 2005 AS und trägt zwei funktionelle Domänen (rot bzw. grün).

Eine wichtige Funktion von *SMCHD1* zeigte sich bei der Studie von FSHD2-Patienten, bei denen eine Veränderung des Methylierungsstatus aller vier Allele des FSHD-Locus in einen hypomethylierten Zustand beobachtet wurde [Lemmers *et al.* 2012b].

1.5.2.2 Der kausale genetische Defekt

Im Normalzustand trägt eine gesunde Person eine Zahl von 11 bis 150 D4Z4-Repeateinheiten auf Chromosom 4q35. Die große Zahl an Repeateinheiten bewirkt eine Kondensation der DNA, was zu einem heterochromatischen, inaktiven Zustand führt. Die innerhalb der Repeateinheiten lokalisierten *DUX4*-Gene stehen nicht für die Transkription zur Verfügung. Es liegt also eine Repression von *DUX4* vor [Lemmers *et al.* 2010a].

Bei FSHD1-Patienten ist die D4Z4-Repeatregion eines Allels auf 1 bis 10 Einheiten verkürzt [Lunt 1998]. Dies ist graphisch in Abbildung 9 gezeigt. Der Fall einer Monosomie des FSHD-Locus zeigte, dass mindestens eine D4Z4-Kopie für die Manifestation der Erkrankung vorliegen muss, wodurch eine Funktionsverlust-Mutation ausgeschlossen werden kann [Tupler *et al.* 1996]. Ursächlich ist in den meisten Fällen eine mitotische Kontraktion. Die Hälfte aller Neumutationen findet während der

ersten Zellteilungen der Zygote statt und resultiert in einem somatischen Mosaik. Die Umlagerung ist dabei fast immer intrachromosomal, ohne allelische Austausche, was für ein Synthese-abhängiges Strang-Annealing-Modell mit häufigem *crossover* spricht [Lemmers *et al.* 2004a].

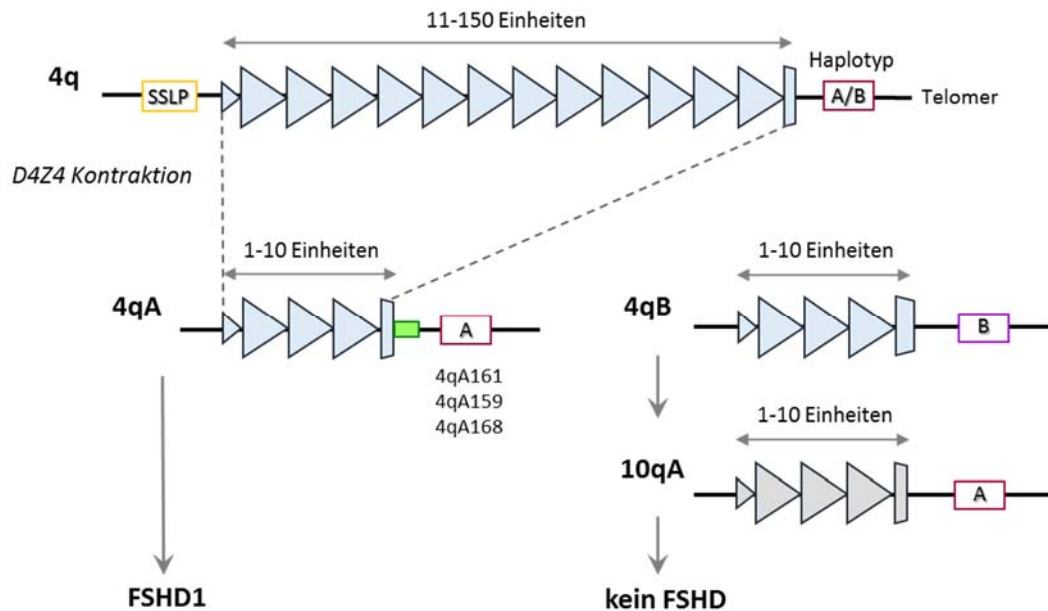


Abbildung 9: Die genetische Ursache der FSHD1. Gezeigt ist der FSHD-Lokus des Chromosoms 4q eines Gesunden mit 11-150 D4Z4 Wiederholungseinheiten, dem SSLP und dem Haplotyp. Bei FSHD1 Patienten liegt eine Kontraktion von D4Z4 auf 1-10 Einheiten auf einem permissiven 4qA Allel vor. Kontraktionen auf einem 4qB Allel oder auf Chromosom 10q sind nicht mit der FSHD assoziiert.

Die Kontraktion bewirkt eine Veränderung des Chromatinstatus in einen euchromatischen Zustand, was in Abbildung 10 veranschaulicht wird. Eine weitere epigenetische Eigenschaft der Kontraktion betrifft eine Veränderung des Methylierungsstatus des D4Z4-Repeats. Es konnte eine signifikante Verminderung der Methylierung des verkürzten Arrays gezeigt werden. Diese Demethylierung ist auf den FSHD-Lokus beschränkt und betrifft nur das verkürzte und nicht das normale Allel. Es wurde außerdem ein sprunghafter Abfall der Methylierung ab einer Anzahl von < 11 Repeateinheiten beobachtet, was den FSHD1 *cut-off* erklärt [de Greef *et al.* 2009]. Durch die eben beschriebene Derepression kann *DUX4* transkribiert werden, was wahrscheinlich den Pathomechanismus der FSHD auslöst.

Zudem spielen die unter 1.5.2.1 beschriebenen Sequenzvarianten eine entscheidende Rolle. Dem *DUX4*-Gen innerhalb des Repeats fehlt die poly-A-Sequenz, wodurch das Transkript instabil ist und abgebaut wird. Der Haplotyp A bringt nun distal zu dem D4Z4-Repeat die pLAM-Sequenz mit, welche ein poly-A-Signal trägt. Dieses kann von dem *DUX4*-Gen der letzten distalen Repeateinheit genutzt werden. In sog. FSHD-permissiven Allelen liegt dadurch eine funktionsfähige poly-A-Sequenz vor und ein stabiles Transkript kann gebildet werden. Der häufigste permissive Haplotyp ist 4qA161, aber auch 4qA159 und 4qA168 werden mit FSHD assoziiert [Lemmers *et al.* 2007, Lemmers *et al.* 2010a].

Kontraktionen von nicht-permissiven Allelen, wie 4qA166, allen Varianten von 4qB und dem homologen Locus auf Chromosom 10q26 sind nicht mit einer Erkrankung assoziiert (Abbildung 9) [Lemmers *et al.* 2004b, Lemmers *et al.* 2007].

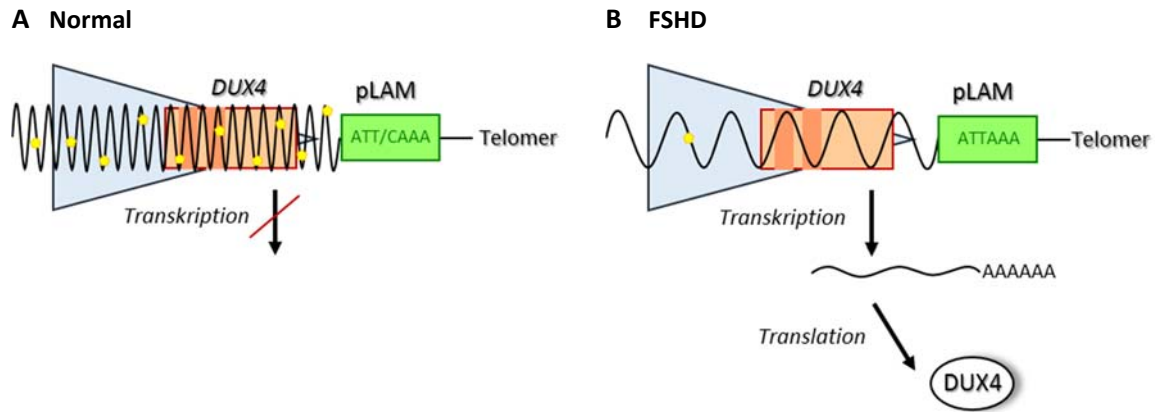


Abbildung 10: Der Pathomechanismus der FSHD – Teil 1. Gezeigt ist jeweils das distale D4Z4-Repeat (blau) auf Chromosom 4q35 mit dem DUX4-ORF (rot), der angrenzenden pLAM-Region (grün) und der DNA-Methylierung (gelb). (A) Normalzustand des D4Z4-Repeats mit kondensierter und methylierter DNA. Das DUX4-Gen steht dadurch nicht für die Transkription zur Verfügung. (B) D4Z4-Repeat eines FSHD-Patienten mit offener Chromatinstruktur und Hypomethylierung. Das DUX4-Gen wird transkribiert und durch das poly-A-Signal der pLAM-Sequenz stabilisiert, wodurch das DUX4-Protein gebildet wird. (Verändert nach Richards *et al.* (2012))

Die niederländische Gruppe um Lemmers *et al.* (2012b) postulierte die genetische Ursache der FSHD2. Sie beschrieben einen Defekt in dem Gen *SMCHD1*, welches durch Exom Sequenzierung von betroffenen Familien mit FSHD-Phänotyp, jedoch negativem Befund für FSHD1, identifiziert wurde. Die Genetik der FSHD2 ist nun dadurch charakterisiert, dass die Patienten keine Kontraktion des FSHD-Locus auf Chromosom 4q zeigen, jedoch mindestens ein permissives FSHD-Allel tragen, welches das DUX4-Transkript stabilisiert. Außerdem findet sich eine heterozygote Mutation im *SMCHD1*-Gen, welche die Hypomethylierung und damit die offene Chromatinstruktur des FSHD-Locus bewirkt, was die Transkription des stabilisierten DUX4-Gens zur Folge hat. Die Hypomethylierung betrifft bei der FSHD2 alle vier Allele des FSHD-Locus auf Chromosom 4q und 10q. Sie ist nicht gleichförmig über das gesamte Repeat verteilt, es zeigen sich dafür Sequenzen mit signifikant verminderter Methylierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen [de Greef *et al.* 2009, Lemmers *et al.* 2012b, Hartweck *et al.* 2013].

Damit stellt FSHD2 eine digenische Erkrankung dar, mit den beiden Faktoren der pathogenen *SMCHD1*-Variante und eines permissiven FSHD-Allels. Diese beiden Faktoren liegen auf zwei unterschiedlichen genetischen Loci und werden unabhängig voneinander vererbt.

1.5.3 Pathomechanismus

FSHD Typ 1 und 2 zeigen einen gemeinsamen Pathomechanismus, der durch die Stabilisierung des DUX4-Transkripts durch eine toxische Funktionsgewinn-Mutation zustande kommt. In FSHD1 führt

die Kontraktion des FSHD-Lokus zu einer offenen Chromatinstruktur, die die Expression von *DUX4* erlaubt. In FSHD2 führt der Verlust der Funktion von *SMCHD1* durch Mutationen zu einer Hypomethylierung des FSHD-Lokus, wobei dieser wiederum eine offene Chromatinstruktur annimmt und damit eine Derepression des *DUX4*-Gens zustande kommt [Lemmers *et al.* 2010a, Lemmers *et al.* 2012b].

Die Reaktivierung von *DUX4* löst direkt oder indirekt eine Kausalkette an Vorgängen aus, die schließlich zum Krankheitsbild der FSHD führen (siehe Abbildung 11). Dafür werden in der Literatur viele Zusammenhänge mit einzelnen Genen und Vorgängen beschrieben.

Von dem *DUX4*-ORF (*open reading frame*) werden zwei Spleißvarianten gebildet, eines in voller Länge des ORF (*DUX4-fl*) und ein trunkiertes Protein, dem eine C-terminale Region fehlt (*DUX4-s*) [Dixit *et al.* 2007, Snider *et al.* 2009]. In sehr geringen Konzentrationen konnte *DUX4-s* in Kontrollen und *DUX4-fl* in FSHD-Patienten nachgewiesen werden. Bei genauerer Analyse zeigte sich, dass in FSHD-Muskelgewebe in einer kleinen Zahl von Nuclei eine erhebliche Menge an *DUX4-fl* transkribiert wird und dies mit prä-apoptotischen Effekten einhergeht. Muskelzellen stellen ein mehrkerniges Synzytium dar und im Fall der Überexpression von *DUX4* in einem der Kerne geht die gesamte Faser zugrunde. Dieser apoptotische Effekt steht wahrscheinlich bei dem Krankheitsprozess im Vordergrund [Dixit *et al.* 2007, Kowaljow *et al.* 2007, Snider *et al.* 2010]. Tassin *et al.* (2013) stellten ein Modell vor, wie die zunächst sehr geringe Konzentration des *DUX4*-Proteins seine Effekte potenzieren kann. Demnach wird *DUX4* zunächst in einem einzelnen Zellkern einer Muskelfaser exprimiert. Stabilisiert durch das poly-A-Signal aus pLAM geht die mRNA ins Cytoplasma über und wird dort in *DUX4*-Protein translatiert, welches eine NLS (Kernlokalisations-Signal, *nuclear localization signal*) -Sequenz enthält. Durch Diffusion gelangt das Protein zu verschiedenen benachbarten Kernen der Muskelfaser und wird über das NLS-Signal eingeschleust, wo es als Transkriptionsfaktor eine Reihe von Genen aktiviert bzw. inhibiert. Die betreffenden Genprodukte können wiederum auch in benachbarten Zellkernen wirken. In diesem Diffusions-Modell mit einer Kaskade von Initialisierung und Amplifikation der Einzeleffekte kommt es zu einer Ausbreitung des Endeffektes.

Die Expression von *DUX4* führt wahrscheinlich zur Inhibition des MyoD-Gens (*myogenic differentiation 1*, MIM *159970), einem Transkriptionsfaktor und Master-Switch in der Muskeldifferenzierung und -Regeneration, was die Inhibition von MyoD Targetgenen zur Folge hat [Winokur *et al.* 2003, Bosnakovski *et al.* 2008]. *DUX4* selbst induziert die Expression des *PITX1*-Gens (*paired-like homeodomain 1*, MIM *602149) [Dixit *et al.* 2007], einem Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der unteren Extremitäten, Organentwicklung und links-rechts-Asymmetrie in der Embryonalentwicklung. Ein Targetgen von *PITX1* ist *Tp53* (*tumor protein p53*, MIM *191170), welches eine Rolle bei der Kontrolle der DNA-Reparatur, dem Zellzyklus und der Apoptose spielt sowie mit Zellmetabolismus und Muskelatrophie in Verbindung gebracht wird. Die myopathischen Prozesse in FSHD sind p53 abhängig, was sich in der Milderung der *DUX4*-Toxizität bei p53-Inhibition zeigt [Wallace *et al.* 2011, Richards *et al.* 2012]. *DUX4* induziert wahrscheinlich außerdem die Expression von *CRYM* (*mu-crystallin*, MIM *123740), was einen Einfluss auf Zelldifferenzierung und die oxidative Stressantwort hat. Außerdem wird das Gen mit Retina- und Innenohr-Defekten in Zusammenhang gebracht, welche auch bei FSHD eine Rolle spielen [Reed *et al.* 2007]. Auch das Gen

DEFB103 (*defensin*, MIM *606611) wird von DUX4 aktiviert, welches die Muskelzellendifferenzierung und die eigene Immunantwort in Muskelzellen inhibiert [Geng *et al.* 2012].

Die Ursache für den oft entzündlichen Befund mit T-Zell Infiltration in der Muskelbiopsie bei FSHD-Patienten könnte in einer primären Immunantwort liegen. Die Keimbahn ist ein immunprivilegiertes Gewebe, welches nicht durch das Immunsystem überwacht wird. Eine Missexpression von Keimbahnproteinen in somatischen Zellen könnte nun eine Immunantwort auslösen [Tawil *et al.* 2014]. Zudem sind bei FSHD verschiedene Gene der oxidativen Stress-Antwort herunterreguliert [Bosnakovski *et al.* 2008]. Und es gibt Hinweise auf eine Unterdrückung der normalen Muskelzellregeneration sowie Immunezellinfiltration im FSHD-Muskel, was mit dem Pathomechanismus direkt in Zusammenhang gebracht wird [Richards *et al.* 2012, Tassin *et al.* 2013, Tawil *et al.* 2014].

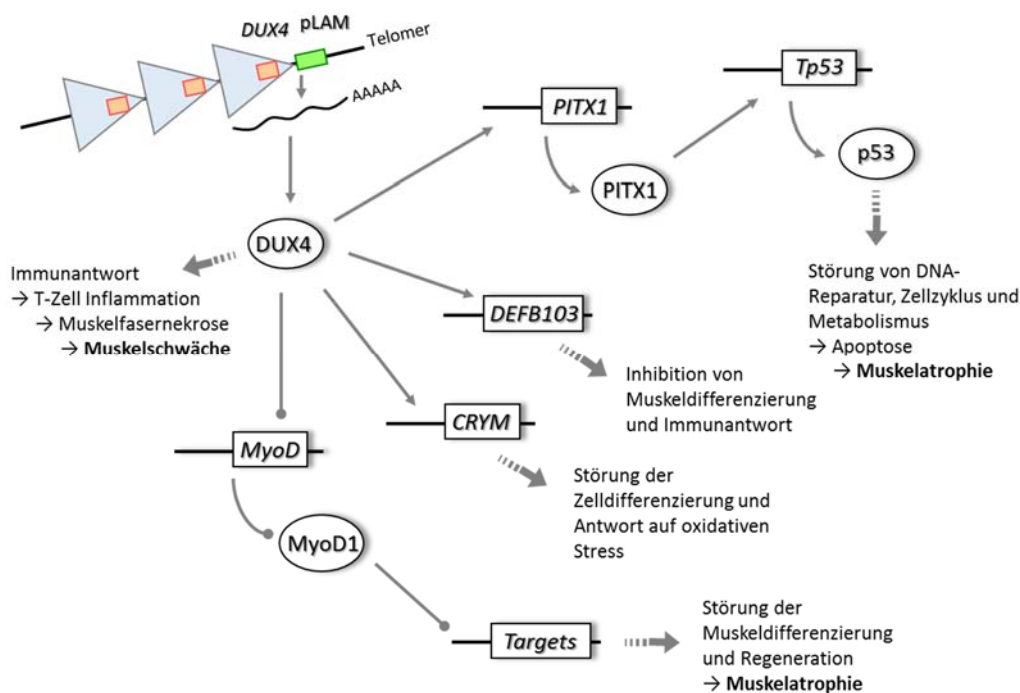


Abbildung 11: Der Pathomechanismus der FSHD – Teil 2. Es sind schematisch die vermuteten Mechanismen ausgehend von der ektopischen Expression von *DUX4* gezeigt. Die Expression von *DUX4* selbst könnte im Körper eine Immunantwort auslösen, da es sich um ein Keimbahnprotein handelt. *DUX4* wirkt außerdem als Transkriptionsfaktor auf die Expression verschiedener Targetgene. Der Transkriptionsfaktor *MyoD*, ein Hauptschalter der Muskeldifferenzierung, wird durch *DUX4* inhibiert, wodurch es zu der Inhibition von *MyoD* Targetgenen kommt. Die Gene *CRYM* und *DEFB103* werden durch *DUX4* aktiviert. Ein weiteres Target von *DUX4* ist das *PITX1* Gen, welches als Transkriptionsfaktor an der Entwicklung der unteren Extremitäten und der Asymmetrie des Körpers beteiligt ist. Ein Targetgen von *PITX1* ist wiederum *Tp53*. (Verändert nach Richards *et al.* (2012))

Im Gesamten betrachtet ist der Pathomechanismus der FSHD sehr komplex und es fehlt noch einiges zu dem vollständigen Verständnis von der genetischen Ursache bis hin zu der Ausprägung des Phänotyps. Zusammengenommen bewirkt die ektopische Expression des *DUX4*-Gens wahrscheinlich die Aktivierung eines Stammzell-Transkriptionsprogramms, was mit dem Differenzierungsprogramm des adulten Organismus nicht kompatibel ist [Tawil *et al.* 2014].

1.5.4 Diagnostik

Bei der Diagnostik der FSHD werden klinische, labordiagnostische und genetische Untersuchungen vorgenommen. Auch die Familienanamnese spielt eine wichtige Rolle zur Abklärung der autosomal dominanten Vererbung. Klinisch wird auf die unter 1.5.1 beschriebenen Symptome hin untersucht, wobei besonders das typische Verteilungsmuster und die anfängliche Asymmetrie der Muskelschwäche sowie das Beevor-Zeichen charakteristisch sind. Bei der labormedizinischen Untersuchung ist ein normaler bis leicht erhöhter CK-Wert zu finden. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigen sich myopathische Veränderungen. Bei immunhistochemischen Untersuchungen einer Muskelbiopsie fallen myogene Veränderungen, wie eine starke Faserhypertrophie und sog. Mottenfraßfasern auf. In etwa 30 % der Biopsien sind entzündliche Infiltrate zu beobachten. Eine Muskelbiopsie ist aufgrund des wenig spezifischen Befundes jedoch nicht mehr angezeigt [Eger und Zierz 2014b].

Die wichtigste Untersuchung zur Diagnosesicherung ist die molekulargenetische Untersuchung. Für die FSHD1 kann diese mit einer Sensitivität von 94,6 % und einer Spezifität von 98,2 % durchgeführt werden [Upadhyaya *et al.* 1997].

Die Grundlage der molekulargenetischen Diagnostik ist die Bestimmung der Länge des D4Z4-Repeats, dem zentralen Element im FSHD-Lokus. Die am häufigsten angewandte Methode ist dabei der Southern Blot. Alternative Methoden sind eine Long Range-PCR [Goto *et al.* 2006] und das Molecular Combing [Nguyen *et al.* 2011]. Im Folgenden soll jedoch nur auf den Goldstandard - den Southern Blot, eingegangen werden, da dieser in der Routinediagnostik eingesetzt wird.

Für den FSHD-Southern Blot wird hochmolekulare genomische DNA zunächst mit spezifischen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *EcoRI/BlnI* und *XapI*) in drei Ansätzen verdaut, wobei die DNA direkt distal und proximal des D4Z4 Repeats und an spezifischen Schnittstellen innerhalb des Repeats gespalten wird [Lemmers *et al.* 2001]. Die Restriktionsschnittstellen im FSHD Locus sind in Abbildung 12 gezeigt. Anschließend erfolgt eine Auftrennung der Fragmente nach Größe in einer linearen Gelelektrophorese, was die Zuordnung von Fragmenten zwischen 3 und 50 kb erlaubt. Durch Southern blotting werden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen, wo sie für den Nachweis mit der spezifisch markierten Sonde p13E-11 zur Verfügung stehen [Wright *et al.* 1993]. Diese bindet in der Region proximal des D4Z4-Repeats und macht so Fragmente sichtbar, die den FSHD-Lokus beinhalten. Die Auswertung des Blots erfolgt über die Interpretation des Bandenmusters, wobei vier Allele unterschieden werden müssen. Das Restriktionsenzym *EcoRI* spaltet die DNA an beiden Enden des Repeats von Chromosom 4q und 10q. Hier sollten vier Banden für die vier Allele sichtbar sein. Die Repeat-Sequenzen auf 4q und 10q sind nahezu identisch, unterscheiden sich jedoch in wenigen Basen. Im Doppelverdau mit *EcoRI/BlnI* wird spezifisch innerhalb Chromosom 10-typischer Repeateinheiten gespalten, *XapI* schneidet spezifisch innerhalb Chromosom 4-typischer Repeats. Auf diese Weise kann jede Bande einem Allel zugeordnet werden

und anhand eines Größenstandards ihre Größe bestimmt werden. Durch Abzug der flankierenden Sequenzen lässt sich auf die Repeatlänge rückschließen [Lemmers *et al.* 2012a].

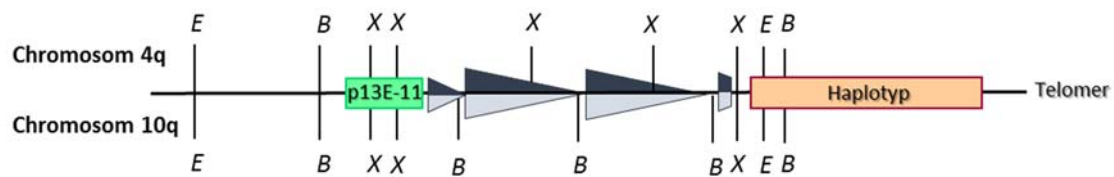


Abbildung 12: Restriktionsschnittstellen im FSHD-Lokus. Beispielhaft ist der FSHD-Lokus mit zwei Repeateinheiten dargestellt. Es sind die Positionen der DNA-Sonde p13E-11 (grün), der Haplotyp-Region (rosa) und die Restriktionsschnittstellen aus der Southern Blot-Diagnostik angegeben. Diese unterscheiden sich zwischen dem Chromosom 4q und 10q. E: *EcoRI*, B: *EcoRI/BlnI*, X: *XapI*.

Mit dem FSHD-Blot lässt sich eine Kontraktion auf dem FSHD-Lokus identifizieren und die Herkunft von Chromosom 4q oder 10q bestimmen. Für die Zuordnung des Haplotyps ist ein weiterer Blot mit spezifischen Sonden für den Haplotyp A und B notwendig. Auf diese Weise kann die FSHD1 zuverlässig diagnostisch nachgewiesen werden [Ehrlich *et al.* 2007].

Für die seltenere FSHD2 wurde eine Assoziation mit dem *SMCHD1*-Gen gefunden und auch der Haplotyp und die Methylierung der D4Z4-Region spielen eine erhebliche Rolle [Lemmers *et al.* 2012b]. Die molekulargenetische Diagnostik der FSHD2 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die genetische Heterogenität in verschiedenen Muskelerkrankungen betrachtet werden. Bei vielen muskulären Erkrankungen ist auffällig, dass klinisch ähnliche Phänotypen genetisch sehr heterogene Ursachen haben können. Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit den seltenen genetischen Ursachen klinisch häufiger Muskelerkrankungen. Es soll die Frage beantwortet werden, welche genetischen Defekte und Mechanismen neben den bekannten Hauptursachen zu dem beschriebenen Phänotyp führen können. Als Beispiele wurden die Erkrankungen der Myotonen Dystrophie und der FSHD gewählt. Für beide dieser häufigen Muskelerkrankungen finden sich Fälle, bei denen der typische Phänotyp vorliegt, der bekannte genetische Defekt im Rahmen der Routinediagnostik jedoch ausgeschlossen werden konnte. Innerhalb dieser Patientenkohorten wurde nach einer möglichen gemeinsamen alternativen Krankheitsursache gesucht. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass ein gemeinsamer Pathomechanismus ursächlich für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps ist. Dieser kann durch Mutationen in verschiedenen Komponenten dieses Mechanismus ausgelöst werden, wobei am Ende dieselben Folgen zu beobachten sind. Dies schließt sowohl die Ebene der Genetik als auch der Epigenetik mit ein.

1.6.1 Projekt Myotone Dystrophie

1.6.1.1 *Molecular Combing DM-Test*

Die beiden Formen der Myotonen Dystrophie DM1 und DM2 sind phänotypisch sehr ähnlich, haben genetisch jedoch zwei verschiedene Ursachen. Durch die schlechte Unterscheidbarkeit der beiden Formen wäre ein diagnostischer Test wünschenswert, welcher beide Formen in einem Ansatz analysiert. Die Myotonen Dystrophien sind Repeaterkrankungen, welche mit der Expansion von Mikrosatelliten-DNA assoziiert sind. Dies macht den Nachweis über eine gewöhnliche PCR und anschließende Sequenzierung unmöglich. Der Nachweis erfolgt standardmäßig über Southern Blot und Hybridisierung mit spezifischen Sonden, jedoch in getrennten Ansätzen für DM1 und DM2.

Ein gemeinsamer Nachweis beider Erkrankungen ist mit der Methode Molecular Combing denkbar. Als Ausgangsmaterial liegt hier die genomische DNA eines Patienten in gestreckter Form auf einer Glasoberfläche vor. Dort steht sie für die Hybridisierung mit spezifischen Sonden zur Verfügung, welche den Ziellokus sichtbar machen. Es ist dabei möglich, mehrere Loci gleichzeitig zu visualisieren. Gegenstand dieser Arbeit ist es nun, einen Assay auf der Basis des Molecular Combing zu entwickeln, mit dessen Hilfe die beiden Loci von DM1 und DM2 detektiert und eindeutig unterschieden werden können. Außerdem soll das Repeat selbst dargestellt und seine Länge vermessen werden, um auf die Zahl der Repeateinheiten zurückschließen zu können.

Der Southern Blot zum Nachweis der DM1 ermöglicht die Bestimmung der Repeatzahl recht genau. Dies kann zur Validierung der Messgenauigkeit des Molecular Combing herangezogen werden. Für DM2 steht jedoch bisher keine Methode zur Verfügung, um das Ausmaß der Repeatexpansion zu bestimmen. Mit dem Molecular Combing könnte erstmals eine Darstellung des Repeats auf

Einzelmolekülebene erreicht werden, was den tatsächlichen Zustand des Repeats zeigen kann. Dies ist von besonderem Interesse, da für DM2 eine enorme Instabilität des Repeats bekannt ist, diese aber aufgrund fehlender geeigneter Methoden nur begrenzt analysiert werden kann.

1.6.1.2 Alternative genetische Ursachen der Myotonen Dystrophie

Neben den Patienten mit einer genetisch nachgewiesenen Myotonen Dystrophie des Typs 1 oder 2 verbleibt eine Zahl an Patienten mit dem typischen Phänotyp ohne genetische Diagnose. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Fragestellung, ob diese Patienten eine andere, eventuell gemeinsame Ursache für die vorliegende Erkrankung teilen. Die beiden Formen der DM zeigen zwar zwei unterschiedliche genetische Defekte, es findet sich jedoch ein gemeinsamer Pathomechanismus, durch den die Ähnlichkeit des Phänotyps erklärt werden kann. Daraufhin wurde die Hypothese abgeleitet, dass ein Defekt in einem mit dem Pathomechanismus assoziierten Gen, möglicherweise einen Phänotyp ähnlich der Myotonen Dystrophie verursachen kann. Diese Fragestellung soll anhand einer Kohorte von Patienten mit dem typischen DM-Phänotyp, jedoch ohne Repeatexpansion in den bekannten Genen analysiert werden. Es sollten geeignete Kandidatengene gefunden und diese auf pathogene Varianten hin untersucht werden. Anschließend an die Sequenzierung sollten funktionelle Analysen zur Überprüfung der Pathogenität der identifizierten Varianten angeschlossen werden.

1.6.2 Projekt FSHD

1.6.2.1 Charakterisierung des FSHD Typ 2

Das Ziel dieses Projekts ist die nähere Charakterisierung der kürzlich neu beschriebenen Form der FSHD Typ 2. Neben der Bestätigung der postulierten genetischen Ursache der FSHD2 soll deren Häufigkeit, genetische Variabilität und Vererbung analysiert werden. Dies sollte an einer geeigneten Kohorte von FSHD1-negativen Patienten durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die genetische Heterogenität stellte sich außerdem die Frage nach der Möglichkeit und den Auswirkungen einer kombinierten FSHD Typ 1 und 2. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen in dem FSHD2-assoziierten Gen *SMCHD1* als Modifier auf die FSHD1 wirken könnten. Es soll untersucht werden, ob Patienten mit Defekten in beiden Loci einen schwereren Phänotyp zeigen, als Patienten mit nur einer pathogenen Variante. Dieser Fragestellung wurde durch die Analyse einer FSHD1-positiven Patientenkohorte nachgegangen.

Außerdem sollten labordiagnostische Kriterien und ein sinnvoller Arbeitsablauf für die Routinediagnostik der FSHD2 erarbeitet und etabliert werden.

1.6.2.2 Auswirkung von SMCHD1-Mutationen auf die X-Inaktivierung

Studien an Maus-Modellen mit einem Defekt in dem *SMCHD1*-Gen ergaben einen Zusammenhang zwischen dem Gendefekt und einer Störung der Gen-Dosis-Kompensation des zweiten X-

Chromosoms bei weiblichen Tieren. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte untersucht werden, ob auch beim Menschen ein Effekt von Mutationen in *SMCHD1* auf den Zustand der X-Inaktivierung gefunden werden kann. Dies sollte an der Gruppe weiblicher FSHD2-Patientinnen aus dem vorangegangenen Teilprojekt untersucht werden.

2 PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit der klinischen Eingangsdiagnose einer neuromuskulären Erkrankung, aber ohne genetischen Befund weiter charakterisiert, um die genetische Ursache der Erkrankung aufzuklären. Die Patienten stammen aus dem Kollektiv unseres Routinelabors. Die Auswahl erfolgte über die erste Verdachtsdiagnose und Beschreibung des Phänotyps der Patienten durch erfahrene Neurologen, sowie die Ergebnisse routinediagnostischer Untersuchungen. Von allen untersuchten Patienten liegt eine Einverständniserklärung über die Durchführung genetischer Analysen vor.

2.1.1 Myotone Dystrophie

Es wurden Patienten mit der klinischen Erstdiagnose Myotone Dystrophie näher charakterisiert, für die bislang kein genetischer Befund gestellt werden konnte, um eine mögliche gemeinsame Ursache aufzudecken.

In die Studie wurden 138 Indexpatienten eingeschlossen, die nach den allgemeinen phänotypischen Kriterien - progressive Muskelschwäche und Myotonie, nach Harper (2001) und Moxley (1998), an einer Myotonen Dystrophie leiden. Außerdem wurden im Vorfeld der Studie die bekannten genetischen Defekte in den Genen *DMPK* und *CNBP* im Rahmen der Routinediagnostik ausgeschlossen.

Für alle beschriebenen Analysen wurde als Untersuchungsmaterial genomische DNA aus peripherem Blut verwendet (siehe 2.2.1 a). Für die Untersuchung von Effekten auf cDNA-Ebene wurde RNA aus peripherem Blut verwendet (siehe 2.2.1 b).

2.1.2 FSHD

In der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen zu dem postulierten FSHD Typ 2 durchgeführt werden. Dazu wurden zwei Gruppen von Patienten mit dem Phänotyp FSHD genauer charakterisiert. In Gruppe A wurden 55 nicht-verwandte Indexpatienten mit dem klassischen FSHD-Phänotyp, definiert nach Padberg (1982) untersucht. Im Vorfeld der Studie wurde eine Kontraktion des FSHD-Lokus bei diesen Patienten ausgeschlossen, Gruppe A ist demnach FSHD1-negativ. In einer zweiten Gruppe (Gruppe B) wurden 40 FSHD1-Patienten mit einer Kontraktion auf dem FSHD-Lokus näher untersucht. Davon zeigten 30 Patienten eine grenzwertige Anzahl von Repeateinheiten (10 oder 11 Einheiten), was im Hinblick auf eine reduzierte Penetranz solcher Allele von Interesse sein könnte. Zwei Patienten zeigten ein ungewöhnliches Ergebnis im Southern Blot, was auf 4q/10q-Hybridallele hindeuten könnte. Acht Patienten zeigten einen deutlich schwereren Phänotyp, als es die

nachgewiesene Anzahl an Repeateinheiten vermuten ließ (2 bis 9 Repeats). Wenn verfügbar, wurden verwandte Personen von den in der Studie diagnostizierten FSHD2-Patienten zur Bestätigung der Segregation der jeweiligen Variante untersucht. Voruntersuchungen des FSHD-Lokus wurden im Rahmen der Routinediagnostik in Form eines Southern Blots durchgeführt.

2.2 Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden allgemeine Methoden beschrieben, die Bausteine für verschiedene Analysen bilden. Die dazu verwendeten Methoden und Kits werden hier vorgestellt und die grundsätzliche Funktionsweise erläutert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung laut den Angaben des Herstellers oder der Standard-Arbeitsanweisung des Diagnostiklabors der Universität Würzburg (AA).

2.2.1 Methoden zur Isolierung, Reinigung, Quantifizierung von Nukleinsäuren

In der vorliegenden Arbeit wurden Nukleinsäuren (DNA und RNA) mit verschiedenen Verfahren aus Blut isoliert. Für die weitere Analyse wurden die gewonnenen Proben auf verschiedene Weise quantifiziert und für manche Analysen gereinigt.

a. DNA Isolierung

Bei der Isolierung von DNA aus Blut werden zunächst die Erythrozyten durch eine hypotonische Behandlung lysiert und anschließend die Lymphozyten durch Zentrifugation abgetrennt. Die Lyse der kernhaltigen Zellen erfolgt mittels Detergenz und Proteinase K. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration werden Zellbestandteile ausgefällt und abzentrifugiert. Die hochmolekulare DNA wird aus dem wässrigen Überstand durch ethanolische Fällung gewonnen (AA 0010). Die DNA-Isolierung wurde nicht selbstständig durchgeführt.

b. RNA Isolierung

Zur RNA Isolierung werden Blutproben mit dem *PAXgene Blood RNA Tube (PreAnalytiX, Qiagen, Hilden, Deutschland)* abgenommen und anschließend die RNA mit dem *PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX, Qiagen)* isoliert. Das *PAXgene Blood RNA Tube* enthält eine stabilisierende Lösung, welche die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und inaktiviert, wodurch die Degradation der RNA durch RNasen unterbunden wird. Auf diese Weise wird zuverlässig die *in vivo* Genexpression für bis zu 3 Tage bei RT (Raumtemperatur) und für längere Zeit bei -20 °C konserviert. Durch Zentrifugation werden zunächst alle Nukleinsäuren und auch Zellfragmente pelletiert. Proteine werden durch Proteinase K verdaut und Zellfragmente über ein Schredder-Säulchen zerkleinert und durch Zentrifugation abgetrennt. Die gesamt-RNA im Überstand bindet an eine Silica-Membran. Reste von DNA werden hier durch DNase verdaut. Die gesamt-RNA kann nun eluiert werden.

c. Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Die schnellste Methode ist die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Photometers (AA 0060). Diese Methode ist nur für hohe DNA Konzentrationen (5-50 µg/mL) geeignet. Geringere Konzentrationen und eine höhere Messgenauigkeit werden mit fluorometrischen Bestimmungen erzielt. Hier wurden das Qubit BR und HS Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und das Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) verwendet (AA 0070).

Mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) ist eine Bestimmung der Qualität und Quantität der DNA möglich. Dabei wird eine chipbasierte Kapillar-Gelelektrophorese mit fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten durchgeführt. Das Agilent DNA 1000 Kit wird zur Beurteilung von Amplikon-Bibliotheken für NGS verwendet. Das High Sensitivity DNA Analysis Kit wird zur Größenbestimmung und Quantifizierung von PCR-Produkten eingesetzt. Die Kits werden jeweils in Verbindung mit dem jeweiligen Chip (DNA 1000 Chip und High Sensitivity DNA Chip) verwendet.

d. DNA-Reinigungsverfahren

Das klassische Verfahren zur Reinigung und gleichzeitig Konzentrierung von DNA stellt die ethanolische Fällung dar. Durch Zugabe von einfach geladenem Salz und Alkohol zu der DNA-Lösung fällt die DNA spontan aus. Nach dem Pelletieren durch Zentrifugation wird sie mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze und andere wasserlösliche Substanzen zu entfernen. Bei niedrigen DNA-Konzentrationen in der Ausgangslösung kann eine Inkubation bei niedrigen Temperaturen und eine längere Zentrifugationszeit durchgeführt werden.

Standardprotokoll:

- 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5x Volumen 100 % Ethanol zugeben, mischen
- 15 min bei 5900 rpm und RT zentrifugieren, Überstand abnehmen und verwerfen
- 5x Volumen 70 % Ethanol zugeben, mischen
- 5 min bei 5900 rpm und RT zentrifugieren, Überstand abnehmen und verwerfen
- Pellet kurz trocknen lassen, in gewünschtem Lösungsmittel (z.B. Wasser, TE-Puffer oder Formamid) aufnehmen

Zur Vorbereitung auf die Sanger Sequenzierung erfolgte eine Reinigung von PCR-Produkten mittels Exo/SAP-Verdau (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Dabei verdaut das Enzym *Exonuclease I* (Exo) einzelsträngige DNA in 3'→5'-Richtung und entlässt Mononukleotide. Das Enzym *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) dephosphoryliert dNTPs, es kann durch Hitze vollständig inaktiviert werden. In einem PCR-Ansatz werden auf diese Weise Primer-Reste und Nukleotide entfernt.

Mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) können Primer, Nukleotide, Enzyme, Salze und andere Verunreinigungen aus einem Reaktionsansatz entfernen werden. Bei diesem Reinigungsverfahren über Silica-Säulchen ermöglicht die Silica-Membran die Bindung von DNA in Hoch-Salz-Puffern und die Elution in Niedrig-Salz-Puffern.

Auch das Agencourt AMPureXP PCR Purification system (Beckman Coulter, Krefeld Deutschland) bietet eine Möglichkeit zur Reinigung von PCR-Produkten von den oben genannten Verunreinigungen. Dabei bindet die DNA an magnetische Beads und alle Verunreinigungen können gewaschen werden.

Eine ähnliche Methode stellt das Agencourt CleanSEQ system (Beckman Coulter) dar, welches zur Aufreinigung von Sequenzierprodukten nach dem Cycle-Sequencing verwendet wird. Auch hier bindet die DNA an magnetische Beads und Verunreinigungen werden mit Ethanol gewaschen. Der Prozess ist mit dem Pipettierroboter JANUS (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) vollständig automatisiert (AA 0870).

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments aus einer Mischung wird eine Gelextraktion mit dem QIAXEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Zunächst wird das Produktgemisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Gel erfolgt über Solubilisierung und die selektive Adsorption der DNA an Silica-Gel Partikel.

2.2.2 Spaltung und Modifikation von DNA

Für verschiedene Anwendungen wird die genomische oder amplifizierte DNA enzymatisch oder chemisch verändert.

a. Bisulfit-Konvertierung

Mit der Methode der Bisulfit-Konvertierung wird die DNA-Methylierung des Cytosin (C) in 5'-CpG-3' konserviert und kann in einer analytischen Sequenzierreaktion charakterisiert werden [Frommer *et al.* 1992]. Durch die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit kommt es zu einer Deaminierungsreaktion an dem Cytosinring und es entsteht ein Uracil (U). Ist das Cytosin methyliert, schützt die Methylgruppe das C vor dieser Reaktion, wodurch dieses als C erhalten bleibt (siehe Abbildung 13). Die Bisulfit-Konvertierung wurde mit dem *Epi Tect Bisulfite Kit* (Qiagen) durchgeführt.

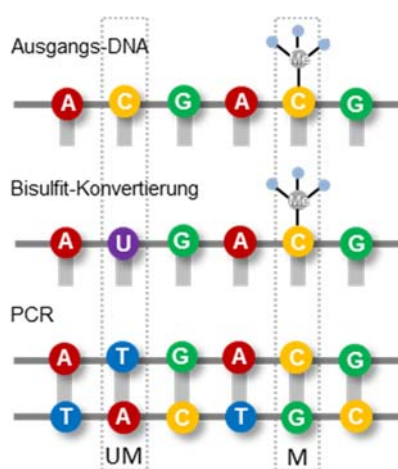


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Bisulfit-Konvertierung. Beispielhaft sind ein unmethyliertes (UM) und eines methyliertes (M) CpG gezeigt. Nach Bisulfit-Konvertierung und Amplifikation in der PCR liegt anstelle des UM Cytosin (C) ein Thymin (T) vor, das methylierte Cytosin bleibt als solches erhalten. A: Adenin, G: Guanin, Me: Methylgruppe.

b. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch spalten. Der Restriktionsverdau kann diagnostisch genutzt werden, um genomische DNA zu fragmentieren oder auch, um in amplifizierter DNA eine Mutation/Sequenzvariante nachzuweisen, bei der eine Restriktionsschnittstelle wegfällt oder neu entsteht. In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt. Der Verdau wird jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem durchgeführt.

Tabelle 3: Restriktionsenzyme und Reaktionsbedingungen.

Enzym	Analyse	Hersteller	Konzentration	Reaktionsbedingungen
<i>EcoRI</i>	FSHD Methylierung	TaKaRa Bio (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	20.000 U/mL	2 µL 2 h bei 37 °C
<i>BglII</i>	FSHD Methylierung	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)	10.000 U/mL	4 µL 2 h bei 37 °C
<i>FseI</i>	FSHD Methylierung	New England Biolabs	2.000 U/mL	6 µL 2 h + 2 µL 2 h + 1 µL, 0,5 h bei 37 °C
<i>Hpy188I</i>	FSHD Haplotyp	New England Biolabs		2 µL 3 h bei 37 °C
<i>Hpy188III</i>	FSHD Haplotyp	New England Biolabs	5.000 U/mL	2 µL 1 h + 1 µL 1 h + 1 µL 1 h bei 37 °C
<i>HpaII</i>	X-Inaktivierung	Invitrogen	10.000 U/mL	0,5 µL 4 h + 0,3 µL 1 h + 0,2 µL, 20 min bei 37 °C

c. Labeling von Sonden-DNA

Das Labeling von Sonden-DNA mit Biotin wird mit dem *BioPrime DNA Labeling System Kit (Invitrogen)* durchgeführt. Random Primer (Oktamere) binden an die denaturierte Template-DNA und werden durch das Klenow Fragment der DNA Polymerase I unter Anwesenheit von Biotin-14-dCTP verlängert. Es werden Biotin-gelabelte Produkte von im Mittel 100 bp gebildet.

Radioaktives Labeling mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wird mit dem *Rediprime II DNA Labeling System Kit (Amersham, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)* durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist ähnlich der zuvor beschriebenen. Random Primer (Hexamere) dienen dem Klenow Fragment als Primer zur Synthese eines neuen Stranges. Durch den Ersatz eines Nukleotids durch ein radioaktiv gelabeltes Äquivalent wird ein radioaktives Produkt erhalten.

Die Produkte aus den beiden zuvor beschriebenen Labeling-Methoden können für verschiedene Hybridisierungsverfahren wie den Southern Blot oder *in situ* Hybridisierung eingesetzt werden.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis *et al.* 1986] ist ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Dabei wird, beginnend von der Template-DNA mittels einer DNA-Polymerase, ausgehend von kurzen Oligonukleotiden (Primer), welche komplementär zu Anfang und Ende der zu amplifizierenden Sequenz sind, die Zielsequenz amplifiziert. Voraussetzung ist demnach die Kenntnis von Anfang und Ende der Zielsequenz. Die Synthese erfolgt in drei temperaturabhängigen Schritten in einem Thermocycler, welche in Zyklen wiederholt werden. Zunächst wird die Template-DNA thermisch denaturiert. Anschließend hybridisieren die Primer und bilden den Startpunkt für die Synthese des neuen Stranges durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung. Im nächsten Zyklus wird der Doppelstrang erneut denaturiert, die Primer lagern sich an und es erfolgt die Elongation des komplementären Stranges. Dadurch wird die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt.

Zur Optimierung der PCR können die Temperatur, Polymerase, Zyklenzahl und -länge, sowie Zusätze angepasst werden.

a. Primer Design

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer mit der Software Primer 3 [Untergasser *et al.* 2012] designet. Dazu wurden die Standardeinstellungen verwendet. Die Individualität der Primer wurde mit BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) geprüft, mit der Software SNPCheck (<https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>) wurden sie auf häufige SNPs hin untersucht. Zur Amplifikation eines Exons wurden als Zielsequenz ca. 50 bp in das Intron hinein mit eingeschlossen.

b. Standard PCR

Unter Standardbedingungen wird eine PCR mit der *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* durchgeführt. Sie verfügt über eine 5'→3' DNA Polymerase Aktivität und eine 5'→3' Exonuklease Aktivität und amplifiziert Fragmente bis zu 5 kb mit einer Geschwindigkeit von 35-150 nt/sec. Zur Amplifikation wird eine Annealing-Temperatur von ca. 2-3 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers gewählt.

Reaktionsansatz:

23 µL	Puffer A
0,2 µL	Taq DNA Polymerase (5 U/µL)
1 µL	forward-Primer (10 pmol/µL)
1 µL	reverse-Primer (10 pmol/µL)
<hr/>	
25 µL	
+ 1-2 µL	Template DNA (1 µL genomische DNA, 2 µL cDNA oder + 2 µL Bisulfit konvertierte DNA)

Ist eine größere Genauigkeit des Produkts erforderlich, wird die *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* verwendet, welche einen Antikörper enthält, der die Aktivität der Polymerase bei Raumtemperatur unterdrückt und so unspezifische Anlagerung und Elongation der Primer vermeidet. Sie amplifizieren Produkte bis zu einer Größe von 10 kb.

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	30 s	
Annealing	54-60	30 s	30x
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	72	3 min	
Haltetemperatur	10	-	

c. Long-Range PCR

Für die Amplifikation von großen Produkten zwischen 5 und 20 kb stehen drei verschiedene PCR-Systeme zur Verfügung. Alle Systeme setzen sich aus einer thermostabilen Taq DNA-Polymerase und einer DNA-Polymerase mit *proofreading* Funktion durch eine 3'→5' Exonuklease Aktivität zusammen, was eine lange Leseweite mit großer Genauigkeit ermöglicht.

Unter Standardbedingungen wird das *Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland)* eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Mix 1	8,25 µL	A.dest	Mix 2	6,4 µL	A.dest
	1,25 µL	dNTPs (10mM)		5 µL	5x Puffer mit MgCl ₂
	<u>9,5 µL</u>			0,35 µL	Enzym Mix
	+ 1 µL	forward-Primer (10 pmol/µL)		<u>12,5 µL</u>	
	+ 1 µL	reverse-Primer (10 pmol/µL)			
	+ 1 µL	Template DNA			

Der Reaktionsansatz wird auf Eis pipettiert. Es wird zunächst der Master Mix 1 und dann der Master Mix 2 vorbereitet und diese anschließend zusammengegeben.

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	92	2 min	
Denaturierung	92	10 s	
Annealing	55-58	30 s	10x
Elongation	68	3/6 min	
Denaturierung	92	10 s	
Annealing	55-58	30 s	25x
Elongation	68	3/6 min + 20 s/Zyklus	
Finale Elongation	68	7 min	
Haltetemperatur	4	-	

Das *Qiagen Long Range PCR Kit (Qiagen)* ermöglicht die Amplifikation von sehr langen (bis zu 40 kb) und auch GC-reichen Sequenzen.

Reaktionsansatz:

2,5 µL	10x Puffer
1,25 µL	dNTPs (10 pmol/µL)
0,2 µL	Enzyme LR Qiagen
18 µL	A.dest
<hr/>	
22 µL	
+ 1 µL	forward-Primer (10 pmol/µL)
+ 1 µL	reverse-Primer (10 pmol/µL)
+ 1-2 µL	Template DNA (50-500 ng/µL)

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	93	3min	
Denaturierung	93	15 s	
Annealing	56-58	30 s	35x
Elongation	68	6 min	
Finale Elongation	68	3 min	
Haltetemperatur	4	-	

Die *TaKaRa LA Taq Hot Start Polymerase* (TaKaRa Bio Inc.) verfügt wie die *Platinum Taq DNA Polymerase* über einen Antikörper, der die Aktivität bei Raumtemperatur unterbindet.

Reaktionsansatz:

2,5 µL	10x LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)
4 µL	dNTP mix (2,5 mM each)
0,25 µL	TaKaRa LA Taq HS (5 U/µL)
15,25 µL	A.dest
<hr/>	
22 µL	
+ 1 µL	forward-Primer (10 pmol/µL)
+ 1 µL	reverse-Primer (10 pmol/µL)
+ 1 µL	Template DNA

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	3min	
Denaturierung	98	10 s	35x
Annealing	58-60	30 s	
Elongation	68	10 min	
Finale Elongation	72	10 min	
Haltetemperatur	4	-	

d. Fluidigm Access Array PCR

Die Fluidigm Access Array PCR (*Fluidigm*, South San Francisco, CA, USA) dient der Vorbereitung von DNA-Proben auf eine NGS-basierte Amplikon-Sequenzierung. Die Methode vereint dabei die Anreicherung und Probenvorbereitung der DNA-Bibliothek in einem Schritt. Es werden in einem Arbeitsgang DNA-Proben von bis zu 48 Patienten mit 48 Primerpaaren amplifiziert. Die DNA jedes Patienten wird dabei mit einem individuellen Barcode-Adapter versehen, um die Zuordnung der Probe zu gewährleisten. Die PCR-basierte Amplikon Anreicherung wird in einem Chip (48.48 Access Array Integrated Fluidic Circuit) durchgeführt und nach dem User Manual *Access Array™ System for 454 Sequencing Platform* vorbereitet. Für die Durchführung werden das *Fast Start Fidelity PCR System Kit*, *dNTPack* und das *48.48 Loading Reagent Kit (Fluidigm)* verwendet. Die eingesetzte DNA wird zuvor auf 50 ng/μL eingestellt. Speziell designte Primer und Barcodes wurden ebenfalls von Fluidigm bezogen. Die Sequenzen sind in Anlage 7.1 angegeben.

Bei der Access Array PCR findet eine Amplifikation der DNA jedes Patienten mit bis zu 48 verschiedenen Primerpaaren statt. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 14. Jede einzelne PCR wird im Nanoliter-Maßstab in dem Chip durchgeführt und am Ende die Produkte jedes Patienten wieder vereint. Durch die Barcode-Primer können anschließend auch verschiedene Patienten gepoolt werden. [Voelkerding *et al.* 2010, Zernant *et al.* 2011]

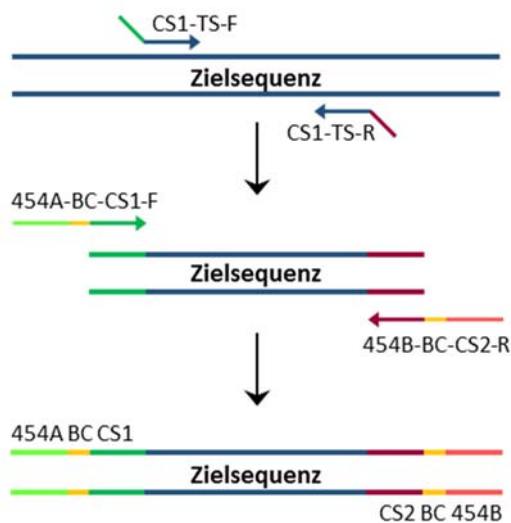


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Access Array PCR mit Anreicherung und Probenvorbereitung der DNA-Bibliothek. Mit targetspezifischen *forward* und *reverse* Primern (TS-F und TS-R) findet eine Amplifikation der Zielsequenzen statt. Die TS-Primer tragen einen Überhang mit den universellen Consensus-Sequenzen (CS1 und CS2). Diese werden im nächsten Schritt von CS-Primern erkannt, welche als Überhang den individuellen Barcode (BC) und spezifischen *forward*- bzw. *reverse*-Adapter für die Roche-Sequenzierung (454A und 454B) tragen. Es entsteht ein Produkt, welches flankiert von Sequenzier-Adapter, Barcode und Consensus-Sequenz die Zielsequenz enthält.

e. cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wird mit der *SuperScript® II Reversen Transcriptase (Invitrogen)* durchgeführt. Durch die Verwendung von Oligo-dT Primern als Startpunkt für die Synthese wird selektiv mRNA in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Diese macht ca. 2 % der gesamt-RNA aus. Es werden Produkte bis zu 12 kb Länge gebildet.

Reaktionsansatz:

Mix 1	11 μ L	gesamt-RNA
	1 μ L	Oligo dT18 Primer (10 pmol/ μ L)
	1 μ L	dNTP-Mix (10mM)

Mix 1 für 3 min bei 72 °C inkubieren
auf Eis stellen, kurz anzentrifugieren

Mix 2	4 μ L	5x Superskript Puffer
	2 μ L	DTT (0,1 M)
	<hr style="width: 50px; margin-left: 0;"/>	
	6 μ L	

Mix 2 zugeben
2 min bei 42 °C inkubieren

+ 1 μ L Superskript II im Cyclor zugeben

50 min bei 42 °C inkubieren
15 min bei 70 °C inkubieren

2.2.4 Größenauftrennung von DNA-Fragmenten durch Elektrophorese

Ein Gemisch aus DNA-Fragmenten kann mit Hilfe der Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt werden. Dazu wird die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen, welches in einer Pufferlösung liegt. Über Elektroden wird ein Spannungsfeld angelegt. Die DNA-Fragmente sind negativ geladen und wandern durch das poröse Gel in Richtung der Kathode. Kleine Fragmente wandern dabei schneller, als große, wodurch mit Hilfe eines bekannten Markers eine Größenbestimmung vorgenommen werden kann. Die Sichtbarmachung der Proben erfolgt durch interkalierende Farbstoffe, hier *HDGreen DNA Stain (Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland)*. Abhängig von der Konzentration der Agarose, Spannung und Laufzeit kann die Elektrophorese für verschiedene Fragmentgrößen optimiert werden. Sie ist geeignet für Fragmente zwischen 100 bp und 30 kb.

a. Lineare Gelelektrophorese

Für die lineare Gelelektrophorese wird ein 100 mL Agarosegel hergestellt und 5 μ L des Farbstoffs *HDGreen* direkt in das Gel gegeben.

Für den Southern Blot wird ein 500 mL *Biozym LE Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland)* hergestellt und kein Farbstoff zugegeben. Das Gel wird nach der Elektrophorese in Puffer mit 40 μ L Farbstoff für min. 20 min gefärbt. Die verwendeten Gelelektrophorese-Bedingungen sind in Tabelle 4 angegeben. Alle Gele laufen in dem TAE-Puffersystem (pH 8,0).

Als Größenstandard werden je nach erwarteter Produktgröße verschiedene Marker verwendet:

100 bp Ladder (*Invitrogen*): 100 bp bis 2072 bp

1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*): 100 bp bis 12000 bp

Tabelle 4: Agarosegelelektrophorese-Bedingungen.

Analyse	Agarose-Konz.	Spannung	Laufzeit
PCR-Probegegel	1-3 %	110-150 V	15-45 min
Restriktionsverdau-Probegegel	0,7 %	110 V	30 min
FSHD Methylierung Southern Blot	0,5 %	30 V	24 h
FSHD Haplotyp	3 %	110 V	60 min

b. Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse stellt eine weitere Methode zur Bestimmung der Fragmentgröße dar. Hier werden die Fragmente zunächst in einer PCR-Reaktion mit einem Farbstoff-markierten Primer amplifiziert und gleichzeitig gelabelt und anschließend in einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese am ABI Sequencer (*Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland*) aufgetrennt. Hier können Unterschiede in einem Basenpaar detektiert werden. Die Daten werden mit der Software GeneMapper 4.0 (*Applied Biosystems*) analysiert.

Die Methode wird zum Beispiel zur Analyse von Sequenzlängenpolymorphismen eingesetzt.

Probenvorbereitung nach PCR:

Analyse	PCR-Produkt	Größenstandard	Formamid	Injektionszeit
X-Inaktivierung	1,2 µL	0,5 µL ROX *	25 µL	20 s

*GeneScan™ 500 ROX™ dye Size Standard (*Applied Biosystems*)

Der Reaktionsansatz wird vor dem Auftragen auf den Sequenzer für 10 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.5 Sequenzierung

Durch die Sequenzierung von DNA wird die Abfolge der DNA-Basen bestimmt.

a. Kettenabbruch-Synthese nach Sanger

Das klassische Verfahren stellt die Sanger Sequenzierung dar, welche in den 1970er Jahren von Frederick Sanger entwickelt wurde. Analog zu einer PCR wird hier eine DNA-Synthese ausgehend von einem Primer durchgeführt. Dem Ansatz werden zusätzlich zu dNTPs auch Didesoxyribonukleotide (ddNPs) zugefügt. Werden diese in den DNA-Strang eingebaut, kann durch die fehlende 3'-OH-Gruppe der Strang nicht weitergeführt werden, was als Kettenabbruch bezeichnet wird. Statistisch erfolgt an jeder Position des DNA-Stranges dieser Abbruch [Sanger *et al.* 1977]. Durch unterschiedliche Fluoreszenz-Markierung der ddNTPs und Größenauftrennung der Fragmente in einer Kapillare, kann die Sequenz ermittelt werden. Die Sequenzierung wird hier an den ABI Sequenzier-Plattformen 3130xL *Genetic Analyzer* und 3730xL *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*)

durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt mit der Software Gensearch (*PhenoSystems*, Wallona, Belgien).

Für das Cycle-Sequencing werden jeweils ein *forward* und ein *reverse* Ansatz vorbereitet.

Reaktionsansatz:

23 µL	PCR-Puffer A oder B
1 µL	forward bzw. reverse Primer
1 µL	A.dest
0,3 µL	Taq DNA Polymerase
<hr/>	
25,3 µL	

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	2 min 30 s	
Denaturierung	98	20 s	
Annealing	56-60	1 min 30 s	30x
Elongation	50	2 min	
Finale Elongation	50	3 min	
Haltetemperatur	15	-	

b. Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung stellt eine „Sequencing-by-Synthesis“-Methode dar, bei der die Basensequenz direkt während der Strangsynthese ermittelt wird. Dabei sind mehrere Enzyme beteiligt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von einem Primer den komplementären DNA-Strang. Bei dem Einbau eines Nukleotids wird ein Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, welches von dem Enzym ATP-Sulfonylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt wird. ATP wiederum treibt eine Luziferase-Reaktion an, wobei Luziferin in Oxyluziferin umgesetzt wird. Dabei entsteht ein Lichtsignal, welches von einem Detektor erfasst wird. Zu der Reaktion wird jeweils nur eines der vier Nukleotide zugegeben, wodurch nur bei passender Sequenz ein Lichtsignal entsteht. Überschüssige Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut, bevor das nächste Nukleotid zugegeben wird [Ronaghi *et al.* 1998]. Durch eine hohe Genauigkeit ist die Methode gut geeignet zur Untersuchung der Methylierung in Bisulfit-konvertierter DNA [Tost *et al.* 2003]. Als Sequenzierplattform wird der PyroMark MD (*Qiagen*) verwendet, die Datenanalyse erfolgt mit der Software PyroQ-CpG.

c. Next Generation Sequencing (NGS)

Unter Next Generation Sequencing (NGS) werden verschiedene neuere Sequenziermethoden und Plattformen zusammengefasst. Durch eine millionenfache parallele Sequenzierung von Zielsequenzen ergibt sich eine deutliche Steigerung des Umfangs und der Geschwindigkeit im Vergleich zu der klassischen Kapillarsequenzierung. Mit den NGS-Technologien lässt sich demnach

ein höherer Durchsatz erzielen. Grundsätzlich muss zunächst eine DNA-Bibliothek hergestellt werden, die schließlich in die Sequenzierreaktion eingesetzt wird. Diese Probenanreicherung kann durch PCR-basierte Amplifikation der Zielregionen gewonnen werden, oder direkt durch Fragmentierung der Template-DNA und anschließender Hybridisierung mit Ziel-spezifischen Sonden. Zur Vorbereitung für die Sequenzierung müssen die zu sequenzierenden Fragmente mit Adaptoren versehen werden. In PCR-basierten Verfahren können diese direkt über die Primer angehängt werden, bei der Fragmentierung genomischer DNA kann dies über die sog. Tagmentierung geschehen. Dabei wird die genomische DNA enzymatisch von Transposase-Homodimeren angegriffen, welche synthetische Oligonukleotide tragen. In einer Reaktion wird die DNA also an zufälligen Stellen gleichzeitig fragmentiert und eine Adaptersequenz angefügt. [Metzker 2010]

Häufig genutzte und auch hier verwendete Plattformen sind von den Herstellern Roche und Illumina (San Diego, CA, USA).

Für die Sequenzierung von Roche wird eine Amplikon-basierte DNA-Bibliothek eingesetzt, die durch verschiedene PCR-basierte Methoden gewonnen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fluidigm Access Array PCR durchgeführt (2.2.3 d). Für die Probenanreicherung wird eine Emulsions-PCR (emPCR) genutzt, bei der die Amplifikation der Library in winzigen Wassertröpfchen in einem Öl-Wasser-Gemisch stattfindet. Ziel ist es, eine monoklonale Amplifikation eines Template-Moleküls pro Reaktionsvolumen zu erreichen. Die Sequenzierung verläuft nach dem Prinzip der Pyrosequenzierung. Mit dem GS Junior können rund 35 Mb einer Amplikonlänge bis zu 400 bp sequenziert werden. Dies ergibt etwa 70.000 Reads pro Sequenzierlauf.

Bei der Sequenzierung von Illumina findet zunächst eine klonale Amplifikation der DNA in Form einer Brücken-Amplifikation statt. Dies geschieht auf der Oberfläche einer Flow-Cell, welche komplementäre Nukleotide enthält. Dadurch entstehen dicht gepackte Cluster der gleichen Sequenz, die anschließend über ein, der klassischen Kettenabbruch-Synthese ähnliches, „Sequencing-by-Synthesis“ Prinzip sequenziert werden. Der Unterschied liegt lediglich in der Entfernung der Schutzgruppe und Fluoreszenzmarkierung, wodurch ein neuer Zyklus direkt nach der Detektion gestartet werden kann. Mit dem MiSeq können 4,5 - 5,1 Gb Sequenzoutput mit Paired-End Reads von 2x 150 bp Länge erzeugt werden. Dies ergibt etwa 24 - 30 Millionen Paired-End Reads pro Lauf.

Für diese Arbeit wurde eine Panelsequenzierung von 37 Muskelgenen durchgeführt, eine Liste der Gene befindet sich in Anlage 7.1. Die Anreicherung und Sequenzierung mit dem Illumina MiSeq wurde nicht selbstständig durchgeführt.

2.3 Spezielle Methoden

Im Folgenden sind spezielle Methoden dargestellt, die in dieser Arbeit angewandt wurden. Die einzelnen Arbeitsschritte beziehen sich auf die in 2.2 beschriebenen allgemeinen Methoden sowie auf die Angaben des Herstellers, die Anweisungen der SOPs (*Standard Operating Procedure*) von *GenomicVision* (Paris, Frankreich) oder die Standard-Arbeitsanweisungen der Universität Würzburg.

2.3.1 NGS mit dem GS Junior

Für die Fragestellung nach pathogenen Varianten in Kandidatengenen für bestimmte Erkrankungen, werden diese in einer geeigneten Kohorte von Patienten mit dem entsprechenden Phänotyp mittels NGS sequenziert. Es wird eine Amplikon-basierte Anreicherung mit dem Fluidigm Access Array System (2.2.3 d) und anschließender Sequenzierung mit GS Junior (2.2.5 c) durchgeführt (AA 1160). Die Datenanalyse erfolgt mit der Software GensearchNGS [Wolf *et al.* 2015].

a. Assay-Design

Zur Untersuchung von drei verschiedenen Patientenkohorten in den Projekten FSHD und DM werden Assays zur Amplikon-basierten Anreicherung von Kandidatengenen designet (siehe Tabelle 5). Ziel ist es, die translatierten Bereiche aller Transkripte abzudecken. Für den Assay werden Amplikons einer Größe zwischen 315 und 550 bp designet. Große Exons werden mit mehreren überlappenden Amplikons abgedeckt. Primer werden von Fluidigm designet, die Primer-Liste findet sich in Anlage 7.1. In der Primerstock-Lösung liegen *forward* und *reverse* Primer gemischt in einer Konzentration von 50 μ M vor.

Tabelle 5: Assays zur Amplikon-basierten NGS-Analyse von Kandidatengenen.

Assay	Gen	Transkript GRCh37, hg19	Ensembl Transkript ID	Exons	Transkriptgröße
FSHD	<i>SMCHD1</i> (MIM *614982)	NM_015295.2	ENST00000320876	48	8821 bp, 2005 AS
DM	<i>DMPK</i> (MIM *605377)	NM_001081563.2	ENST00000343373	14	3227 bp, 639 AS
		-	ENST00000588522	+ Ex02	59 bp
		NM_004409.3	ENST00000291270	+ Ex08	264 bp
	<i>CNBP</i> (MIM *116955)	NM_001127192.1	ENST00000422453	5	1664 bp, 177 AS
	<i>MBNL1</i> (MIM *606516)	NM_021038.3	ENST00000324210	10	5465 bp, 382 AS
		-	ENST00000282486	+ Ex06a	54 bp
		-	ENST00000485509	+ Ex06b	64 bp
<i>CELF1</i> (MIM *601074)	NM_001172639.1	ENST00000532048	16	3044 bp, 512 AS	

b. Probenvorbereitung

Zur Herstellung der DNA-Bibliothek für die Sequenzierung mit dem GS Junior kommen unter 2.2 beschriebene Methoden zur Anwendung. Abweichungen von den Angaben im User Manual *Access Array™ System for 454 Sequencing Platform* sind im Folgenden angegeben.

Es werden zwei Fluidigm Access Array PCR Assays durchgeführt (2.2.3 d). Diese enthalten eine unterschiedliche Anzahl an Amplikons, was die mögliche Patientenzahl in einer Anreicherung beeinflusst:

- FSHD-Assay: *SMCHD1* → max. 24 Patienten
- DM-Assay: *DMPK, CNBP, MBNL1, CELF1* → max. 24 Patienten
MBNL1, CELF1 → max. 48 Patienten

Zunächst wird eine Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben mit dem Qubit BR Kit (2.2.1 c) durchgeführt und eine Normalisierung der Proben auf 50 ng/μL vorgenommen. Die für den jeweiligen Assay bestimmten Zielsequenzen werden in einer Access Array PCR (2.2.3 d) amplifiziert. Aus den Produkten wird ein Patienten-Pool mit je 1 μL PCR-Produkt pro Patient hergestellt. Das Gesamtvolumen wird mit A.dest auf 36 μL gebracht. Anschließend erfolgt eine zweimalige Aufreinigung des Pools mit Ampure-Beads (2.2.1 d).

Abweichungen vom User Manual: 36 μL Pool einsetzen (wenn weniger vorhanden, mit TE-Puffer auf 36 μL auffüllen), waschen mit 75 % Ethanol, 1. Elution in 36 μL TE-Puffer, 2. Elution in 20 μL TE-Puffer. Zur Qualitätskontrolle wird eine Analyse der Amplikon-Bibliothek mit dem Bioanalyzer (2.2.1 c) vorgenommen. Dabei soll ein Probenpool mit Produkten der erwarteten Größe und gleichmäßiger Verteilung vorliegen, Primerreste sollen entfernt sein.

Die Amplikon-Bibliothek soll auf eine Konzentration von 5×10^{-9} Moleküle/μL eingestellt werden. Zunächst soll eine Verdünnung des Proben-Pools auf 1×10^{-9} Moleküle/μL hergestellt werden. Ausgehend von den Messergebnissen der Konzentrationsbestimmung mit dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (2.2.1 c) wird die Anzahl an Molekülen/μL Proben-Pool über die folgende Formel berechnet. Dabei entspricht $6,022 \times 10^{23}$ der Avogadrokonstanten (in Moleküle/mol) und $656,6 \times 10^9$ dem durchschnittlichen Molekulargewicht von Nukleotidpaaren (in g/mol).

$$\text{Moleküle}/\mu\text{L} = \frac{\text{Konzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right] \times 6,022 \times 10^{23}}{656,6 \times 10^9 \times \text{Amplikonlänge} [\text{bp}]}$$

Mit Hilfe der berechneten Molekülmenge wird eine Verdünnung des Amplikon-Pools auf 1×10^9 Moleküle/μL hergestellt. Dazu wird 1 μL Amplikon-Pool mit der über die unten stehende Formel berechneten Menge 1x TE-Puffer versetzt.

$$\left(\frac{\text{Moleküle}/\mu\text{L}}{10^9} - 1 \right) \mu\text{L}$$

Aus der erhaltenen Lösung mit 1×10^9 Molekülen/ μL wird ein Ansatz mit 1×10^7 Molekülen/ μL hergestellt, indem 2 μL dieser Lösung in 198 μL A.dest gegeben werden. Für die Sequenzierung werden nun 2 μL dieses Ansatzes mit 38 μL A.dest vermischt, um die gewünschte Molekülmenge von 5×10^9 Moleküle/ μL zu erhalten.

c. Sequenzierung mit dem GS Junior

Die Vorbereitung der Sequenzierung erfolgt nach dem User Manual *emPCR Amplification Method Manual – Lib-A (GS Junior Titanium Series, March 2012)*

Abweichungen vom User Manual (*die Abschnittangaben beziehen sich auf das User Manual*):

- Es werden je 7 μL (A und B) der vorbereiteten DNA-Bibliothek in die Sequenzierung eingesetzt
- Abschnitt 3.2.3.2 *Prepare the Packing Beads*: 3.
Nach dem Waschen der Packing Beads 220 μL BB2 zugeben
- Abschnitt 3.2.3.4 *Prepare the DNA and Packing Beads Mix*: 5.
Die Zusammensetzung des Polymerase-Mixes wurde wie folgt geändert:

44 μL	Polymerase
20 μL	Polymerase Cofactor
75 μL	BB2
- Vor dem Sequenzierlauf wurde ein zusätzlicher Prewash durchgeführt.

d. Datenanalyse mit GensearchNGS und Alamut

Die von dem GS Junior generierten Sequenzdaten werden als *.fna* und als *.qual* Dateien in die Auswertesoftware GensearchNGS [Wolf *et al.* 2015] importiert. Die Daten werden gegen die Referenzsequenz GRCh37 (hg19) alignet. Es werden die folgenden Einstellungen für das Alignment verwendet: Erlaubte Fehlerrate: 8, maximale indel-Länge: 12.

Die ermittelten Varianten werden nach den folgenden Kriterien gefiltert: Minimale Coverage: 4, Frequenz: $\geq 20\%$, Distanz zum nächsten Exon: 21 bp, MAF: $< 0,01$.

Die gefundenen Varianten werden mit dem Software Paket Alamut (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) analysiert. Die Beurteilung von Missense-Mutationen wird mit einem Tool zum Vergleich der Sequenzkonservierung (SIFT) [Ng und Henikoff 2001], einer Pathogenitätsvorhersage von cDNA-Varianten (UMD Predictor) [Frederic *et al.* 2009], der Bestimmung des Grantham Score (PolyPhen-2) [Adzhubei *et al.* 2010] und MutationTaster [Schwarz *et al.* 2010] durchgeführt. Die Veränderung des Spleißverhaltens durch die Variante wird mit Hilfe der Software Tools SplicesiteFinder-like (Alamut-internes Tool), MaxEntScan [Yeo und Burge 2004], NNSPLICE [Reese *et al.* 1997], GeneSplicer [Perteau *et al.* 2001], Human Splicing Finder [Desmet *et al.* 2009] und ESEfinder (*exonic splicing enhancers*) [Cartegni *et al.* 2003] analysiert.

e. Nachsequenzierung

Zur Validierung der gefundenen Sequenzvariante werden potenziell pathogene Varianten und Amplikons mit einer Coverage <20x mittels Sanger Sequenzierung (2.2.5 a) unter Verwendung der NGS-Primer nachsequenziert.

2.3.2 Spleißanalysen

a. Spleißanalysen von *MBNL1*-Targetgenen

MBNL1 ist ein Spleißregulator, der einen dosisabhängigen Einfluss auf das Spleißmuster seiner Targetgene hat. Dieses Spleißverhalten soll in einer semi-quantitativen PCR untersucht werden. Die Targetgene mit dem Spleißverhalten und den Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die PCRs für die verschiedenen Targetgene werden zunächst durch Verwendung von cDNA aus kultivierten HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) validiert. Als Untersuchungsmaterial wird dann RNA aus peripherem Blut verwendet (2.2.1 b). Aus der isolierten gesamt-RNA wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase cDNA synthetisiert (2.2.3 e). Diese wird als Template in die PCR eingesetzt (2.2.3 b). Die Primersequenzen befinden sich in Anlage 7.1. Für eine semiquantitative Auswertung wird die PCR mit 25 Zyklen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt semiquantitativ mit dem *High sensitivity* Chip auf dem Bioanalyzer (2.2.1 c). Es wird die Menge der verschiedenen Spleißprodukte in Form der Fläche unter dem Peak verglichen und in Relation zu der Ladungskontrolle *GAPDH* gesetzt. Die Berechnung der relativen Expression ist in der untenstehenden Formel gezeigt.

$$relative\ Expression\ Transkript\ X = \frac{Transkript\ X \cdot 100}{GAPDH}$$

Die Absoluten Unterschiede in der Expression werden errechnet, indem beide gebildeten Transkripte zusammen als 100 % angenommen werden und anschließend der jeweilige prozentuale Anteil an der Gesamtmenge betrachtet wird.

Tabelle 6: *Spleiß-Targetgene von MBNL1*. Für jedes Gen ist das erwartete Spleißmuster in Anwesenheit (**fett**) und in Abwesenheit (normal) von MBNL1 angegeben.

Gen	MIM	Spleißmuster	Produkt [bp]	PCR	Referenz
GAPDH	138400	-	988	60 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
IR (INSR)	147670	mit Ex 11	173	60 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
		ohne Ex 11	137		
TNNT2 (cTNT)	191045	mit Ex 5	133	58 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
		ohne Ex 5	103		
MBNL2	607327	mit Ex 7	211	60 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
		ohne Ex 7	175		
ZASP (LDB3)	605906	mit Ex 11	360	58 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
		ohne Ex 11	171		
MTMR1	300171	Ex2 - Ex3	346	55 °C	Buj-Bello <i>et al.</i> (2002)
		mit Ex .1,	Ex2.1: 24 bp,		
		mit Ex2.2,	Ex2.2: 27 bp,		
		mit Ex2.3	Ex2.3: 51 bp		
SERCA2 (ATP2A2)	108740	mit Intron 19	538	58 °C	
		ohne Intron 19	456		
FN1	135600	mit EBD*	512	60 °C	Jog <i>et al.</i> (2012)
		ohne EBD	239		
MBNL1	606516	mit Ex 7	325	60 °C	Lin <i>et al.</i> (2006)
		ohne Ex 7	270		
SERCA1 (ATP2A1)	108730	mit Ex 22	204	60 °C	Lin <i>et al.</i> (2006)
		ohne Ex 22	162		
NRAP	602873	mit Ex 12	343	60 °C	Lin <i>et al.</i> (2006)
		ohne Ex 12	238		
CAPN3	114240	mit Ex 16	340	60 °C	Lin <i>et al.</i> (2006)
		ohne Ex 16	226		
SPAG9	605430	mit Ex 26a	238	57 °C	Du <i>et al.</i> (2010)
		ohne Ex 26a	198		
CAPZB	601572	mit Ex 8	375	57 °C	Orengo <i>et al.</i> (2008)
		ohne Ex 8	271		
MTDH	610323	mit Ex 7	534	57 °C	
		ohne Ex 7	435		
PPP2R5C	601645	mit Ex 12	255	57 °C	Du <i>et al.</i> (2010)
		ohne Ex 12	117		

* EBD: *exon-bordering domain*

b. Spleißanalysen von *SMCHD1*

Im *SMCHD1*-Gen wurden unbekannte Spleißvarianten gefunden, deren Effekt auf RNA Ebene näher charakterisiert werden soll. Als Untersuchungsmaterial wird RNA aus peripherem Blut der Patienten

verwendet (2.2.1 b). Aus der isolierten gesamt-RNA wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase cDNA synthetisiert (2.2.3 e). Diese wird als Template in die PCR eingesetzt (2.2.3 b). Die Primer (siehe Anlage 7.1) sind in weiter entfernt liegenden Exons lokalisiert, um auch bei Exon-Skipping ein Produkt in detektierbarer Länge zu erhalten. Die PCR wird mit 35 Zyklen durchgeführt. Das PCR-Produkt wird zunächst sequenziert, um mögliche Spleißveränderungen basengenau erkennen zu können. Für eine semiquantitative Analyse wird der *High sensitivity* Chip des Bioanalyzers (2.2.1 c) eingesetzt. Die Spleißprodukte werden durch Vergleich der Peakflächen ausgewertet. Zur Normalisierung der Proben wird das Haushaltsgen *GAPDH* verwendet.

2.3.3 Strukturanalyse von Proteinen

Zur Interpretation von Veränderungen in der Aminosäuresequenz eines Proteins werden bioinformatische Strukturanalysen durchgeführt. Die Analyse erfolgt mit Hilfe der Software Swiss-Model [Biasini et al. 2014], welche 3D-Modelle auf der Basis bekannter Kristallstruktur erstellt.

Für die ersten beiden Zinkfinger des MBNL1-Proteins wird die Struktur PDB: 3D2N [Teplova und Patel 2008] verwendet. Die bioinformatische Analyse wurde nicht selbstständig durchgeführt.

2.3.4 Charakterisierung des Haplotyps bei FSHD

Zur Haplotyp-Charakterisierung des FSHD-Lokus wird der SSLP proximal zu dem D4Z4 Repeat über eine PCR mit anschließendem Restriktionsverdau analysiert. Aus dem Ergebnis kann geschlossen werden, ob bei dem Patienten das häufigste permissive Allel 4qA161 vorliegt, oder nicht. Es kann jedoch nicht ermittelt werden, ob der Patient ein oder zwei 4qA161 Allele trägt, oder ob ein alternatives permissives Allel vorliegt [Tsumagari *et al.* 2010]. Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

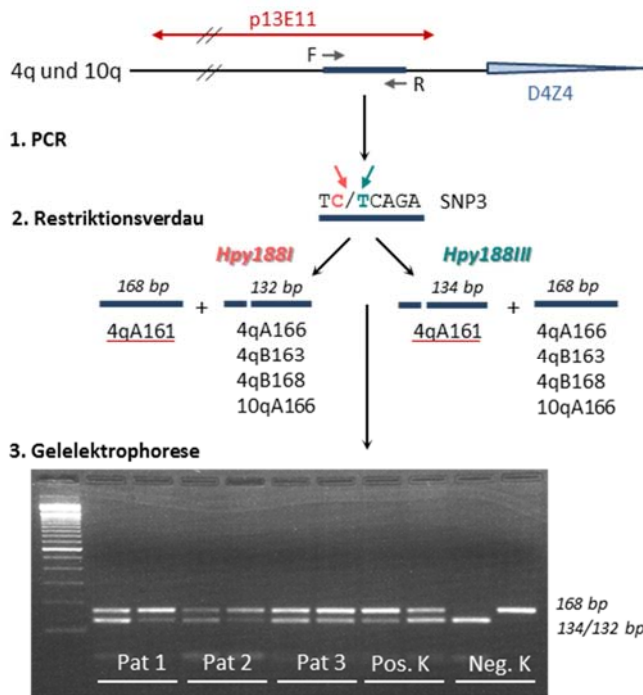


Abbildung 15: Bestimmung des FSHD-Haplotyps über die Analyse eines SNPs proximal zu dem D4Z4 Repeat. Durch den Verdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen kann zwischen den Haplotypen 4qA161 und nicht-4qA161 unterschieden werden.

Die Auswertung erfolgt über eine Gelelektrophorese, wobei jeweils der *Hpy188I* und *Hpy188III*-Verdau neben-einander aufgetragen sind. Die Patienten (Pat 1-3) zeigen, wie die Positivkontrolle (Pos. K), je zwei Banden, was das Vorliegen von mindestens einem Allel 4qA161 anzeigt. Die Negativkontrolle (Neg. K) zeigt jeweils nur die Bande, welche die Abwesenheit von 4qA161 anzeigt.

Es wird zunächst eine Standard PCR mit der Platinum Taq DNA Polymerase durchgeführt, wie unter 2.2.3 a beschrieben (Primersequenzen siehe Anlage 7.1).

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	
Denaturierung	95	20 s	45x
Annealing	59	20 s	
Elongation	72	20 s	
Finale Elongation	72	5 min	
Haltetemperatur	10	-	

In zwei getrennten Ansätzen werden je 10 µL PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Hpy188I* und *Hpy188III* in einem Reaktionsvolumen von 40 µL verdaut. Die Reaktionsbedingungen sind unter 2.2.2 b angegeben. Es wird eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Zur Konzentrierung der Proben wird eine ethanolische Fällung durchgeführt (2.2.1 d). Die erste Zentrifugation wird für 30 min, die zweite für 15 min durchgeführt. Das Pellet wird in 10 µL TE-Puffer gelöst.

Die Fragmente werden in einer linearen Gelelektrophorese aufgetrennt, dazu wird die gesamte Probe eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen finden sich unter 2.2.4 a.

2.3.5 Southern Blot

Die Southern Blot Hybridisierung stellt eine Methode zum Nachweis spezifischer Sequenzen in einem komplexen Gemisch dar. Dazu wird genomische DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten, die Fragmente anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert, wo sie für den Nachweis mit spezifischen markierten DNA-Sonden zur Verfügung stehen. [Southern 1975]

Der Southern Blot wird zum Nachweis großer Repeat-Regionen eingesetzt. Dazu werden Restriktionsenzyme gewählt, welche an beiden Enden des Repeats schneiden. Mit Hilfe einer Sonde, die komplementär zu einer spezifischen Sequenz innerhalb des Restriktionsfragmentes ist, aber außerhalb des Repeats liegt, kann das Repeat detektiert werden. Durch die Auftrennung in einer Gelelektrophorese kann an Hand eines Markers die Größe des Fragments bestimmt werden.

a. DM1, DM2 und FSHD – Repeatzahlbestimmung

Im Rahmen der Routinediagnostik wird die Bestimmung der Repeatzahl bei DM1 (AA 0200), DM2/PROMM (AA 0690) und FSHD1 (AA 0210) durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist unter 1.4.4 für DM und 1.5.4 für FSHD beschrieben.

b. FSHD – methylierungs-sensitiver Southern Blot

Zur Bestimmung der Methylierung des D4Z4 Repeats bei FSHD wird ein methylierungs-sensitiver Southern Blot durchgeführt [Lemmers *et al.* 2012b]. Die genomische DNA wird mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. *EcoRI* fragmentiert die genomische DNA und schneidet vor und nach dem FSHD-Lokus. *BglII* schneidet vor der Bindungsregion der Sonde p13E-11 und innerhalb jeder einzelnen D4Z4 Repeateinheit auf Chromosom 4q und 10q. Damit wird durch die Sonde lediglich das erste Repeat detektiert. Innerhalb dieses (und aller anderen) Repeats, liegt eine Schnittstelle für das methylierungs-sensitive Enzym *FseI*. Dieses schneidet unmethylierte, nicht jedoch methylierte DNA. Im Southern Blot werden Banden der Größe 4061 bp für unmethylierte und 3387 bp für methylierte Fragmente detektiert. Zur Ermittlung der Methylierung wird das Verhältnis der Bandenstärke in % bestimmt. Die relative Position der Restriktionsschnittstellen auf dem FSHD-Lokus ist in Abbildung 16 gezeigt.

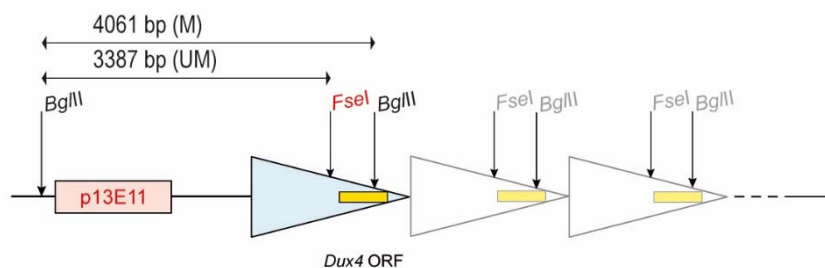


Abbildung 16: Relative Position der Restriktionsschnittstellen der Enzyme *BglII* und *FseI* auf dem FSHD-Lokus. Die *EcoRI* Schnittstellen liegen außerhalb des gezeigten Ausschnittes. Es ist die Bindestelle der Sonde (rot), die einzelnen D4Z4-Repeateinheiten (blau) und das DUX4-ORF (gelb) dargestellt. M:methyliert, UM: unmethyliert.

Protokoll

Restriktionsverdau

Nach photometrischer Messung der DNA-Konzentration (2.2.1 c) und Normalisierung werden 10 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 56 µL mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (2.2.2 b). Zur Kontrolle der Spaltung werden 5 µL auf ein Probegel aufgetragen (2.2.4 a). Im gleichen Puffersystem erfolgt der Doppelverdau mit *BglII* in einem Gesamtvolumen von 60 µL (2.2.2 b). Nach Kontrolle der Spaltung im Probegel wird zur Konzentrierung und Reinigung eine ethanolische Fällung durchgeführt (2.2.1 d). Das Pellet wird in 48 µL A.dest aufgenommen. In einem Reaktionsvolumen von 60 µL wird eine Spaltung mit dem methylierungssensitiven Enzym *FseI* durchgeführt (2.2.2 b). Die gesamte Spaltung wird auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.4 a), als Marker werden 0,5 µL des 1 kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*) verwendet. Die Auftrennung wird anschließend dokumentiert.

Semi-dry Kapillar Blot

Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden vor dem Southern Blot zunächst 8-10 min depuriniert (0,25 M HCl) und 2x 10 min denaturiert (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). In einem semi-dry Kapillar Blot werden die so vorbereiteten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen (Amersham Hybond™-XL Nylonmembran 0,45 µm; *Amersham, GE Healthcare*). Der Transfer geschieht mit 500 mL 0,4 M NaOH über Chromatographiepapier und Zellstoff in 12-24 h. Nach dem Blotten wird die Membran 2x 10 min mit 2x SSC-Puffer gewaschen. (vgl. AA 0210)

Hybridisierung und Autoradiographie

Die Membran wird zunächst für mind. 60 min bei 64-68 °C mit Churchpuffer (7 % SDS, 0,5 M NaH₂PO₄, 1 mM EDTA) vorhybridisiert. Das Labeling der Sonde p13E-11 (FSHD DNA probe, 60 ng; *AJ Roboscreen, Analytik Jena, Jena, Deutschland*) mit dem radioaktiven Nukleotid α³²P-dCTP wird mit dem *Rediprime II DNA Labeling System Kit* (2.2.2 c) erreicht. Die Hybridisierung der Membran erfolgt für ca. 20 h bei 64-68 °C in Hybridisierungspuffer (6x SSPE, 1 % SDS, 5 % Formamid). Anschließend wird die Membran 3x 10 min mit Waschpuffer (0,1 % SDS, 2x /0,5x /0,1x SSC) gewaschen. (vgl. AA 0210)

Die Detektion der Banden geschieht über Autoradiographie eines Phosphor Screens und Detektion der Banden mit dem Phosphorimager Typhoon 9200 (*GE Healthcare, Fairfield, CT, USA*). Die Methylierung wird mittels der Software ImageQuant (*GE Healthcare*) bestimmt, indem die Intensität der beiden Banden zueinander in Korrelation gesetzt und in % berechnet wird.

2.3.6 Untersuchung der Methylierung des D4Z4-Lokus

Die FSHD ist mit einer Reduktion der Methylierung des D4Z4-Lokus assoziiert. Diese soll in einem Assay basierend auf der Pyrosequenzierung Bisulfit-konvertierter DNA nachgewiesen werden. Hartweck *et al.* (2013) stellen eine Region extremer Demethylierung (DR1) innerhalb des D4Z4-

Repeats vor, welche als Zielregion verwendet werden soll. Dabei werden unspezifisch alle D4Z4-Repeateinheiten auf allen vier FSHD-Allelen gleichzeitig analysiert.

Als Zielregion werden neun CpGs innerhalb der DR1-Region ausgewählt. Die Region ist in Abbildung 17 dargestellt. Das Assay Design mit der PyroMark Assay Design 2.0 Software (*Qiagen*) wurde nicht selbstständig durchgeführt.

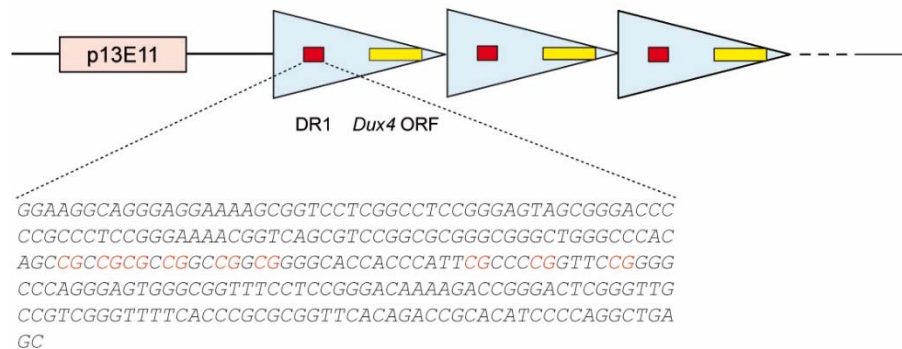


Abbildung 17: Schematische Darstellung des FSHD-Lokus mit der relativen Position der DR1 Region (rot). Diese enthält 18 CpGs, von denen neun in dem verwendeten Assay zuverlässig analysiert werden können (in rot dargestellt). Es sind die Bindestelle der Southern Blot Sonde (rosa), die einzelnen D4Z4-Einheiten (blau) und das DUX4 ORF (gelb) dargestellt.

Nach Bisulfit-Konvertierung der DNA (2.2.2 a) wird eine PCR nach Standardbedingungen mit der Platinum Taq Polymerase, einer Annealing Temperatur von 59 °C und 35 Zyklen durchgeführt (2.2.3 b) (Primersequenzen siehe Anlage 7.1). Es wird ein Produkt der Länge 172 bp erhalten. Der Erfolg der PCR wird in einer Gelelektrophorese überprüft (2.2.4 a). Die PCR-Produkte werden anschließend in die Pyrosequenzierung (2.2.5 b) eingesetzt, welche ausgehend von einem Biotin-gelabelten Primer stattfindet. Die Ergebnisse werden in Form von Pyrogrammen in der Software PyroQ-CpG (*Qiagen*) wiedergegeben, welche einen Wert für die Methylierung eines jeden CpGs angeben. Die statistische Auswertung der Methylierungsdaten wird mit der Software SPSS Statistics (*IBM*, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. [Larsen *et al.* 2015]

2.3.7 Untersuchung der X-Inaktivierung

Zur Dosiskompensation der Gene auf dem X-Chromosom im Vergleich zu Männern, ist bei Frauen in jeder Zelle ein X-Chromosom durch epigenetische Mechanismen inaktiviert. Diese Inaktivierung erfolgt zufällig, sodass im Normalfall beide X-Chromosomen in einem Verhältnis von 50:50 aktiv sind. Es kommt jedoch vor, dass die Inaktivierung verschoben ist, sodass eines der beiden X-Chromosomen bevorzugt aktiv und das andere inaktiv ist [Speicher 2011].

Die X-Inaktivierung kann über die Untersuchung der Methylierung des *AR*-Gens (Androgenrezeptor, MIM *313700) analysiert werden. Durch den Verdau der genomischen DNA mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym können methylierte und unmethylierte Allele

unterschieden werden. Das *AR*-Gen enthält im Exon 1 einen polymorphen Mikrosatelliten, über den die beiden Allele in einer Fragmentanalyse unterschieden werden können. Im Fall einer Homozygotie des Locus, was für ca. 8 % der Frauen zutrifft, ist jedoch keine Aussage möglich [Allen *et al.* 1992, Amos-Landgraf *et al.* 2006].

Für die Untersuchung der X-Inaktivierung (AA 1140) wird die DNA-Konzentration mit dem Qubit BR Kit (2.2.1 c) bestimmt und auf 10 ng/μL normalisiert. Als Kontrollen werden eine Positivkontrolle (mit verschobener X-Inaktivierung), eine männliche und drei weibliche Negativkontrollen (mit normaler X-Inaktivierung) mitgeführt. Von jeder Probe werden zwei parallele Ansätze vorbereitet, von denen eine gespalten wird und die andere nicht. Die DNA wird in einem Reaktionsansatz von 30 μL mit dem Restriktionsenzym *HpaII* verdaut (2.2.2 b). Dabei schneidet das Enzym innerhalb des *AR*-Gens unmethylierte DNA. Anschließend erfolgt eine ethanolische Fällung (2.2.1 d). Dazu wird jedem Ansatz 0,5 μL Glykogen zugegeben, um die vollständige Ausfällung der DNA zu gewährleisten. Das Pellet wird in 10 μL TE-Puffer aufgenommen und 1 h gelöst. Mit den vorbereiteten Proben wird eine PCR durchgeführt. Es wird nur dann ein Produkt gebildet, wenn die DNA durch Methylierung vor dem Verdau geschützt war.

Reaktionsansatz:

25 μL	Puffer A
0,2 μL	Platinum Taq DNA Polymerase
1 μL	F-Primer (AR-FAM)
1 μL	R-Primer (AR)
0,3 μL je 8 Proben	MgCl ₂
<hr/>	
27,2 μL	
+ 2,5 μL	DNA (gespalten/ungespalten)

PCR-Bedingungen:

Schritt	Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	230 s	
Annealing	65	40 s	28x
Elongation	72	60 s	
Finale Elongation	72	20 min	
Haltetemperatur	10	-	

Mit den amplifizierten Proben wird eine Fragmentanalyse durchgeführt (2.2.4 b).

Die Auswertung erfolgt mit der Software GeneMapper (*Applied Biosystems*), indem die Fläche unter den Peaks bestimmt wird.

Zum Ausgleich PCR-bedingter Unterschiede in der Amplifikation der Allele wird zunächst ein Korrekturfaktor (KF) für jeden Wert anhand der unverdauten Proben berechnet (siehe Formel), da angenommen wird, dass beide Allele gleich stark exprimiert werden. Die Benennung von Allel 1 und

Allel2 erfolgt nach der Größe der Amplifikationsprodukte in der Fragmentanalyse und ist damit willkürlich (kleineres Allel : größeres Allel).

$$KF1 \text{ bzw } 2 = \frac{2 \cdot \text{Allel1 bzw } 2}{\text{Allel1} + \text{Allel2}}$$

Die Werte der verdauten Proben werden mit dem Korrekturfaktor multipliziert. Das Expressionsverhältnis der beiden Allele wird berechnet, indem die Peakflächen der beiden korrigierten verdauten Allele in Relation gesetzt werden, wie in der untenstehenden Formel gezeigt.

$$\text{Allel 1} : \text{Allel 2} = \frac{\text{Allel 1} \cdot 100}{\text{Allel 1} + \text{Allel 2}} : \frac{\text{Allel 2} \cdot 100}{\text{Allel 1} + \text{Allel 2}}$$

Das Ergebnis wird in dem Verhältnis der beiden Allele zueinander ausgedrückt. Für die weitere Berechnung wird jeweils der Wert von Allel1 verwendet. Die normale X-Inaktivierung ist in der Theorie 50:50 und streut mit einer Gauß'schen Verteilung um diesen Wert [Amos-Landgraf *et al.* 2006]. Die statistische Auswertung erfolgt mit der Software SPSS Statistics (IBM) und R Studio (R Version 3.0.2) [R Core Team 2015] unter Verwendung des ‚Beeswarm‘ Package [Eklund 2015].

2.3.8 Molecular Combing DM-Test

Das Molecular Combing ist eine Einzel-Molekül Analysemethode, bei der eine große Anzahl von DNA-Molekülen linear mit einer konstanten Streckung auf einer festen Oberfläche aufgebracht wird, wo diese für den Nachweis mit fluoreszenzmarkierten Sonden zur Verfügung stehen. Die Methode ermöglicht es in einem der *in situ* Hybridisierung ähnlichen Verfahren gesamte Genome zu visualisieren und dabei Genomumlagerungen zu detektieren. Die erzielte Auflösung des Molecular Combing reicht von wenigen Kilobasen bis zu mehreren hundert kb [Michalet *et al.* 1997]. Damit bildet es eine Brücke zwischen der Molekulargenetik und der Zytogenetik. Die Methode wurde erstmals von Bensimon *et al.* (1994) beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Diplomarbeit von Mirjam Larsen (2011).

Die Durchführung des Molecular Combing DM-Test lässt sich in die vier folgenden Arbeitsschritte gliedern. Die Arbeitsanweisung findet sich in der jeweiligen SOP von *GenomicVision*:

1. Isolierung von Leukozyten aus Vollblut und Einbettung der DNA in Agaroseblöckchen
SOP_001 Preparation of DNA plug
2. Streckung der DNA-Moleküle auf einer Silica-beschichteten Glasoberfläche
SOP_002 Preparation of DNA solution from DNA plug for molecular combing
SOP_003 Use of the Molecular Combing System (MCS)
SOP_020 Staining of combed DNA for Combing quality check
3. Herstellung und Labeling der DNA-Sonden

SOP_005 Probes Labelling by Random Priming

4. Hybridisierung, Antikörper-Entwicklung und Detektion der Sonden

SOP_006 Hybridization and detection of coverslips

Die Punkte 1 und 2 umfassen die Vorbereitung des Untersuchungsmaterials für die eigentliche Analyse. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in der Diplomarbeit von Mirjam Larsen (2011). Diese Arbeitsschritte wurden für die vorliegende Arbeit nicht selbstständig durchgeführt. Es wurden von *GenomicVision* vorbereitete DNA-Proben verwendet. Ein Beispiel für die Anordnung der DNA auf Silika-beschichteten Deckgläschen ist in Abbildung 18 gezeigt.

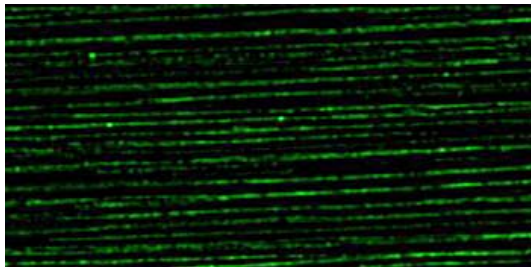


Abbildung 18: *Gekämmte DNA im fluoreszenz-mikroskopischen Bild.* Die hochmolekulare DNA-Fäden liegen in einer parallelen Anordnung auf einer festen Oberfläche vor. Durch eine gleichmäßige Streckung von $1 \mu\text{m} = 2 \text{ kb}$ können Abstände direkt gemessen werden [Michalet *et al.* 1997]. Färbung der DNA mit YOYO-1 Iodide (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA).

a. *In silico* Sonden Design

Auf der Basis des Molecular Combing wurde ein Assay entwickelt, der in einem Schritt die Loci von DM1 und DM2 visualisiert und dabei auch die Repeatsequenzen selbst darstellt. Dazu wurde ein genomischer Barcode entwickelt, anhand dessen die Loci detektiert und unterschieden werden können.

Die Zielregion für das Sonden-Design umfasst einen Bereich von ca. 100 kb um den Ziel-Lokus herum. Für DM1 ist dies die 3'-UTR Region des *DMPK*-Gens (19q13.32), für DM2 ist es das Intron 1 des *CNBP*-Gens (3q21.3). Der Ziel-Lokus wird mit der Software Gepard (GEnome PAir - Rapid Dotter) Version: 1.30, [Krumisiek *et al.* 2007]) analysiert, welche eine *in silico* Hybridisierung der Zielsequenzen gegeneinander vornimmt. Das Ergebnis wird in Form eines Dot-Plots dargestellt, in dem Kreuzhybridisierungen angezeigt werden. In Bereichen mit starker Kreuzhybridisierung sollte die Platzierung von Sonden vermieden werden.

Zur Identifikation und Unterscheidung der beiden Loci werden Barcodes mit zwei unterschiedlichen Mustern entworfen. Die das Repeat flankierenden Sonden werden in rot dargestellt, das zentrale Repeat in grün. Die Barcodes in der Sequenzumgebung des jeweiligen Zielgens sind in Abbildung 19 dargestellt.



Abbildung 19: Genomic Morse Codes für (A) DM1 und (B) DM2. Dargestellt ist die Position der Sonden in der Sequenzumgebung des *DMPK*- bzw. *CNBP*-Gens. Rot: flankierende Sonden, grün: $(CTG)_n$ - bzw. $(CCTG)_n$ -Repeat. (Graphik aus *UCSC Genome Browser* [Kent et al. 2002])

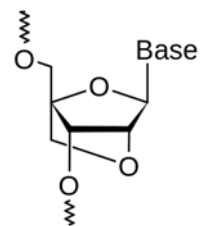
Die Visualisierung des Repeats wird durch die Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden erzielt, die eine bestimmte Anzahl von Repeats enthalten. Zur spezifischen und starken Bindung der Sonden an die Zielregion werden LNA-Sonden (*locked nucleic acid*) verwendet.

b. Herstellung der Sonden

Die Sonden, welche direkt an das zentrale Repeat binden, wurden als Oligo-Sonden designet, aufgebaut aus der entsprechenden Repeatsequenz. Für DM1 wurde eine $(CAG)_7$ -Sonde verwendet, für DM2 eine $(CCTG)_5$ -Sonde. Um eine höhere Spezifität der Sonden-Hybridisierung zu der Zielsequenz zu erreichen, wurden modifizierte Nukleotide verwendet. Das sogenannte LNA-Nukleotid enthält im Vergleich zu DNA eine Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff der Ribose. Diese Brücke hält die Ribose in der 3'-endo Konformation. Dadurch ist die Struktur des LNA-Nukleotids weniger flexibel, was dazu führt, dass LNA-Sonden bei der Hybridisierung zu Doppelhelix-Strukturen eine höhere Schmelztemperatur aufzeigen, als DNA-Sonden. Die Repeat-Sonden werden als Custom Design von der Firma Exiqon (Vedbaek, Dänemark) bezogen. Zur Detektion der Repeatsonde ist diese bereits mit FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Sequenz der Oligo-Sonden für DM1 und DM2. Großbuchstaben Markieren LNA-Nukleotide. Rechts ist die Struktur eines LNA Nukleotids dargestellt.

	Name	Sequence
DM1	$(CAG)_7$	FAM-5' gcAgCagcAgCagCagcAgca-3'
DM2	$(CCTG)_5$	FAM-5' -cCTgccTgcCTgccTgcCT-3'



Die das Repeat flankierenden DNA-Sonden werden aus ca. 5 kb langen DNA-Fragmenten zusammengesetzt. Jede einzelne Sonde wird durch Long Range PCR (2.2.3 c) erzeugt, wobei verschiedene PCR-Systeme und Template-DNAs verwendet wurden. Eine Aufstellung der einzelnen Sonden-Fragmente mit Template, PCR-System und Synthesebedingungen findet sich in den Tabellen 8 und 9.

Tabelle 8: PCR-Bedingungen für DM1-Sonden. Angegeben sind die Template DNA (genomische DNA oder BAC*-DNA), die Größe des PCR-Produkts, verwendete Polymerase, Annealing Temp. und Additive, die relative Ausbeute, das Ergebnis der Sanger Sequenzierung und die Gesamtlänge der Sonde.

Sonde	Template	Produkt [bp]	Polymerase	Annealing [°C]	Additiv	Ausbeute PCR-Produkt	Seq.	Gesamtlänge [bp]
DM1_1a	genom. DNA	5071	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	++	ok	15314
DM1_1b	genom. DNA	5229	Expand 20 kb Plus	58 °C	-	++	ok	
DM1_1c	genom. DNA	5409	Expand 20 kb Plus	58 °C	DMSO	++	ok	
DM1_2	genom. DNA	5288	Expand 20 kb Plus	58 °C	Betain	+++	ok	5288
DM1_3	CTD-2309N9	5514	TaKaRa LA Taq	55 °C	-	++	ok	5513
DM1_4	CTD-2309N9	5289	Qiagen Long Range	56 °C	-	+++	ok	5289
DM1_5a	genom. DNA	5421	Expand 20 kb Plus	58 °C	Betain	++	ok	19138
DM1_5b	RP11-1005D17	5714	Expand LR Roche	59 °C	DMSO	++	ok	
DM1_5c	RP11-1005D17	5460	Expand LR Roche	57 °C	DMSO	+++	ok	
DM1_5d	RP11-1005D17	2642	Expand Long Range	57 °C	DMSO	++	-	
DM1_6a	genom. DNA	5468	Expand 20 kb Plus	58 °C	-	++	ok	21963
DM1_6b	RP11-1005D17	5226	TaKaRa LA Taq	58 °C	-	++	ok	
DM1_6c	genom. DNA	5310	Expand 20 kb Plus	58 °C	DMSO	+++	ok	
DM1_6d	genom. DNA	5200	Expand 20 kb Plus	58 °C	DMSO	++	ok	

* BAC: künstliches Bakterienchromosom

Tabelle 9: PCR-Bedingungen für DM2-Sonden. Angegeben sind die Template DNA (genomische DNA oder BAC*-DNA), die Größe des PCR-Produkts, verwendete Polymerase, Annealing Temp. und Additive, die relative Ausbeute, das Ergebnis der Sanger Sequenzierung und die Gesamtlänge der Sonde. Sonden ohne erfolgreiche PCR sind in grau dargestellt.

Sonde	Template	Produkt [bp]	Polymerase	Annealing [°C]	Additiv	Ausbeute PCR-Produkt	Seq.	Gesamtlänge [bp]
DM2_1a	RP11 157M15	5130	Expand LR Roche	57 °C	DMSO	+++	ok	9934
DM2_1b	RP11 157M15	5050	Expand LR Roche	55 °C	DMSO	+++	ok	
DM2_2a	RP11 157M15	5500	Expand LR Roche	54 °C	DMSO	++	ok	11222
DM2_2b	RP11 157M15	5389	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	+	ok	
DM2_3a	RP11 157M15	5217	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	++	ok	11119
DM2_3b	RP11 157M15	5285	Qiagen Long Range	56 °C	-	+++		
DM2_4a	RP11 157M17							
DM2_4b	RP11 157M15	2548	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	+++	ok	17654
DM2_4c	RP11 157M15	2666	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	+	ok	
DM2_4d	genom. DNA	5396	Expand LR Roche	55 °C	DMSO	+++	-	
DM2_4e	genom. DNA	5408	Expand LR Roche	55 °C	DMSO	++	ok	
DM2_5a	genom. DNA	5314	Qiagen Long Range	57 °C	-	+++	ok	19262
DM2_5b	genom. DNA	5238	Expand LR Roche	54 °C	DMSO	+++	ok	
DM2_5c	genom. DNA	4975	Expand LR Roche	55 °C	DMSO	+++	ok	
DM2_5d	genom. DNA	2383	Expand LR Roche	56 °C	DMSO	+++	ok	
DM2_5e	genom. DNA	2537						

* BAC: künstliches Bakterienchromosom

Die so synthetisierten Sonden werden in einer Gelextraktion (2.2.1 d) aufgereinigt, um unspezifische Nebenprodukte zu entfernen.

Nach einer Konzentrationsmessung der Sonden-Fragmente mit dem Qubit BR Kit (2.2.1 c) wird ein Sonden-Pool hergestellt, der alle Einzelfragmente eines Barcodes in einem gleichmäßigen Verhältnis

von DNA-Menge (ng) zu der abgedeckten Sequenzlänge (kb) enthält. Es werden ca. 20 µL Sonden-Pool in die Labeling-Reaktion mit dem BioPrime DNA Labeling System Kit (2.2.2 c) eingesetzt. Anschließend erfolgt eine Reinigung der gelabelten Sonden-DNA mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit 2.2.1 d).

Zur Hybridisierung einer gekämmten DNA-Probe werden 3-5 ng gelabelte Sonden-DNA pro 1 kb Barcode-Sequenz benötigt. Die Konzentration der gelabelten Sonde wird mit dem Qubit BR-Kit (2.2.1 c) bestimmt und die erforderliche Menge in die Hybridisierungs-Lösung eingesetzt.

In der Hybridisierung wird zu der gelabelten Sonde, welche an den Ziel-Lokus bindet, zusätzlich *Human Cot-1 DNA* (10 µg, *Invitrogen*) und *Herrings Sperm DNA* (10 µg, *Invitrogen*) zur Abdeckung von human-spezifischen repetitiven Sequenzen eingesetzt.

Der Ansatz wird in einer ethanolschen Fällung präzipitiert (2.2.1 d). Dazu werden die Proben zunächst für 1 h bei -70 °C inkubiert, die erste Zentrifugation wird bei 4 °C und 15000 g für 30 min durchgeführt, die zweite für 10 min. Die Proben werden nach dem Waschen mit gekühltem 70 %igem Ethanol für 20 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend werden die Proben in einem Hybridisierungspuffer (2x SSC, 5 % Sarcosyl, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 29,5 % Blocking Aid, *Invitrogen*) aufgenommen.

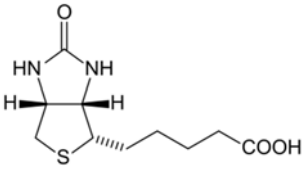
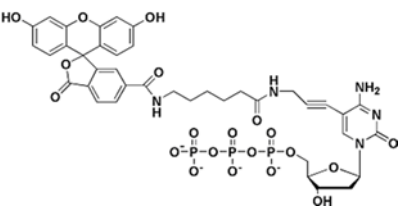
Reaktionsansatz:

X µL	RP-Produkt (3-5 ng/kb)
10 µL	Human Cot-1 DNA (1 mg/mL)
1 µL	Herring Sperm DNA (10 mg/mL)
ad 50 µL	A.dest
5 µL	NaAc (3 M)
150 µL	Ethanol (100 %, gekühlt)

c. Hybridisierung, Antikörper-Entwicklung und Detektion der Sonden

Die Hybridisierung der vorbereiteten Sonden wird wie in der *SOP_006 Hybridization and detection of coverslips* beschrieben durchgeführt. Die Sonden werden auf DNA Proben hybridisiert, welche von *GenomicVision* auf Deckgläschen gekämmt vorliegen. Die Hybridisierung wird in dem Hybridisierungsgerät von Dako (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Antikörper-Entwicklung werden die in Tabelle 10 aufgeführten Antikörper verwendet. Durch die Verwendung mehrerer Antikörper-Layer wird das Fluoreszenzsignal verstärkt.

Tabelle 10: Fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Detektion der DM-Sonden. Für beide Farben ist jeweils das in der Sonde verwendete Nukleotid mit der Struktur des Haptens und die daran bindenden Antikörper gezeigt. Außerdem ist die Konzentration der Arbeitslösung angegeben.

	rot	grün
Nukleotid	Biotin-14-dCTP	6-FAM-11-dCTP
Hapten		
1. Antikörper	streptavidin, Alexa Fluor® 594 conjugate, 1 mg/mL (<i>Invitrogen</i>)	Anti-Fluorescein/Oregon Green®, Rabbit IgG Fraction, 2 mg/mL (<i>Invitrogen</i>)
2. Antikörper	Antibody Goat anti-SAV, biotinylated 0,5 mg/mL (<i>Vector Laboratories</i> , Burlingame, CA, USA)	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG, 2 mg/mL (<i>Invitrogen</i>)
3. Antikörper	streptavidin, Alexa Fluor® 594 conjugate, 1 mg/mL (<i>Invitrogen</i>)	-

Die Hybridisierung wird dokumentiert, indem die Oberfläche des Deckgläschens mit dem automatisierten Fluoreszenzmikroskop ImageXpress^{MICRO} (*Molecular Devices*, Sunnyvale CA, USA) in einer 40fachen Vergrößerung gescannt wird. Dabei werden zwei Filter verwendet - FITC und Cy3, deren Bilder zu einer Ansicht verrechnet werden. Mit der Software GV Lab (*GenomicVision*) kann die gesamte Oberfläche nach Fluoreszenzsignalen untersucht werden. Signale können in der Software gespeichert und vermessen werden. Die Messung der Repeatlänge wird unter Berücksichtigung des Streckungsfaktors der DNA direkt in kb angegeben.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit MS Excel (*Microsoft*, Redmond, WA, USA) und SPSS (*IBM*, Ehningen, Deutschland). Die Normalverteilung der wird über den Kolmogorow-Smirnow-Test bestimmt, welcher testet, ob sich die Daten von einer normalverteilten Datenmenge unterscheiden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Projekt Myotone Dystrophie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die molekulargenetische Analyse der Myotonen Dystrophie unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten bearbeitet. Im ersten Teilprojekt sollte eine Methode zum Nachweis beider bekannter Typen der DM in einem Assay erarbeitet werden. Das zweite Teilprojekt beschäftigt sich mit der Identifikation einer alternativen Ursache für die Erkrankung der DM.

3.1.1 Molecular Combing DM Test

In einem Test auf der Basis der Methode Molecular Combing sollen die beiden Repeat-Erkrankungen DM1 und DM2 in einem Ansatz nachgewiesen werden. Dies wird durch die differenzierte Darstellung der genetischen Loci im fluoreszenzmikroskopischen Bild und die Messung der Repeatlänge erreicht.

3.1.1.1 Etablierung des Tests

Zur Etablierung des Molecular Combing DM-Tests wurden die gelabelten DNA-Sonden auf DNA-Proben von gesunden und erkrankten Kontrollpatienten hybridisiert.

Bei der Hybridisierung wurde eine gute Qualität der Fluoreszenzsignale festgestellt, mit einer ausreichenden Abhebung der Signale vom Hintergrund. Die Barcodes für beide Loci konnten zuverlässig detektiert werden. Ein Beispiel für einen typischen Ausschnitt des fluoreszenzmikroskopischen Bildes ist in Abbildung 20 dargestellt. Eine Kreuzhybridisierung oder Hybridisierung der Sonden mit anderen Loci wurde nicht festgestellt. In vielen Fällen, wie auch in der unten stehenden Abbildung erkennbar, werden die Sonden nicht vollständig kontinuierlich dargestellt, sondern es fallen kleine Lücken innerhalb einer Sonde auf. Der Barcode ist dennoch gut erkennbar.

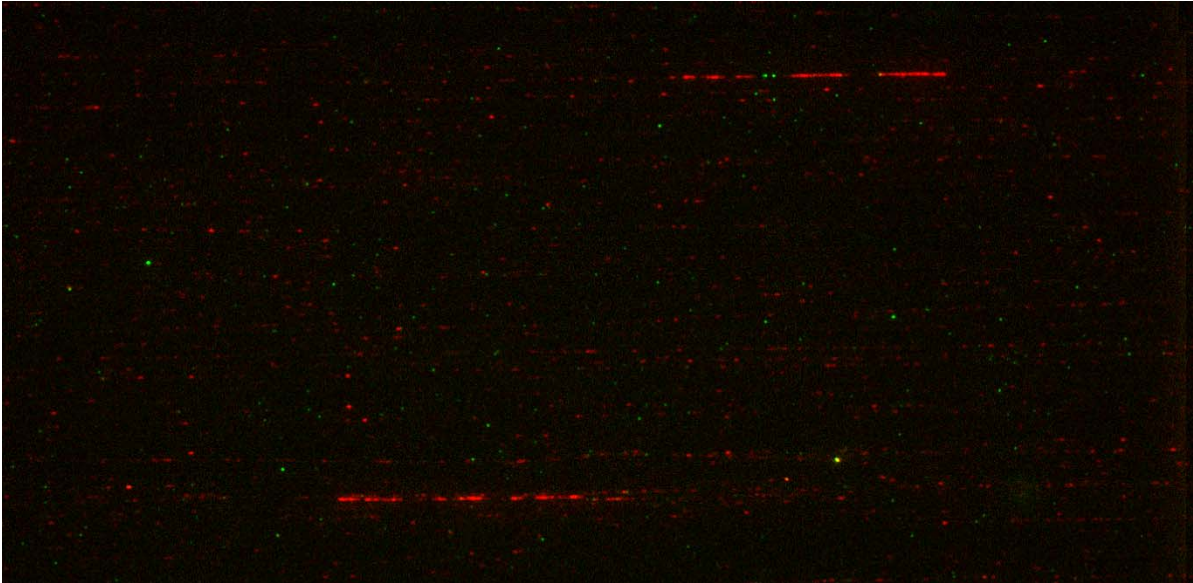


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer Molecular Combing Hybridisierung mit DM2-Sonden. Zu sehen sind zwei rote DM2-Signale - oben rechts ein Allel mit einer Repeat-Expansion (grünes Signal), unten links ein Normalallel, vor dem typischen Hintergrund. Dieser erinnert an einen Sternenhimmel aus unspezifisch gebundenen roten und grünen Sonden. Die parallel verlaufenden DNA-Fasern lassen sich gut nachverfolgen.

Es wurde überprüft, ob die *in silico* entworfenen Barcodes im fluoreszenzmikroskopischen Bild korrekt dargestellt werden und ob die Codes für DM1 und DM2 unterschieden werden können. Für DM2 konnten nicht alle geplanten Sonden hergestellt werden. Der Barcode ist dennoch eindeutig identifizierbar. Je ein Beispiel für ein Normalallel ohne Repeatexpansion und eine schematische Darstellung der verwendeten Sonden sind in den Abbildungen 21 und 22 gezeigt. Es ist gut erkennbar, dass alle Einzelsonden des Barcodes abgebildet werden.

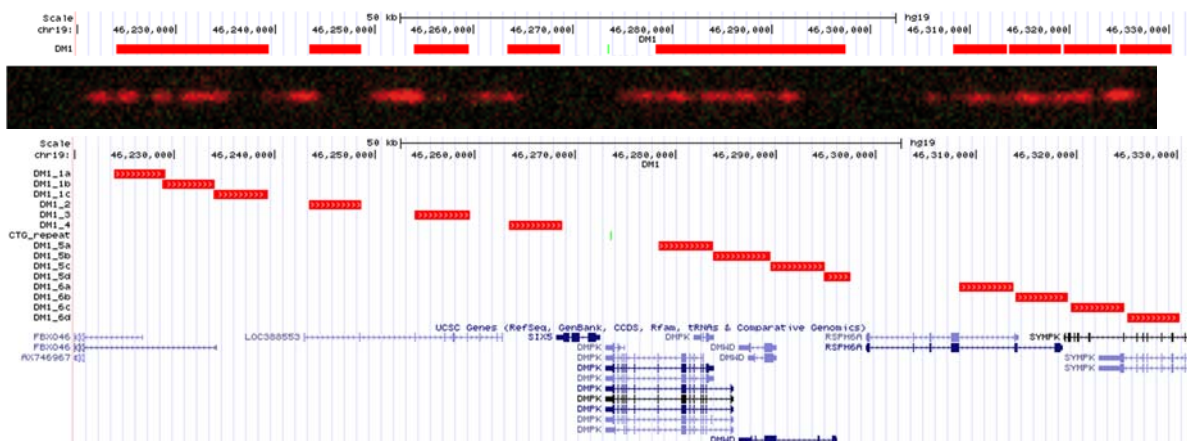


Abbildung 21: Barcode für DM1. Dargestellt sind der schematische Barcode (unten) und ein Beispiel für das fluoreszenzmikroskopische Bild eines Normalallels sowie die Einzelsonden in der Sequenzumgebung des *DMPK*-Gens (oben). Rot: flankierende Sonden, grün: (CTG)_n-Repeat. (Graphik aus UCSC Genome Browser [Kent et al. 2002])

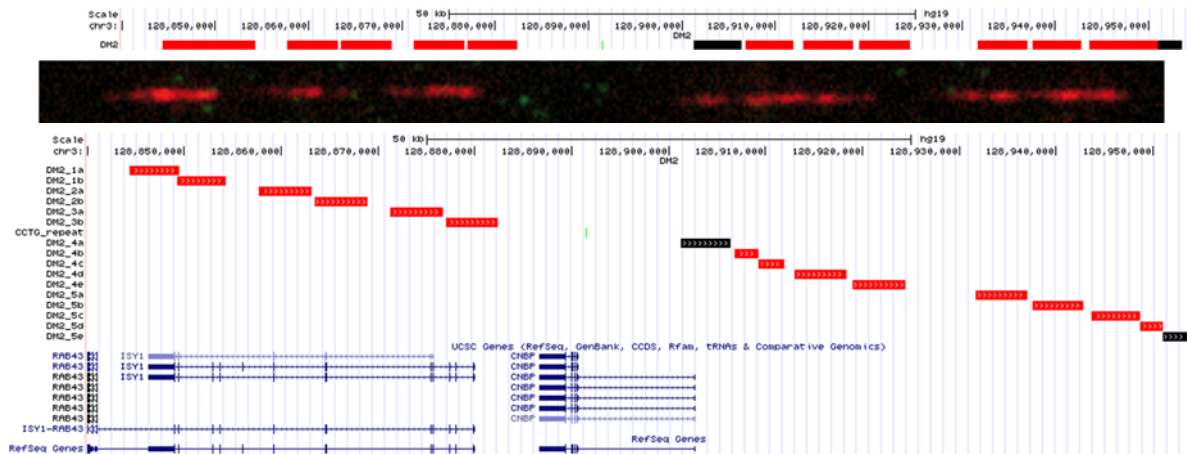


Abbildung 22: Barcode für DM2. Dargestellt sind der schematische Barcode (unten) und ein Beispiel für das fluoreszenzmikroskopische Bild eines Normalallels sowie die Einzelsonden in der Sequenzumgebung des *CNBP*-Gens (oben). Rot: flankierende Sonden, grün: (CCTG)_n-Repeat, schwarz: Sonden, für die kein Produkt erhalten wurde. (Graphik aus *UCSC Genome Browser* [Kent et al. 2002])

3.1.1.2 Validierung des Tests

Der Molecular Combing DM-Test sollte dahingehend validiert werden, ob die designten Sonden die erwartete Länge in kb zuverlässig darstellen können. Dazu wurde von einer Anzahl von jeweils 20 Signalen die Größe einer jeden Sonde gemessen und statistisch mit dem Erwartungswert – der Länge der synthetisierten Sonde, verglichen. Auf diese Weise konnte die Messgenauigkeit des Tests bestimmt werden. Die ermittelten Werte sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt. Für DM1 ergibt sich eine mittlere Abweichung der Sondenlänge zum Erwartungswert von $0,8 \pm 0,4$ kb, für DM2 liegt die Abweichung bei $0,7 \pm 0,5$ kb.

Tabelle 11: Bestimmung der Genauigkeit für die Messung der Sondenlänge bei DM1.

	DM1_1	DM1_2	DM1_3	DM1_4	DM1_5*	DM1_6
Erwartungswert (EW)	15,3	5,3	5,5	5,3	19,1	22,0
Mittelwert	16,2	5,8	6,3	5,6	18,5	23,5
Standardabweichung	1,1	0,9	0,9	0,7	1,0	1,4
Abweichung EW/Mittelwert	0,9	0,5	0,8	0,3	0,7	1,5

*Hybridisierung ohne Sonde DM1_5d

Tabelle 12: Bestimmung der Genauigkeit für die Messung der Sondenlänge bei DM2.

	DM2_1	DM2_2	DM2_3	DM2_4	DM2_5
Erwartungswert (EW)	9,9	11,2	11,1	17,1	19,3
Mittelwert	10,3	10,2	10,1	18,3	19,2
Standardabweichung	1,1	1,1	1,4	1,3	2,2
Abweichung EW/Mittelwert	0,3	1,0	1,0	1,2	0,1

3.1.1.3 Ergebnisse des Tests und Quantifizierung des expandierten Allels

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von vier Patienten mit dem Molecular Combing DM-Test analysiert. Es wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Analysen durchgeführt.

Tabelle 13: Analysen mit dem Molecular Combing DM-Test. Angegeben ist die Anzahl der Signale je Probe.

Probe	DM1 Sonde	DM2 Sonde	DM1+DM2 Sonden
Kontrolle	44 Signale	28 Signale	-
DM1	100 Signale	-	154 Signale
DM2-a	-	100 Signale	225 Signale
DM2-b	-	96 Signale	-

Es wurden für alle oben angegebenen Analysen Ergebnisse in Form von Fluoreszenzsignalen erhalten. Nach Ausschluss von unvollständigen Signalen konnten die in Tabelle 13 genannten Signale eindeutig dem DM1 bzw. DM2 Locus zugeordnet werden.

Zur Bestimmung der Repeatlänge bei DM1- und DM2-Patienten wurde jeweils eine Anzahl von ca. 100 Signalen pro Probe ausgewertet. Normalallele zeigen dabei kein Repeatsignal. Für expandierte Allele wurde die Länge des in grün dargestellten Repeatsignals bestimmt. Beispiele für die gefundenen Signale eines DM1 und eines DM2 Patienten sind in den Abbildungen 23 und 24 gezeigt.

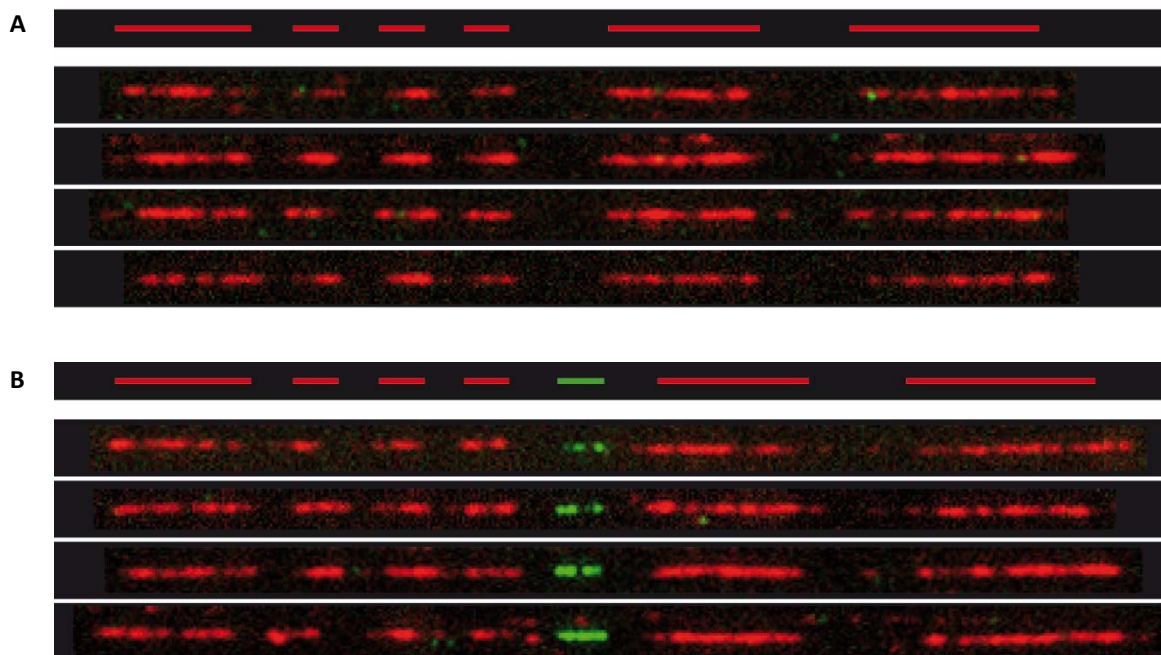


Abbildung 23: Fluoreszenzsignale des Barcodes eines DM1 Patienten. Gezeigt sind jeweils eine schematische Referenz des Barcodes und vier Beispiele. (A) Normalallel, ohne grünes Repeatsignal. (B) Expandiertes Allel mit Repeatsignal von gleichförmiger Länge.

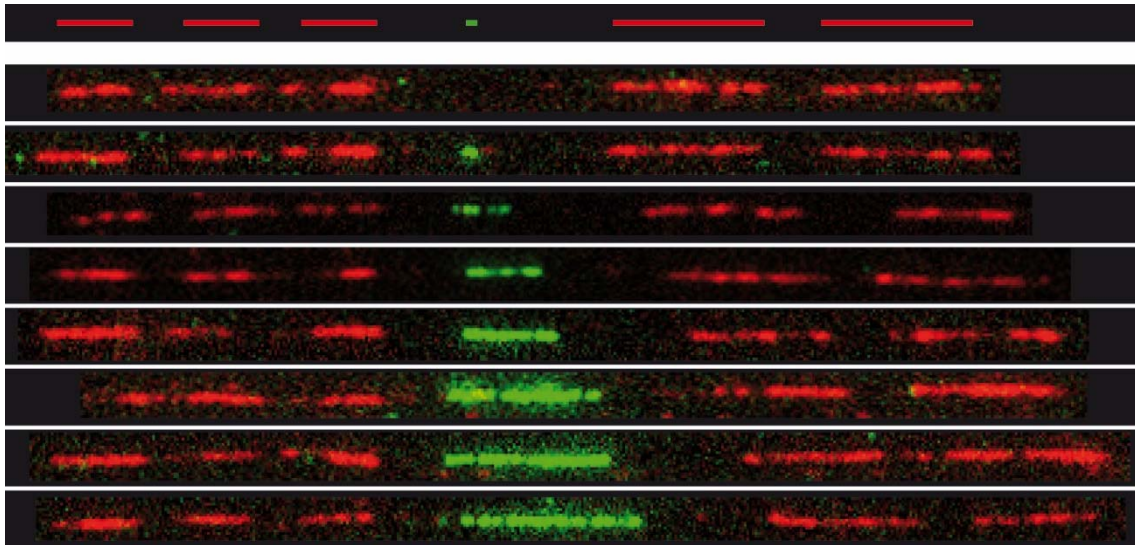


Abbildung 24: Fluoreszenzsignale des Barcodes eines DM2 Patienten. Gezeigt sind eine schematische Referenz und darunter acht Signale mit unterschiedlicher Repeatlänge.

Da der Streckungsfaktor der DNA beim Molecular Combing bekannt ist ($1 \mu\text{m} = 2 \text{ kb}$), kann die Länge jedes Repeats in μm gemessen und in kb umgerechnet werden. Die Verteilung der Repeatlängen über alle analysierten Moleküle eines Patienten wird in Form eines Histogramms dargestellt (Abbildung 25 bis 27). Bei dem untersuchten DM1-Patienten ist ein Normalallel ohne ein erkennbares Repeat-Signal zu finden sowie ein expandiertes Allel, dessen einzelne Moleküle bezüglich ihrer Länge eine Streuung in Form einer Normalverteilung zeigen. Bei den beiden DM2-Patienten finden sich neben dem Normalallel ohne Repeatsignal expandierte Allele mit einer großen Längen-Streuung. Dabei ist im Histogramm erkennbar, dass die Molekülgrößen nicht normalverteilt sind, sondern offenbar ein Mosaik von mehreren Varianten unterschiedlicher Länge vorliegt. Aufgrund der bekannten Auflösung des Tests von 1-2 kb, welche sich aus dem Streckungsfaktor der DNA bei dem Molecular Combing und der mikroskopischen Aufnahme ergibt [Michalet *et al.* 1997], wurde für die Histogramme eine Auflösung von 1 kb gewählt. Statistische Daten der drei erkrankten Patienten sind in Tabelle 14 im Vergleich zu den Ergebnissen der Southern Blots aus der Routinediagnostik aufgeführt.

Tabelle 14: Statistische Daten der Repeatlänge ermittelt im Molecular Combing und die daraus berechnete Repeatzahl des expandierten Allels. Für DM2 ist jeweils die häufigste Variante des Allels in die Berechnung mit eingegangen. Außerdem ist das längste gefundene Repeat angegeben. (vgl. Histogramme Abbildung 26 und 27)

	DM1		DM2-a		DM2-b	
	Länge [kb]	Anzahl CTGs	Länge [kb]	Anzahl CCTGs	Länge [kb]	Anzahl CCTGs
Southern Blot Ergebnis	4,8	1600	Schmier	große Expansion	Schmier	große Expansion
Mittelwert	5,28	1760	7,1	1775	8,19	2050
Standardabweichung	1,22	405	1,51	380	2,31	578
95 % Konfidenzintervall	4,93 – 5,63	1645 – 1875	6,68 – 7,53	1670 – 1885	7,54 – 8,84	1885 – 2210
Minimum	1,94	645	3,23	810	3,55	890
Maximum	7,74	2580	9,35	1340	13,22	3305
Längstes Repeat	7,74	2580	41,93	10485	17,74	4435

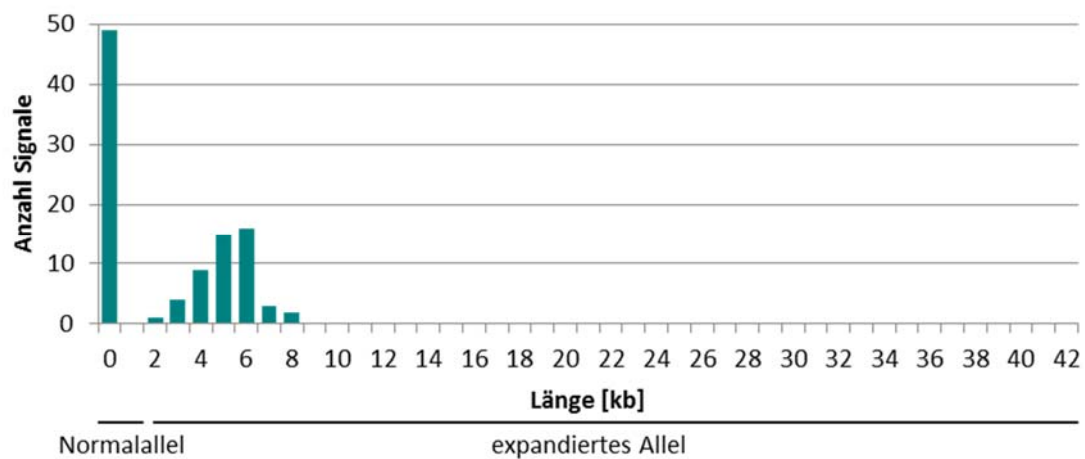


Abbildung 25: Histogramm der Repeatlänge des DM1 Patienten. N = 100 Signale, davon 49 Signale des Normalallels und 51 Signale des expandierten Allels.

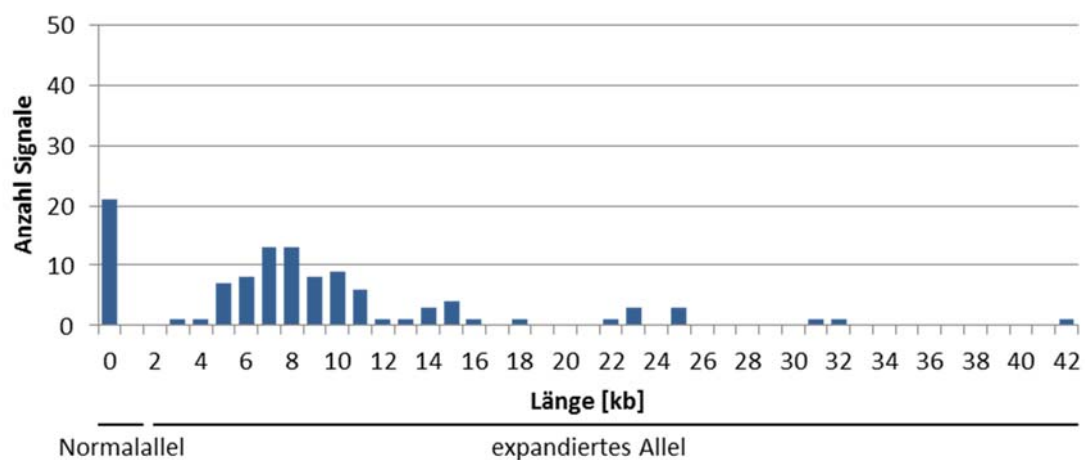


Abbildung 26: Histogramm der Repeatlänge des Patienten DM2-a. N = 109 Signale, davon 21 Signale des Normalallels und 89 Signale des expandierten Allels.

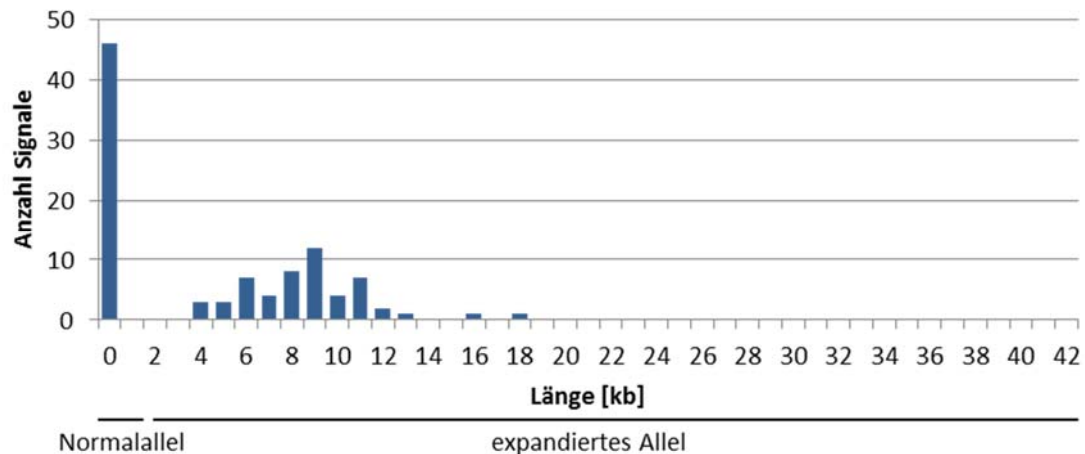


Abbildung 27: Histogramm der Repeatlänge des Patienten DM2-b. N = 99 Signale, davon 46 Signale des Normalallels und 53 Signale des expandierten Allels.

3.1.2 Analyse von Kandidatengenen als alternative Ursache von DM

Zur Beantwortung der Frage nach einer möglichen gemeinsamen Krankheitsursache bei Patienten mit der Symptomatik einer Myotonen Dystrophie, jedoch ohne Expansion in den assoziierten Genen, soll nach Defekten in Kandidatengenen gesucht werden. Ausgehend von dem bekannten Pathomechanismus der Myotonen Dystrophien wurden die Gene *DMPK*, *CNBP (ZNF9)*, *CELF1* und *MBNL1* mittels NGS analysiert.

3.1.2.1 Patienten

In unserem Routinelabor wurde in den vergangenen 10 Jahren (2004-2014) eine Gesamtzahl von ca. 5900 Indexpatienten mit der Eingangsdignose Myotone Dystrophie untersucht. Davon konnte bei etwa 900 Patienten eine Expansion in dem *DMPK*-Gen nachgewiesen werden, was die Diagnose einer DM1 sichert. In ca. 1100 Patienten wurde eine Expansion in dem *CNBP*-Gen gefunden, was die Diagnose einer DM2 bestätigt. Damit verbleiben noch immer 3900 Patienten ohne genetisch gesicherte Diagnose. Nicht alle diese Patienten wurden klinisch gut charakterisiert und eine große Zahl hat wahrscheinlich eine völlig andere muskuläre Erkrankung, als die klinische Erstdiagnose vermuten ließ. Bei ca. 200 Patienten wurde im Verlauf der Diagnostik eine genetische Diagnose gestellt, häufig waren dabei Mutationen in den Genen bzw. Regionen *ANO5* (MIM * 608662), *D4Z4* (OMIM #158900) und *LMNA* (MIM *150330), die zu verschiedenen Formen von Muskeldystrophien führen, hier *LGMD2L* (OMIM #311307), *FSHD1* (OMIM #158900) und *LGMD1B* (OMIM #159001)/*EMD* (OMIM #181350).

Alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potenziellen DM-Patienten mit alternativer Ursache zeigen Symptome der Myotonen Dystrophie, wie sie von Harper (2001) und Moxley (1998) beschrieben werden. Über die genaue Klinik sind leider jedoch wenige Details bekannt. Die

körperliche und anamnestische Untersuchung wurde durch den behandelnden Neurologen durchgeführt und genauere Informationen waren in zwei der drei Fälle nicht zugänglich.

Die Patientin DM3-192 soll im Folgenden näher beschrieben werden. Sie ist 60 Jahre alt und zeigt Symptome einer degenerativen Myopathie. Diese ist proximal betont und nicht näher klassifiziert. Der CK-Wert liegt 5fach über der oberen Norm. Bereits nach geringer Belastung tritt eine stark verminderte Leistungsfähigkeit der Beinmuskulatur auf, gefolgt von einem Schweregefühl in den Beinen. Außerdem liegen Herzrhythmusstörungen und eine operierte Schilddrüsenproblematik vor. Eine Ptosis, grauer Star oder Diabetes konnten nicht beobachtet werden. In der Familienanamnese zeigten sich mehrere entfernte Gallenblasen und Schilddrüsenoperationen. Zwei von sechs Geschwister leiden an Diabetes. Die Patientin selbst hat zwei gesunde Söhne mit jeweils einem gesunden Enkel. Es wurde die Verdachtsdiagnose einer doppelantikörper negativen Myasthenia gravis (MG) gestellt, die auch therapiert wird. Es handelt sich dabei um eine Autoimmunerkrankung in Form einer neuromuskulären Übertragungsstörung an der motorischen Endplatte, was klinisch zu einer Muskelschwäche führt [Jorden und Zierz 2014]. Eine Doppelerkrankung von MG und einer Myotonen Dystrophie ist ebenfalls denkbar.

3.1.2.2 Sequenzierung von DM-Kandidatengen

Es wurden insgesamt 144 Patienten aus 138 Familien untersucht. Für alle Indexpatienten wurden die Gene *CELF1* und *MBNL1* sequenziert, für 90 dieser Patienten außerdem die Gene *DMPK* und *CNBP*. Im Mittel wurde bei der Sequenzierung eine Anzahl von 76.000 Reads pro Lauf erhalten. Bis auf das Exon 1 der Gene *DMPK* und *CNBP* konnte für alle Exons eine Coverage von > 20x erzielt werden. Vereinzelte Exons mit einer Coverage von < 20x (6 % aller Exons) wurden mittels Sanger nachsequenziert. Dies waren für *DMPK* 15 %, für *CNBP* 3 %, für *CELF1* 2 % und für *MBNL1* 1 % der Exons.

Die Ergebnisse der Sequenzierung erbrachten sowohl bekannte, als auch nicht literaturbekannte Varianten. Alle Varianten wurden mittels Sanger Sequenzierung bestätigt und mit den Softwaretools von Alamut (Interactive Biosoftware) analysiert. Alle seltenen Varianten lagen heterozygot vor. In den Genen *CELF1* und *CNBP* wurden keine seltenen Varianten mit einer MAF (*minor allele frequency*) unter 1 % gefunden.

Im *DMPK*-Gen wurde eine seltene Variante gefunden, die mit einer niedrigen MAF von 0,1 % bereits literaturbekannt ist. Die Vorhersage durch die Softwaretools von Alamut ist kontrovers und nicht ganz eindeutig (siehe Tabelle 15). Patient DM3-173 zeigt einen Aminosäureaustausch an Position 308 von Serin nach Cystein. Dieser wird von MutationTaster und PolyPhen-2 als pathogen eingestuft, SIFT ordnet die Variante jedoch als toleriert ein.

Tabelle 15: Seltene Varianten im *DMPK*-Gen. (NM_001081563.2, GRCh37, hg19).

Patient	Exon	Genomische Koordinate	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	(a) rs-Nummer (b) MAF	(a) SIFT, (b) Mutation Taster, (c) PolyPhen-2
DM3-173	Ex07	g.46280838G>C	c.923C>G	p.Ser308Cys	(a) rs149803658 (b) 0,1 %*	(a) toleriert (b) krankheitsverursachend (0,993) (c) wahrscheinlich schädlich (0,99/0,783)

* MAF der allgemeinen Bevölkerung

Bei drei der untersuchten Patienten wurden potenziell pathogene Varianten in dem Gen *MBNL1* gefunden. Abbildung 28 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung mit NGS.

Patient DM3-192 zeigt die Missense-Variante c.95C>T in Exon 2, welche zu dem Austausch von Threonin 32 nach Methionin (p.Thr32Met) führt. Sie wird von allen verfügbaren Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft. Es ist keine rs-Nummer bekannt, die Variante wurde jedoch mit einer geringen Frequenz von 0,004 % bei großen Sequenzierprojekten gefunden (Genomes Project *et al.* (2012) und ExAC (2015)). Bei Patient DM3-83 findet sich die *in frame* Deletion c.511_519del in Exon 4, bei der neun Basenpaare wegfallen. Daraus resultiert die Deletion von drei Alaninresten (p.Ala171_Ala173del). Auch für diese Variante ist eine MAF (0,021 %) bekannt. Patient DM3-411 trägt eine Missense-Mutation (c.1012G>A) in Exon 8, welche zu dem Basenaustausch p.Gly338Ser führt. Die Variante ist bisher nicht bekannt und wird von allen Vorhersageprogramme als pathogen eingestuft. Die Varianten und Vorhersagen aus Alamut sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

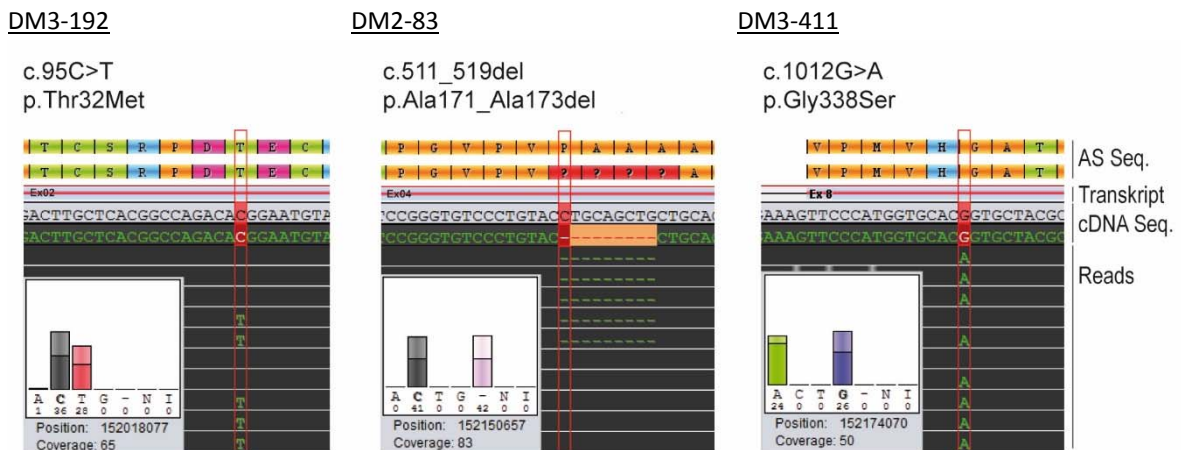


Abbildung 28: Varianten in *MBNL1*. Für die drei identifizierten Varianten im *MBNL1* ist jeweils die Mutationsansicht aus der Software GensearchNGS gezeigt. Das Diagramm zeigt die Referenz- und Konsensussequenz auf DNA- (cDNA Seq.) und Protein-Ebene (AS-Seq.) sowie die Exon/Intron Struktur des Transkripts (NM_021038.3, GRCh37, hg19). Einzelne Reads sind als schwarze Balken dargestellt, in denen Abweichungen von der Referenzsequenz in grün dargestellt sind. Das Feld links unten in jedem Diagramm gibt Informationen zu Frequenz und Gleichgewicht in *forward* und *reverse* Reads der ausgetauschten Base oder Deletion an ('A C T G' Basen, '-' Deletion, 'N' nicht definierte Base, 'I' Insertion), sowie die Position im Transkript und die Coverage an dieser Position. (Graphik aus *GensearchNGS* [Wolf *et al.* 2015])

Tabelle 16: Seltene Varianten im *MBNL1*-Gen. (NM_021038.3, GRCh37, hg19)

Patient	Exon	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	(a) rs-Nummer (b) MAF	(a) SIFT, (b) Mutation Taster, (c) PolyPhen-2
DM3-192	Ex02	c.95C>T	p.Thr32Met	(a) - (b) 0,004 %	(a) schädlich (0,01/3,60) (b) krankheitsverursachend (0,998) (c) wahrscheinlich schädlich
DM3-83	Ex04	c.511_519del	p.Ala171_Ala173del	(a) - (b) 0,021 %	-
DM3-411	Ex08	c.1012G>A	p.Gly338Ser	-	(a) schädlich (0,00/4,32) (b) krankheitsverursachend (1,0) (c) wahrscheinlich schädlich

In allen vier untersuchten Genen wurden bekannte SNPs gefunden. Diese sind mit der Häufigkeit in der hier untersuchten Kohorte im Vergleich mit der MAF in der europäischen Bevölkerung in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17: SNPs in den Genen *DMPK* (NM_001081563.2), *CNBP* (NM_001127192.1), *CELF1* (NM_001172639.1) und *MBNL1* (NM_021038.3) (je GRCh37, hg19). Angegeben ist die Koordinate der Variante, die Häufigkeit in der untersuchten Kohorte (N = 96) und die sich daraus ergebende MAF in % sowie die MAF der europäischen Bevölkerung und die rs-Nummer des SNPs.

Gen	Exon/ Intron	Genomische Koordinate	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	homo wt	hetero mut	homo mut	MAF hier	MAF Euro	rs-Nummer
DMPK	Int02	g.46282683G>A	c.366+14C>T	-	94	2	0	1,0	0,9	rs145200358
	Int03	g.46281918T>G	c.463-19A>C	-	82	14	0	7,3	11,9	rs572634
	Int04	g.46281745A>G	c.611+6T>C	-	26	47	23	48,4	46,8	rs1799894
	Int06	g.46280917G>A	c.912+8C>T	-	93	4	0	2,1	0,4	rs141629958
	Ex07	g.46280838G>C	c.923C>G	p.Ser308Cys	95	1	0	0,5	0,1*	rs149803658
	Ex08	g.46278261G>A	c.1208C>T	p.Pro403Leu	94	2	0	1,0	0	rs200491028
	Int07	g.46278297G>A	c.1177-5C>T	-	95	1	0	0,5	1,1	rs201744975
	Ex09	g.46275976G>C	c.1297C>G	p.Leu433Val	74	22	0	11,5	11,3	rs527221
	Ex12	g.46274624G>A	c.1661C>T	p.Thr554Met	94	2	0	1,0	1,5	rs146680240
	Int13	g.46273916G>A	c.1768-18C>T	-	94	2	0	1,0	0,7	rs185293099
CNBP	Ex03	g.128890350G>A	c.156C>T	p.(=)	85	9	0	4,7	1,8	rs4303883
	Ex02	g.128890540T>C	c.61A>G	p.Thr21Ala	95	1	0	0,5	0,1	rs140065732
CELF1	Ex10		c.783C>T	p.(=)	95	1	0	0,5	0,1	rs147513178
MBNL1	Ex02	g.152018102G>A	c.120G>A	p.(=)	93	3	0	1,6	1,3	rs74497536
	Ex04	g.152150697A>G	c.537A>G	p.(=)	94	2	0	1,0	0	rs145199298

* MAF der allgemeinen Bevölkerung

3.1.2.3 Muskelpanel

Bei den drei Patienten, bei denen unter 3.1.2.2 potentiell pathogene Varianten in dem *MBNL1*-Gen gefundenen wurden, wurde zum Ausschluss von Differentialdiagnosen eine Sequenzierung von 37 mit Muskelerkrankungen assoziierten Genen vorgenommen. Eine Liste der Gene befindet sich in Anlage 7.2.

Bei der Sequenzierung mit dem Illumina Miseq wurden im Mittel 11.000.000 Reads pro Patient erhalten. Das Alignment zur Referenzsequenz ergab eine Coverage von > 20x für fast alle codierenden Exons. Lediglich fünf einzelne Exons waren nicht abgedeckt, diese wurden nicht nachsequenziert.

Es wurden einzelne Varianten mit einer MAF < 1 % gefunden (siehe Tabelle 18). Darunter sind vier Aminosäureaustausche, drei Spleißvarianten und drei synonyme Basenaustausche. Keiner der zehn gefundenen Varianten wird eine bedeutende Pathogenität in der Vorhersage durch die Softwaretools von Alamut zugesprochen.

Tabelle 18: Varianten im Muskelpanel mit einer MAF < 1%.

Patient	Gen	Tanskript	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	Spleißeffekt	MAF	rs-Nummer
DM3-83	RYR1	NM_000540.2	c.9685+16C>T	-	geringer Spleißeffekt	0,5	rs45496799
	TTN	NM_001267550.2	c.10726A>G	p.Thr3576Ala		0	rs6433728
	TTN	NM_001267550.2	c.36509A>T	p.Glu12170Val		0,4	rs200840285
DM3-192	TTN	NM_001267550.2	c.32624C>T	p.Pro10875Leu		0,5	rs72650031
	TTN	NM_001267550.2	c.63165G>A	p.=		0	rs72646852
	TTN	NM_001267550.2	c.100608C>T	p.=		-	-
DM3-411	FLNC	NM_001458.4	c.5578C>T	p.Arg1860Cys		0,4	rs18106771
	COL6A1	NM_001848.2	c.1182+3G>A	-	geringer Spleißeffekt	0	rs62215499
	TTN	NM_001267550.2	c.51740-20A>G	-	geringer Spleißeffekt	0	rs373530686

3.1.2.4 Spleißanalysen von *MBNL1*-Targetgenen

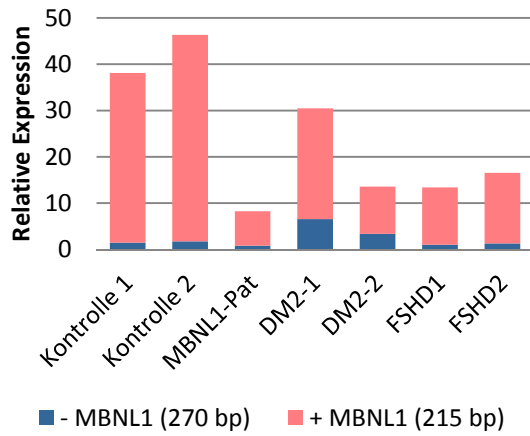
MBNL1 ist ein Spleißfaktor, welcher einen Einfluss auf das Spleißmuster verschiedener Targetgene nimmt. Diese zeigen unter Anwesenheit von *MBNL1* ein adultes und unter Abwesenheit ein fetales Spleißmuster, was sich in der Verwendung oder dem Ausschluss einzelner Exons ausdrückt. Der Wechsel zwischen den Transkripten ist dabei dosisabhängig. Diese Effekte wurden an Muskelgewebe von Patienten mit DM1 und DM2 gezeigt [Ranum und Cooper 2006].

Unter der Annahme, dass ein Funktionsverlust von *MBNL1* durch pathogene Varianten in dem Gen vorliegt, sollte das Spleißmuster verschiedener *MBNL1*-Targetgene untersucht werden. Als Untersuchungsmaterial stand RNA aus Leukozyten des Patienten DM3-192 mit der *MBNL1* Variante p.Thr32Met zur Verfügung. Dieses wurde mit Leukozyten-RNA zweier gesunder Kontrollen, sowie vier muskelerkrankter Kontrollen (2x DM2, 1x FSHD1, 1x FSHD2) verglichen.

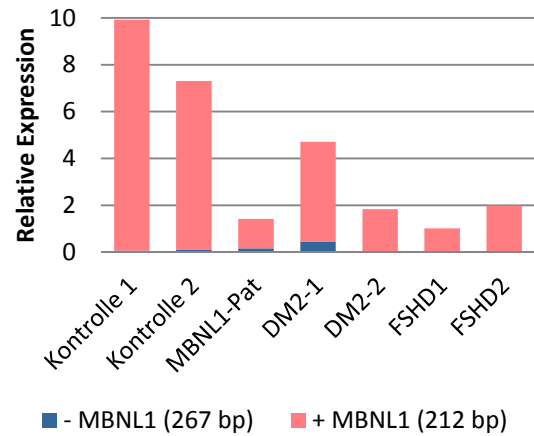
Eine semiquantitative Spleißanalyse wurde für die Gene *MBNL1*, *MBNL2*, *CAPZB*, *PPP2R5C*, *SPAG9* und *SERCA2* durchgeführt. Die Proben wurden gegen das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert. Die PCR-Produkte für *MTMR1* und *SERCA1* waren sehr schwach und quantitativ nicht auswertbar. *CAPZB* und *MTDH* zeigten keinerlei Unterschied zwischen den analysierten Proben. Für die Gene *IR*, *TNNT2*, *ZASP*, *FN* und *NRAP* wurde kein PCR-Produkt erhalten. Die Ergebnisse sind in Form von Histogrammen in den Abbildungen 29 und 30 dargestellt.

Bei dem Vergleich der Expressionsstärke der sechs untersuchten Gene in Abbildung 29 fällt auf, dass die beiden gesunden Kontrollproben jeweils eine höhere Expression zeigen, als alle erkrankten Patienten. Eindeutige Unterschiede zwischen den erkrankten Patienten sind nicht sichtbar. Wird lediglich das Verhältnis der beiden gebildeten Transkripte zueinander betrachtet (Abbildung 30), so kann keine eindeutige Aussage zu Unterschieden zwischen gesunden und erkrankten Personen getroffen werden.

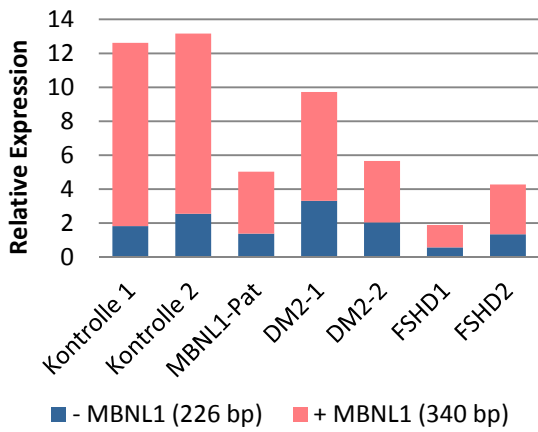
MBNL1



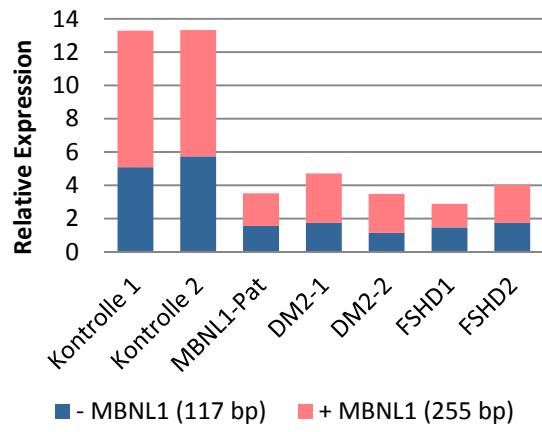
MBNL2



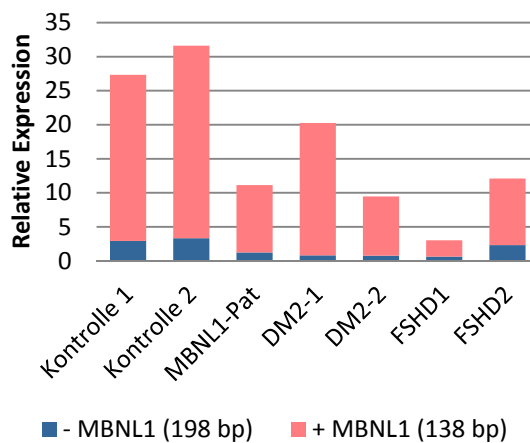
CAPN3



PPP2R5C



SPAG9



SERCA2

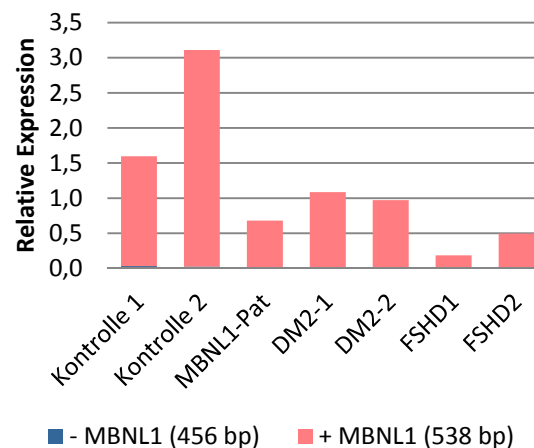
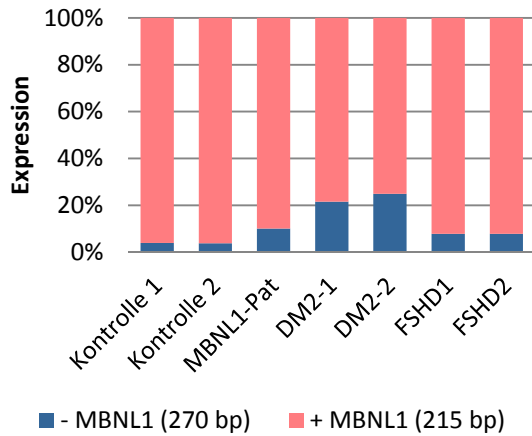
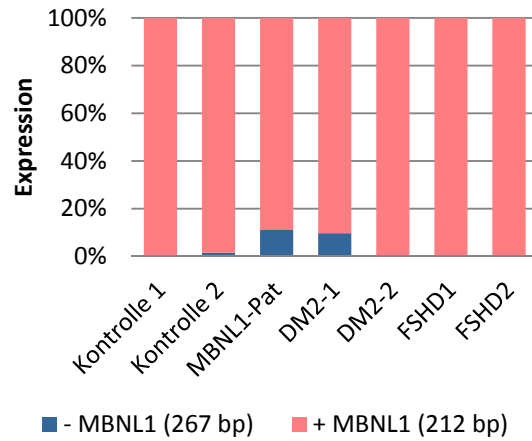


Abbildung 29: Relative Expression der MBNL1-Targetgene. Die Histogramme zeigen je zwei verschiedene Spleißvarianten, welche unter Anwesenheit (rot) und unter Abwesenheit (blau) von MBNL1 erwartet werden [Ranum und Cooper 2006]. Die Werte wurden gegen das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert. Für die erwarteten Produkte ist die Größe in bp angegeben.

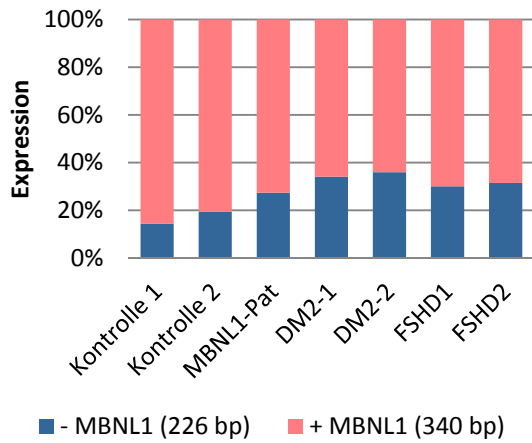
MBNL1



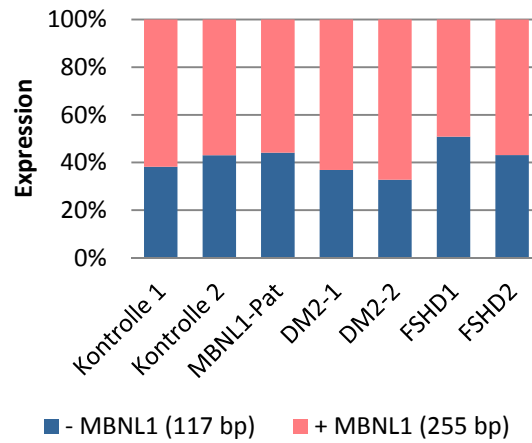
MBNL2



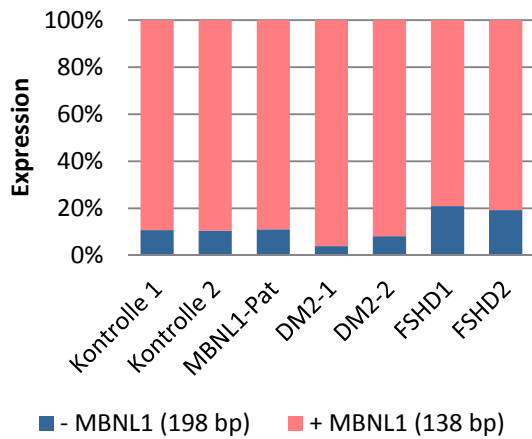
CAPN3



PPP2R5C



SPAG9



SERCA2

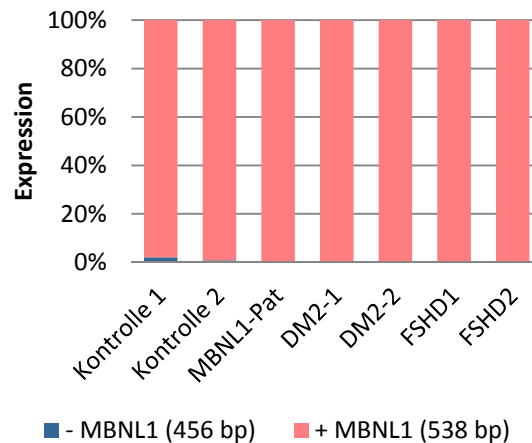


Abbildung 30: Absolute Unterschiede in der Expressionsstärke der MBNL1-Targetgene. Dargestellt ist die Expression der beiden Spleißvarianten, welche unter Anwesenheit (rot) und unter Abwesenheit (blau) von MBNL1 erwartet werden. Die Werte wurden gegen das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert. Für die erwarteten Produkte ist die Größe in bp angegeben.

3.1.2.5 Strukturanalysen von MBLN1

Die in Patient DM3-192 identifizierte Variante des *MBLN1*-Gens (p.Thr32Met) liegt in der ersten Zinkfinger-Domäne des Proteins (Abbildung 31). Zur Beurteilung des Effekts der Variante wurde ein bioinformatisches 3D Modell der ersten beiden Zinkfinger von MBLN1 anhand der Kristallstruktur des Proteins (PDB: 3D2N) erzeugt. In dem Strukturmodell und Oberflächenmodell werden Wildtyp und Variante verglichen (siehe Abbildung 32).

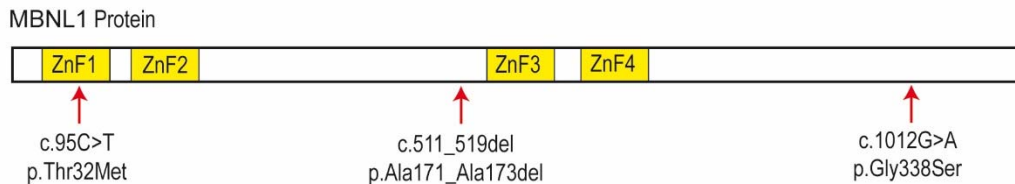


Abbildung 31: Das MBLN1-Protein mit konservierten Zinkfinger-Domänen (ZnF). Gekennzeichnet sind die relative Position der ZnFs (gelb) und der gefundenen Varianten (rote Pfeile).

Die beiden Varianten p.Ala171_Ala173del und p.Gly338Ser liegen außerhalb von Domänen des MBLN1-Proteins, für die eine Kristallstruktur zur Verfügung steht, weshalb eine strukturelle Analyse hier nicht durchgeführt werden konnte.

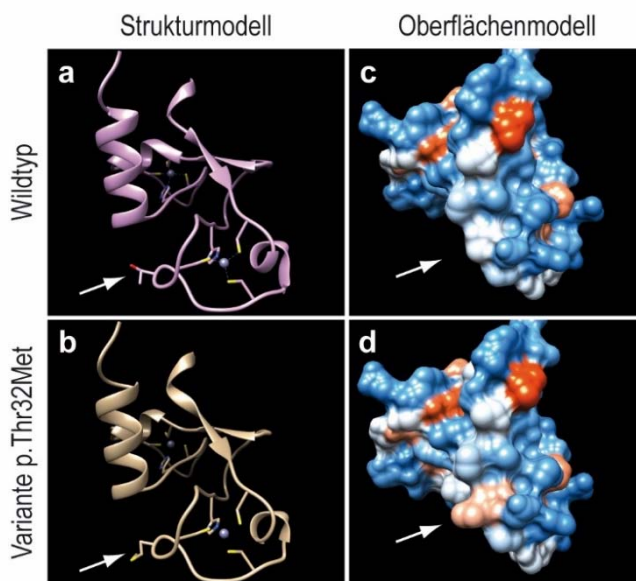


Abbildung 32: Modell der Zinkfinger 1 und 2 des MBLN1-Proteins. Gezeigt sind ein Strukturmodell (a und b) und ein Oberflächenmodell (c und d) vom Wildtyp (a und c) und der Variante p.Thr32Met (b und d) im Vergleich. Die Position des Aminosäureaustauschs ist mit Pfeilen markiert. Im Oberflächenmodell stellen blaue Regionen hydrophile Reste dar und rote Areale hydrophobe Reste. Eine Veränderung vom Wildtyp zu der Variante ist deutlich erkennbar. (Graphik aus *Swiss-Model* [Biasini *et al.* 2014])

Das Strukturmodell zeigt die Position der veränderten Aminosäure der Variante p.Thr32Met an der Außenseite des Proteins. Im Oberflächenmodell ist eine Änderung in den Oberflächeneigenschaften

mit einem Wechsel von neutral zu hydrophob zu sehen. Außerdem ist die Raumeinnahme der veränderten Aminosäure deutlich größer.

3.2 Projekt FSHD

Die genetische Ursache der Facioscapulohumeralen Muskeldystrophie (FSHD) ist in ca. 95 % der Fälle in einer Verkürzung des D4Z4-Repeats innerhalb des FSHD-Lokus auf Chromosom 4q35 begründet. In ca. 5 % der Fälle mit eindeutiger FSHD-Symptomatik kann diese Repeatkontraktion nicht nachgewiesen werden (FSHD1-negativ). In unserem Diagnostiklabor wurden in den vergangenen 10 Jahren (2004-2014) ca. 4000 Patienten mit der Verdachtsdiagnose FSHD untersucht. Davon wurde für ca. 1500 Patienten eine positive Diagnose für FSHD1 gestellt, 2500 Patienten waren negativ.

Die holländische Gruppe um Lemmers *et al.* (2012b) hat eine zweite Form der FSHD beschrieben, welche mit Varianten in dem Gen *SMCHD1* assoziiert sein soll (FSHD2). In einer Reihe von Untersuchungen an zwei verschiedenen Patientenkohorten (FSHD1-negativ und FSHD1-positiv) sollte die FSHD Typs 2 näher charakterisiert und daran anknüpfende Fragestellungen untersucht werden.

3.2.1 Charakterisierung der FSHD Typ 2

Im Rahmen dieses Projektes wurden zwei Patientenkohorten untersucht. Gruppe A umfasste 55 FSHD1-negative Patienten, Gruppe B 40 FSHD1-positive Patienten. Die Gruppen sind im Methodenteil (2.1.2) genauer beschrieben.

Zur Veranschaulichung des Ablaufs der Analysen ist dieser in einem Fließschema (Abbildung 33) dargestellt.



Abbildung 33: Fließschema für die Untersuchung von potentiellen FSHD2-Patienten. Für alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Patienten stand im Vorfeld das Ergebnis der FSHD1-Routinediagnostik zur Verfügung. Die übrigen Parameter wurden für alle Patienten untersucht.

3.2.1.1 Patienten

Die Klinik der identifizierten FSHD2-Patienten soll etwas genauer vorgestellt werden. In Tabelle 19 ist die klinische Präsentation der FSHD2 Index-Patienten dargestellt. In Abbildung 34 sind Stammbäume der vier untersuchten FSHD2-Familien gezeigt. Alle weiteren FSHD2-Patienten waren Einzelpatienten. Die Daten wurden in einer anamnestischen und körperlichen Untersuchung durch den behandelnden Neurologen erhoben.

Tabelle 19: Klinische und Labordiagnostische Beschreibung der FSHD2-Patienten.

Patient	Geschlecht	FSHD1-Diagnostik ¹	Beginn der Erkrankung	Alter bei Datenerhebung	Erste betroffene Muskelgruppe ²	Verteilung der Muskelschwäche					
						Muskelschmerzen	Faziale Muskeln	Schultergürtel	Abdominale Muskulatur	Untere Extremitäten	Asymmetrie
FSHD2-08	♂	> 10	43	44	Unterschenkel	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
FSHD2-10	♀	> 10	20	22	Arme	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
FSHD2-13	♀	> 10	55	64	Unterschenkel	-	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
FSHD2-28	♀	> 10	24	32	Schultergürtel	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
FSHD2-38	♀	> 10	40	47	Schultergürtel	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
FSHD2-61	♀	6	-	81	-	-	Ja	Ja	-	-	-
FSHD2-82	♀	> 10	25	74	Schultergürtel	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
FSHD2-89	♀	10	11	21	Schultergürtel	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
FSHD2-92	♂	10	20	55	Unterschenkel	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
FSHD2-120	♂	> 10	30	40	Arme	-	Ja	Ja	Ja	Ja	-
FSHD2-130	♀	> 10	30	41	Arme	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
FSHD2-131	♀	> 10	60	75	Arme	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja

¹ Anzahl an D4Z4 Repeat Einheiten

² Subjektive Beurteilung des Patienten

(-) keine Information

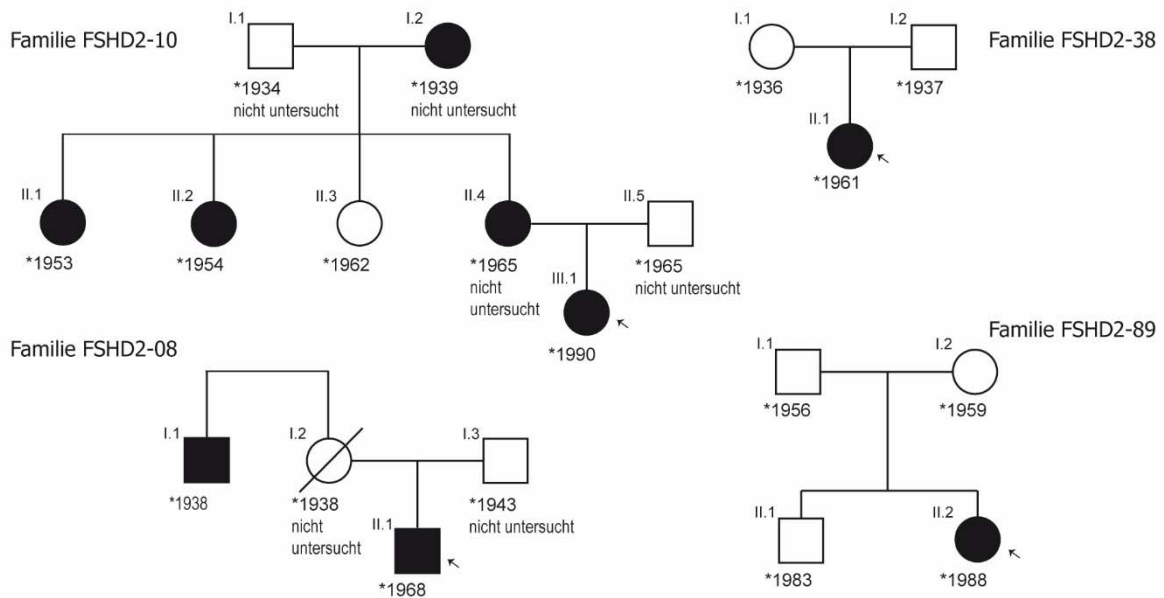


Abbildung 34: Stammbäume der untersuchten FSHD2-Familien. Für alle Patienten ist das Geburtsjahr angegeben. Die Indexpatienten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Kreis: ♀, Quadrate ♂, weiß: gesund, schwarz: betroffen.

Die unten gezeigte Abbildung 35 veranschaulicht die typische Muskelschwäche eines FSHD2-Patienten mit Symptomatik in der Gesichtsmuskulatur, in den Oberarmen und im Schultergürtel.



Abbildung 35: Darstellung des Phänotyps einer FSHD2-Patientin. **A** Inkompletter Lidschluss, Zilienzeichen. **B** Schwäche der Ringmuskulatur des Mundes. **C** Achsel-Brust-Falte. **D** Schwäche der Oberarmmuskulatur. **E** Schwäche des Schultergürtels mit *Scapulae alatae*. (Bilder freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Marcus Deschauer, Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Halle (Saale). Es liegt das Einverständnis der Patientin zur Veröffentlichung vor.)

Bei allen Patienten wurde eine Bestimmung des CK-Wertes vorgenommen. Außerdem wurden bei einem Teil der FSHD2-Patienten ein EMG und eine Muskelbiopsie zur Diagnosestellung durchgeführt. Die Befunde sind in Tabelle 20 zusammengestellt. Abbildung 36 zeigt Ausschnitte der histochemischen Untersuchung der Muskelbiopsie eines FSHD2-Patienten. Darin sind unspezifische myogene Veränderungen sichtbar.

Tabelle 20: Befund der muskulären Untersuchung bei FSHD2-Patienten.

Patient	CK Wert*	EMG	Befund der Muskel Biopsie
FSHD2-08	2,6	Myopathische PmE, keine Spontanaktivität	-
FSHD2-10	5,3	Myopathische PmE, keine Spontanaktivität	Zeichen einer Myositis
FSHD2-13	1,5	-	Myositisch/myogenes Bild mit neurogenen Veränderungen
FSHD2-28	2,2	Myopathisches Muster	Myopathisches Bild ohne entzündliche Veränderungen
FSHD2-38	5,4	Myopathisches Muster	Dystrophisches Bild mit entzündlichen Infiltraten
FSHD6-61	0,5	Myopathisches Muster	Multimini-Cores
FSHD2-82	1,1	Myopathische PmE, keine Spontanaktivität	-
FSHD2-89	1,0	-	-
FSHD2-92	1,9	Myopathisches Muster	Dystrophisches Bild
FSHD2-120	1,0	-	Muskeldystrophisches Bild
FSHD2-130	2,9	Myopathisches Muster	Myopathie
FSHD2-131	2,3	Myopathische PmE, keine Spontanaktivität	Myopathie, Desmin-Ablagerungen

* Vielfaches der oberen Norm

PmE: Potenzial motorischer Einheiten

(-) keine Information

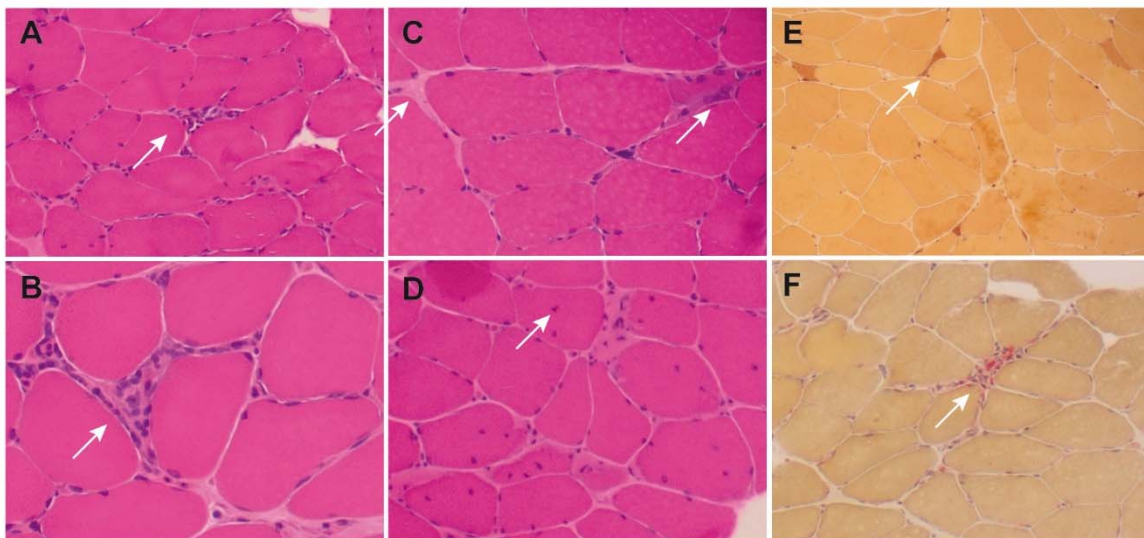


Abbildung 36: Muskelbiopsie eines FSHD2-Patienten aus dem Musculus gastrocnemius (Zweiköpfiger Wadenmuskel), links. (A) Phagozytose. (B) Entzündliches Infiltrat. (C) Entzündliches Infiltrat und Vermehrung des endomysialen Bindegewebes. (D) Binnenständige Zellkerne, Kaliberschwankung der Muskelfasern. (E) Denervierte Fasern (dunkel). (F) Phagozytose mit erhöhter Aktivität der lysosomalen Enzyme (rot). Auffälligkeiten sind beispielhaft durch Pfeile markiert. A-D: Hämatoxylin-Eosin Färbung, E-F: Saure Phosphatase Färbung. (Bilder freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Pawel Tacik, Klinik für Neurologie, Medizinische Hochschule Hannover)

3.2.1.2 Haplotyp-Charakterisierung

Die FSHD ist mit der ektopischen Expression des *DUX4*-Gens assoziiert. Das Transkript ist jedoch nur stabil, wenn ein FSHD-permissives 4q Allel vorliegt. Die FSHD-Haplotypen mit Aufbau und Bedeutung wurden in der Einleitung (1.5.2) näher beschrieben. Mit der Haplotyp-Untersuchung wurde ermittelt, ob der häufigste permissive Haplotyp 4qA161 bei dem Patienten vorliegt, oder nicht. Dies wurde mit einem Assay auf der Basis der Bestimmung des SSLP proximal zu D4Z4 durchgeführt. Die Untersuchung wurde als Vorscreening für die nachfolgenden Analysen verwendet.

Es wurden insgesamt 115 potenzielle FSHD2-Patienten aus 95 Familien untersucht. Bei einer Anzahl von 92 Patienten konnte das Vorliegen von einem oder zwei 4qA161 Allelen nachgewiesen werden, darunter waren 79 Indexpatienten – 44 aus Gruppe A und 35 aus Gruppe B. Für insgesamt 23 Patienten wurde das Vorliegen von 4qA161 ausgeschlossen (Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnis der Haplotyp-Charakterisierung des *D4Z4*-Lokus. Angegeben ist jeweils die Zahl der gefundenen Patienten in einer Gruppe.

	Indexpatienten	Patienten gesamt	4qA161 positiv	4qA161 negativ
gesamt	95	115	92	23
Gruppe A	55	75	57	18
Gruppe B	40	40	35	5

3.2.1.3 Sequenzierung von *SMCHD1*

Es wurde eine Sequenzierung des *SMCHD1*-Gens bei 90 Patienten aus insgesamt 79 Familien in vier Läufen durchgeführt. Alle diese Patienten zeigten den permissiven 4qA161 Haplotyp. Bei der Sequenzierung wurde im Mittel eine Anzahl von 70.000 Reads pro Lauf erhalten. Bis auf Exon 1 konnte für alle Exons eine Coverage von > 20x erzielt werden, im Mittel lag diese bei 73x (min. 0x, max. 364x). Alle Exons mit einer Coverage von < 20x (8 % aller Exons) wurden mittels Sanger nachsequenziert.

Das *SMCHD1*-Gen enthält eine große Zahl SNPs, welche auch bei den untersuchten Patienten gefunden wurden. Die hier gefundenen SNPs mit einem Vergleich der literaturbekannten MAF in der europäischen Bevölkerung sind in Tabelle 22 zusammengestellt. Die berechnete MAF stimmt in hohem Maße mit der MAF in Europäern überein.

Tabelle 22: Auflistung aller innerhalb dieses Projektes gefundenen SNPs in dem Gen *SMCHD1*. Angegeben sind die Position innerhalb des Transkripts bzw. des Proteins, die Häufigkeit des gefundenen Genotyps bei N = 84 Patienten, die daraus berechnete MAF (%), die MAF der europäischen Bevölkerung (aus dem 1000 Genomes Project), sowie die rs-Nummer des SNPs.

Exon/ Intron	Transkript Koordinaten	Protein Koordinaten	homo WT	homo Mut	hetero	MAF hier	MAF Euro	rs-Nummer
Ex01	c.174C>G	p.=	40	5	39	29,2	47,4	rs2430853
Ex13	c.1688G>A	p.=	83	0	1	0,6	0,8*	rs78073508
Ex14	c.1851G>A	p.=	45	10	29	29,2	29,3	rs635132
Int14	c.1956+7C>T	-	83	0	1	0,6	0,4	rs145755468
Ex16	c.2122G>A	p.=	45	10	29	29,2	32,8	rs2276092
Ex21	c.2637A>T	p.Lys879Asn	28	16	40	42,9	44,5	rs633422
Ex28	c.3528A>G	p.=	41	5	38	28,6	26,0	rs12327477
Int29	c.3802-6T>G	-	83	0	1	0,6	1,9*	rs79829175
Ex32	c.4137A>G	p.=	42	1	41	25,6	26,0	rs2304859
Ex37	c.4629C>T	p.=	26	15	43	43,5	45,0	rs483547
Int43	c.5476+10A>G	-	45	3	36	25,0	26,0	rs3213926

* MAF der allgemeinen Bevölkerung

Neben den häufigen Varianten wurden auch seltene, potentiell pathogene Varianten im *SMCHD1*-Gen gefunden. Unter den 79 Indexpatienten wurden insgesamt zwölf heterozygote Varianten identifiziert. In Gruppe A, den 55 FSHD1-negativen Patienten, wurden insgesamt neun Varianten gefunden, in Gruppe B, den 40 FSHD1-positiven Patienten, waren es drei Varianten. Alle Varianten wurden mittels Sanger Sequenzierung bestätigt. Die Pathogenität der Varianten wurde mit Hilfe der Vorhersageprogramme des Alamut (Interactive BioSoftware) Software Pakets interpretiert. Alle gefundenen Varianten und die Ergebnisse der Vorhersagen sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Mit einer Ausnahme sind alle Varianten nicht in öffentlichen Datenbanken aufgeführt (dbSNP138 und 1000 Genomes Project *et al.* (2012)). Die Variante c.3276_3276+4del in Exon 25 ist bereits von Lemmers *et al.* (2012b) als pathogen beschrieben worden. Sie stellt eine Spleißmutation dar und führt zu Skipping von Exon 25 und einer Verschiebung des Leserasters in der mRNA (p.Val1093Leufs*26), was wiederum zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Die gleiche 5'-Spleißstelle des Exons 25 ist bei der Variante c.3274_3276+1del betroffen, welche in den Patienten FSHD2-13 und FSHD2-120 nachgewiesen wurde. Formal führt diese zu der Deletion von Lysin 1092 und gleichzeitig zu Skipping von Exon 25 während des Spleißprozesses. In Patient FSHD2-82, führt die Variante c.4988T>G zum Austausch von Leucin1663 durch ein Stop-Codon (p.Leu1663*).

Tabelle 23: Potentiell pathogene Varianten in *SMCHD1*.

Patient	Mutationstyp	Exon/ Intron	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	(a) SIFT, (b) Mutation Taster, (c) PolyPhen-2, (d) UMD Predictor, (e) Spleißeffect
FSHD2-08	Missense	Exon 11	c.1433G>A	p.Gly478Glu	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (c) wahrscheinlich schädigend (0,618)/gutartig (0,142) (d) pathogen (93)
FSHD2-10	5' Spleißstelle	Exon/ Intron 25	c.3276_3276+4del	p.Val1093Leufs*26	als pathogen berichtet
FSHD2-13	5' Spleißstelle	Exon/ Intron 25	c.3274_3276+1del	p.Lys1092del	(e) kryptisches Spleißen und Überspringen von Exon 25
FSHD2-28	Missense	Exon 34	c.4346G>A	p.Arg1449Lys	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (1,0) (c) wahrscheinlich schädigend (0,993/0,967) (d) pathogen (100)
FSHD2-38	Missense	Exon 14	c.1844T>A	p.Val615Asp	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (1,0) (c) wahrscheinlich schädigend (0,999/0,996) (d) pathogen (100)
FSHD2-61	5' Spleißstelle	Intron 14	c.1957-3C>T	-	(e) Verlust einer Bindestelle für Spleißfaktor SRp40 im Bereich der 5' Spleißstelle; vorhergesagte Änderung an der Akzeptor Spleißstelle: +12,3 %
FSHD2-82	Nonsense	Exon 40	c.4988T>G	p.Leu1663*	Leseraster wird durch ein vorzeitiges Stop-Codon unterbrochen
FSHD2-89	Missense	Exon 35	c.4388A>C	p.Gln1463Pro	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (0,994) (c) wahrscheinlich schädigend (0,97/0,93) (d) pathogen (90)
FSHD2-92	Missense	Exon 36	c.4454C>T	p.Pro1485Leu	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (1,0) (c) wahrscheinlich schädigend (1,000/0,996) (d) pathogen (81)
FSHD2-120	5' Spleißstelle	Exon/ Intron 25	c.3274_3276+1del	p.Lys1092del	(e) kryptisches Spleißen und Überspringen von Exon 25
FSHD2-130	5' Spleißstelle	Intron 11	c.1463+5G>A	-	(e) vorhergesagte Änderung an der Donor Spleißstelle: -64,4 %; wahrscheinlich Skipping von Exon 11 mit Verschiebung des Leserasters
FSHD2-131	Missense	Exon 3	c.328G>A	p.Ala110Thr	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (0,999) (c) wahrscheinlich schädigend (0,998/0,863) (d) pathogen (87)

Ein Basenaustausch in Intron 11 führt zu der Spleißmutation c.1463+5G>A in Patient FSHD2-130, was zu dem vorhergesagten Verlust der Donor-Spleißstelle und daraufhin Skipping von Exon 11 führt. Dieser Spleißeffekt führt schließlich zu einer Störung des Leserasters mit einem vorzeitigen Stopcodon (TGA) an Position c.1577-1579 (p.526-527*) in Exon 12. Für den Basenaustausch c.1957-3C>T in Patient FSHD2-61 wird ein geringer Spleißeffekt vorhergesagt, er führt jedoch zu dem vollständigen Verlust der Bindestelle des Spleißfaktors SRp40 im Bereich der Akzeptor-Spleißstelle. Daraus resultierendes Skipping von Exon 15 führt zu einer Leserasterverschiebung und vorzeitigem Stopcodon (TGA) an der Position c.2070-2072 (p.690-691*) in Exon 16. Diese Variante ist als rs201069969 mit einer MAF von 0,1 % bereits bekannt. Ein Ausschnitt der Spleißvorhersagen aus Alamut für die beiden eben beschriebenen Varianten ist in Abbildung 37 gezeigt.

Die verbleibenden sechs Varianten führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch. Die Varianten c.328G>A (p.Ala110Thr), c.1844T>A (p.Val615Asp), c.4346G>A (p.Arg1449Lys), c.4388A>C (p.Gln1463Pro) und c.4454C>T (p.Pro1485Leu) wurden alle von den Vorhersageprogrammen SIFT, PolyPhen2, MutationTaster und UMD Predictor als pathogen eingestuft. Für die Variante c.1433G>A (p.Gly478Glu) waren die Scores ein wenig niedriger. [Larsen *et al.* 2015]

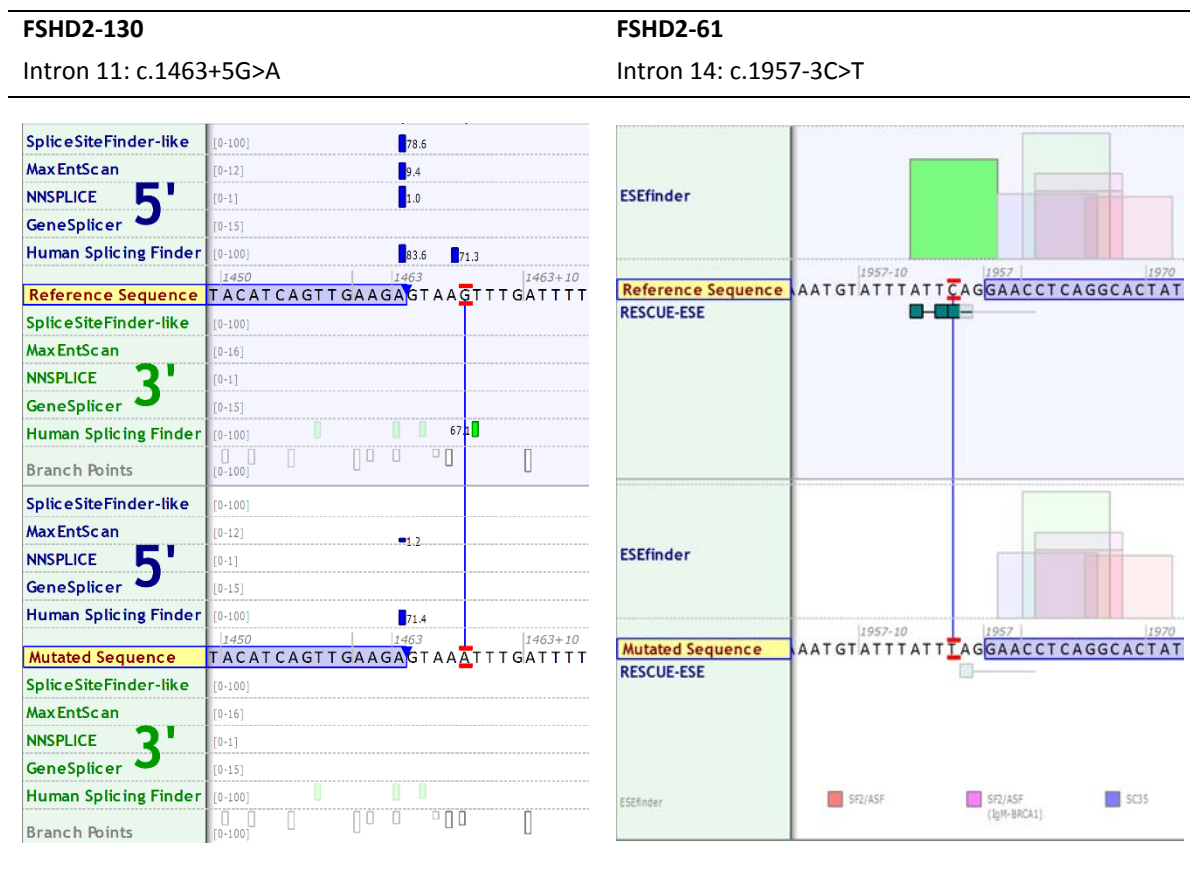


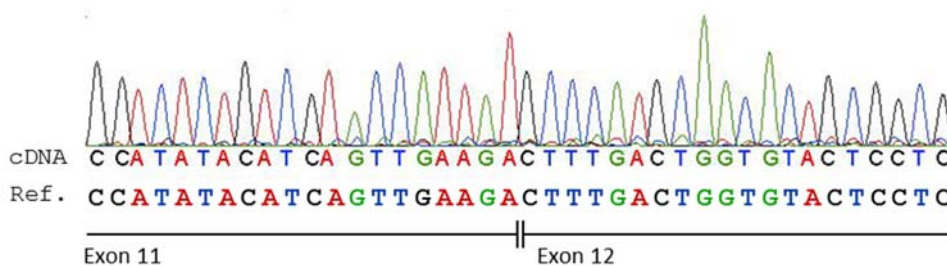
Abbildung 37: Spleißvorhersage durch Alamut für zwei Varianten in *SMCHD1*. Für Variante c.1463+5G>A in Intron 11 sind die Vorhersagen der fünf Spleißvorhersage-Tools von Alamut gezeigt. Vier der fünf Programme sagen eine starke Abnahme der Nutzung der 5' Spleißstelle voraus. Für die Variante c.1957-3C>T in Intron 14 wird durch den ESEfinder der vollständige Verlust der Bindestelle des Spleißfaktors SRp40 vorhergesagt.

3.2.1.4 Spleißmutationen in *SMCHD1*

Bei der Sequenzierung des *SMCHD1*-Gens wurden vier verschiedene Spleißmutationen gefunden (siehe Tabelle 23). Für die nicht literaturbekannten Varianten in den Introns 11 und 14 bei den Patienten FSHD2-61 und FSHD2-130 wurde eine Analyse der cDNA aus Blut durchgeführt, um die Auswirkung der Mutation auf RNA-Ebene zu prüfen.

Es wurde jeweils eine Sequenzierung der die Variante umgebenden Sequenz durchgeführt und diese mit der cDNA-Referenz verglichen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 38 gezeigt. Es wurden keine Abweichungen der cDNA-Sequenz zur Referenzsequenz beobachtet. Durch die Sequenzierung der cDNA konnte keine Veränderung des Spleißmusters festgestellt werden.

A Intron 11: c.1463+5G>A



B Intron 14: c.1957-3C>T

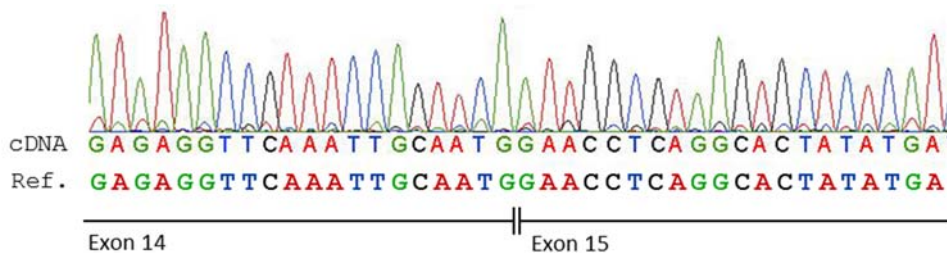


Abbildung 38: Elektropherogramm der Sequenzierung von Spleißvarianten in *SMCHD1* auf cDNA-Ebene. Es ist zu sehen, dass es zu keiner Veränderung im Vergleich zu der normalen Referenzsequenz (Ref.) kommt. **(A)** Variante c.1463+5G>A im Intron 11 des Patienten FSHD2-61. **(B)** Variante c.1957-3C>T im Intron 14 des Patienten FSHD2-130.

In einer semiquantitativen PCR-Analyse mit Auswertung am Bioanalyzer wurden die Größe der cDNA-Produkte für die Spleißvarianten erneut untersucht, um geringe Mengen des mutierten Transkripts nachweisen zu können. Für beide Patienten zeigte sich eine deutlich reduzierte Menge des Wildtyp-Allels. Bei dem Patienten FSHD2-61 konnte das mutierte Transkript in nur sehr geringen Mengen von ca. 1 % nachgewiesen werden. Bei Patient FSHD2-130 wurde das mutierte Allel in einer Menge von ca. 10 % anteilig zum wildtypischen Allel nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Form eines Histogramms in Abbildung 39 dargestellt. Ein solch geringer Anteil an alternativen Transkripten ist in der Sanger-Sequenzierung, wie in Abbildung 38 gezeigt, nicht zuverlässig nachweisbar. Bei beiden Pherogrammen ist allenfalls die Sequenz eines zweiten Transkripts zu ahnen.

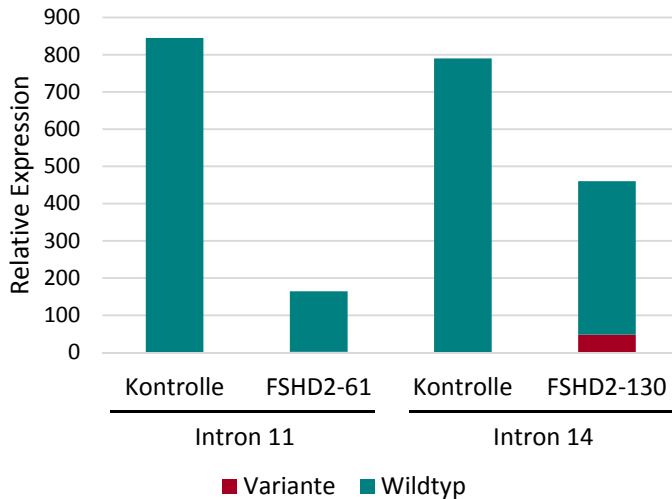


Abbildung 39: Spleißanalyse von *SMCHD1*-Varianten in einem semiquantitativen PCR-Assay. In dem Histogramm ist die relative Expression des wildtypischen Allels (blau) und des mutierten Allels (rot) jeweils des Patienten und einer gesunden Kontrolle gezeigt. Die Werte wurden gegen das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert.

3.2.1.5 Methylierung von *D4Z4*

Methylierungssensitiver Southern Blot

Es wurde ein methylierungssensitiver Southern Blot durchgeführt, um die Methylierung des proximalen *D4Z4*-Repeats an der *FseI*-Schnittstelle zu bestimmen. Dieser Test kann nicht zwischen den Allelen des Chromosoms 4q und 10q unterscheiden [Lemmers *et al.* 2012b]. Die Methylierung wurde für acht Indexpatienten und deren Familienangehörige durchgeführt (vgl. Stammbaum in Abbildung 34). Das Blot-Ergebnis und die daraus errechnete Methylierung sind in Abbildung 40 gezeigt. Der Southern Blot ergab eine Methylierung von $\leq 25\%$ für alle untersuchten Patienten mit einer potentiell pathogenen Variante in *SMCHD1*. Die Ergebnisse sind außerdem in Tabelle 28 in Abschnitt 3.2.3 aufgeführt.

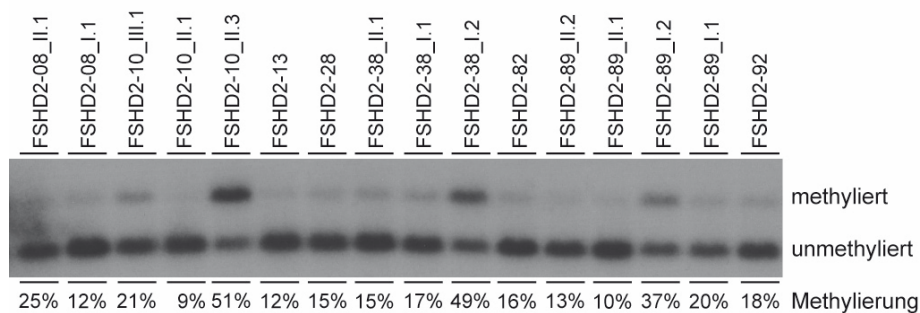


Abbildung 40: Methylierungssensitiver Southern Blot des proximalen *D4Z4*-Repeats. Untersucht wurden acht Indexpatienten und Angehörige. Der Blot zeigt jeweils zwei Banden pro Patient, eine methylierte und eine unmethylierte. Darunter ist jeweils die sich aus der Bandenintensität ergebene Methylierung in % angegeben.

Pyrosequenzierung Bisulfit-konvertierter DNA

Als alternative Methode zur Bestimmung der Methylierung der D4Z4-Region bei FSHD-Patienten wurde ein Assay auf der Basis einer Pyrosequenzierung Bisulfit-konvertierter DNA entwickelt. Dieser untersucht die Methylierung von neun CpGs innerhalb der DR1 Region [Hartweck *et al.* 2013] aller D4Z4-Einheiten auf den Chromosomen 4q und 10q gleichzeitig. Im Unterschied zum methylierungssensitiven Southern Blot (siehe vorigen Abschnitt) gibt dieser Assay demnach die durchschnittliche Methylierung aller internen Repeateinheiten wieder.

Zur Validierung des Methylierungsassays wurde dieser mit fünf Kontrollproben je in Duplikaten durchgeführt. Es ergab sich eine mittlere Differenz in der ermittelten Methylierung je CpG von $2,10 \pm 1,49$ %.

Der Assay wurde zunächst zur Ermittlung der Methylierung definierter Patientengruppen angewandt: 48 gesunde Kontrollen und 37 FSHD1-Patienten. In der Kontrollgruppe ergab sich eine Methylierung von 30 - 65 %, in der FSHD1-Gruppe von 14 - 64 %. Die Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ($p < 0,01$).

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen wurden die Patienten der Studie eingeteilt in FSHD2 (FSHD1-negativ, *SMCHD1*-Mutation), FSHD1+2 (FSHD1-positiv, *SMCHD1*-Mutation) und phänotypische FSHD Patienten (FSHD1-negativ, keine *SMCHD1*-Mutation). Für die FSHD2-Patienten ergab sich eine niedrige Methylierung von 5 - 27 %. Dieser Wert ist hoch signifikant verschieden von den gesunden Kontrollen ($p < 0,001$) und von den FSHD1-Patienten ($p < 0,001$). Für die wenigen Patienten mit Mutationen in beiden FSHD-Loci (FSHD1+2) ergaben sich Werte zwischen 13 und 49 % (siehe Tabelle 28, Abschnitt 3.2.3). Phänotypische FSHD-Patienten zeigten 31 - 74 % Methylierung, was im Bereich der gesunden Kontrollen liegt. Die Ergebnisse sind in Form eines Boxplot Diagramms in Abbildung 41 dargestellt. Die statistischen Daten der untersuchten Gruppen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

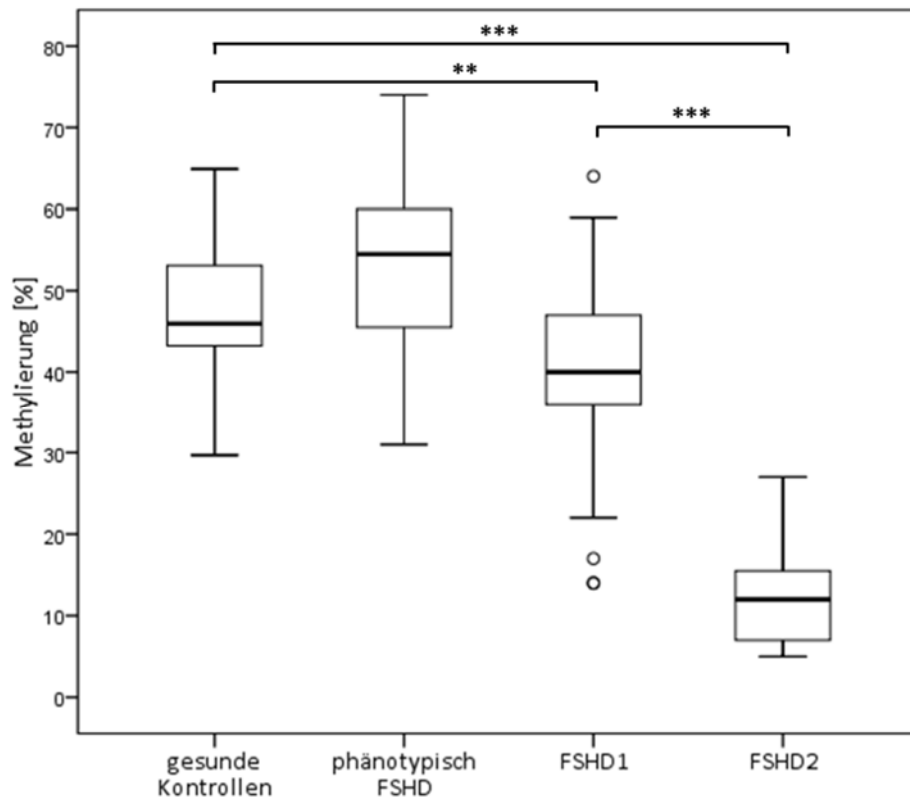


Abbildung 41: Boxplot Diagramm der Methylierungs-Ergebnisse des FSHD-Lokus. Die Methylierung wurde durch Pyrosequenzierung Bisulfit-konvertierter DNA ermittelt. Verwendet wurden die Werte der mittleren Methylierung von 9 CpGs je individueller Probe (gesunde Kontrollen: N = 48, phänotypisch FSHD: N = 48, FSHD1: N = 37, FSHD2: N = 20). Ausreißer sind als 'o' angegeben. Signifikanz: ** p < 0,01, ***p < 0,001.

Tabelle 24: Statistische Daten des Methylierungsassays.

	gesunde Kontrollen	phänotypisch FSHD	FSHD1	FSHD2*
Mittelwert	47,70	53,35	40,16	12,15
Standardabweichung	8,01	10,29	11,56	5,65
95 % Konfidenzintervall	45,37 - 50,02	50,36 - 56,34	36,31 - 44,07	9,51 - 14,79
Median	46,00	54,50	40,00	12,00
Minimum	30,00	31,00	14,00	5,00
Maximum	65,00	74,00	64,00	27,00
Stichprobenzahl	48	48	37	20*

*neben den 13 FSHD2 Patienten aus Gruppe A wurden für die Statistik 7 FSHD2 Patienten aus der Routinediagnostik mit einbezogen.

3.2.1.6 Segregationsanalysen bei FSHD2

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Familien mit FSHD2 untersucht. Für diese Familien sind die Stammbäume mit den relevanten Untersuchungsergebnissen in Abbildung 42 dargestellt. Die übrigen Patienten waren Einzelpatienten, über die keine weiteren Angaben zu der Vererbung und Ausprägung von Varianten innerhalb der Familien gemacht werden können.

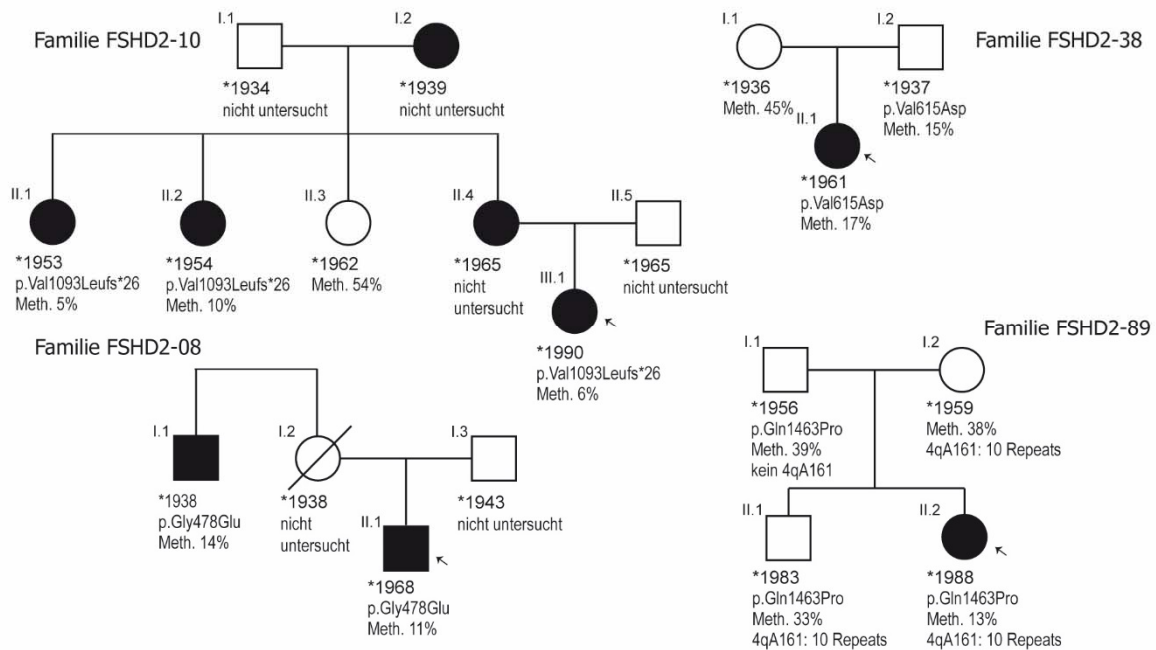


Abbildung 42: Stammbäume der FSHD-Familien. Für jeden Patienten sind das Geburtsjahr, die Variante in *SMCHD1*, die Methylierung von D4Z4 (Meth.) sowie relevante Ergebnisse des FSHD1 Southern Blots und der Haplotyp Analyse angegeben. Die Indexpatienten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Kreis: ♀, Quadrate ♂, weiß: gesund, schwarz: betroffen. Wenn nicht anders angegeben, liegt bei betroffenen Patienten der Haplotyp 4qA161 vor.

Für Familie FSHD2-10 liegen Patienten-Informationen über drei Generationen vor. Alle klinisch betroffenen Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigen eine Variante in *SMCHD1* und eine Methylierung von D4Z4 < 20 %. Der gleiche Befund findet sich bei Familie FSHD2-08. Über die Mutter des Indexpatienten (I.2) liegen keine Informationen vor, sie hat aber sehr wahrscheinlich die *SMCHD1* Variante an ihren Sohn vererbt.

Familie FSHD2-38 zeigt keine klassische dominante Vererbung. Der Indexpatient und der Vater (I.2) tragen die gleichen genetischen Varianten, wobei die Indexpatientin klinisch betroffen ist, der Vater jedoch gesund erscheint.

Bei Familie FSHD2-89 liegt sowohl eine FSHD1 als auch eine FSHD2 vor, die in der Familie segregieren, jedoch keinen dominanten Erbgang mit vollständiger Penetranz zeigen. Die Kontraktion von D4Z4 wurde von der Mutter (I.2) an die beiden Kinder vererbt, wobei Mutter und Sohn nicht erkrankt sind. Die potenziell pathogenen *SMCHD1* Variante wurde vom Vater (I.1) an beide Kinder weitergegeben. Dem Vater fehlt ein permissiver FSHD-Haplotyp, weshalb er nicht an FSHD2 erkrankt ist. Die beiden Kinder tragen die gleichen genetischen Varianten, wobei der Sohn (II.1) gesund ist und die Indexpatientin (II.2) erkrankt. Diese ist die einzige in der Familie, die eine Methylierung von D4Z4 < 20 % zeigt.

3.2.2 SMCHD1 und X-Inaktivierung

Das *SMCHD1*-Gen spielt laut Literatur eine wichtige Rolle bei der X-Inaktivierung (XI) bei weiblichen Mäusen [Blewitt *et al.* 2008]. Beim Menschen verläuft die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in der frühen Embryogenese nach dem Zufallsprinzip, so dass im Regelfall jedes der beiden X-Chromosomen in ca. 50 % der Körperzellen inaktiviert ist [Amos-Landgraf *et al.* 2006]. Abweichungen von der zufälligen X-Inaktivierung werden häufig in Zusammenhang mit einer klinischen Manifestation X-chromosomaler Krankheiten bei Frauen gebracht (Überblick bei Orstavik (2006)). Wenn Mutationen in *SMCHD1* die X-Inaktivierung beeinflussen, stellt sich die Frage, ob bei *SMCHD1*-Mutationsträgerinnen die X-Inaktivierung verändert ist. Umgekehrt kann spekuliert werden, ob Frauen mit einer nachgewiesenen verschobenen X-Inaktivierung evtl. Mutationen im *SMCHD1*-Gen tragen.

3.2.2.1 Patienten

Für die Untersuchung der X-Inaktivierung wurden zunächst 28 gesunde weibliche Kontrollen untersucht, um den Normalzustand darzustellen.

Für die weitere Charakterisierung der Funktion des *SMCHD1*-Gens wurden anschließend die weiblichen FSHD2-Patientinnen, welche im Abschnitt 3.2.1 identifiziert wurden, weitergehend untersucht. Zur Erhöhung der Stichprobengröße wurden drei weitere Patientinnen mit potenziell pathogenen Varianten im *SMCHD1*-Gen aus der Routinediagnostik mit einbezogen (FSHD2-R1 bis R3).

Die Ergebnisse der routinediagnostischen Untersuchungen der Patientinnen FSHD2-R1, -R2 und -R3 sind in der nachfolgenden Tabelle 25 zusammengestellt. Die Analysen wurden mit den gleichen Methoden durchgeführt, wie die Analysen im Rahmen dieser Arbeit.

Tabelle 25: Diagnostische Ergebnisse von FSHD2-Patientinnen aus der Routinediagnostik. Angegeben sind Daten und Vorhersagen zu Mutationen in *SMCHD1* und die Methylierung von D4Z4.

Patient	Mutations- typ	Exon	Transkript Koordinate	Protein Koordinate	(a) SIFT, (b) Mutation Taster, (c) PolyPhen-2, (d) UMD Predictor	Methylierung von D4Z4 [%]
FSHD2-R1	Deletion	Exon 15	c.1991_1992delTG	p.Val664Alafs*7	vorzeitiges Stopcodon an Position p.670-671TAG	-
FSHD2-R2	Missense	Exon 28	c.3529G>T	p.Asp1177Tyr	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (0,999) (c) wahrscheinlich schädigend (0,999/0,995) (d) pathogen (100)	6
FSHD2-R3	Missense	Exon 30	c.3815T>C	p.Ile1272Thr	(a) schädlich (b) krankheitsverursachend (0,979) (c) wahrscheinlich schädigend (0,963/0,444) (d) pathogen (93)	59

(-) keine Information

3.2.2.2 X-Inaktivierung bei gesunden Kontrollen und weiblichen FSHD2-Patientinnen

Die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei Frauen ist ein Mechanismus der Gendosis-Kompensation im Vergleich zu Männern. Die Inaktivierung geschieht nach dem Zufallsprinzip durch epigenetische Mechanismen, bei dem ein X-Chromosom durch Methylierung und daraus resultierende Chromatinkondensation für den Transkriptionsprozess unzugänglich gemacht wird. Die Methylierung wird zur Untersuchung der Aktivität genutzt, genauer gesagt, der Zustand eines polymorphen Mikrosatelliten des *AR*-Gens, wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben wurde. Der Assay lässt darauf schließen, in welchem Verhältnis die beiden Allele in dem untersuchten Gewebe aktiv sind. In der Normalbevölkerung zeigt sich eine Normalverteilung mit einem mittleren Verhältnis von 50:50. Ab einem Verhältnis von 20:80 bzw. 80:20 wird von einer verschobenen X-Inaktivierung gesprochen, bei der ein X-Chromosom deutlich häufiger aktiv ist, als das andere [Amos-Landgraf *et al.* 2006, Wutz 2011].

Der Zustand der X-Inaktivierung bei gesunden Frauen wurde für diese Arbeit bei 28 Proben untersucht. Die Daten sind graphisch in Abbildung 44 dargestellt. Sie bewegen sich zwischen Verhältnissen von 31,6 : 68,4 und 84,8 : 15,2.

Anschließend wurde der Zustand der X-Inaktivierung bei 14 weiblichen FSHD2-Patientinnen analysiert. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: *X-Inaktivierung bei weiblichen FSHD2-Patientinnen.* Für die beiden Allele 1 und 2 ist jeweils die Peakfläche des unverdauten (-) und des verdauten (+) Fragmentes angegeben. Aus den korrigierten Werten der verdauten Proben wurde das Verhältnis der aktiven Allele 1 und 2 zueinander berechnet.

Patient	Allel 1	Allel 2	Verhältnis der Aktivität von Allel 1 : Allel 2
1 FSHD2-10_III.1	120 (-) 311 (+)	145 (-) 85 (+)	75,2 : 24,8
2 FSHD2-10_II.1	86 (-) 159 (+)	105 (-) 0 (+)	100 : 0
3 FSHD2-10_II.2	109 (-) 0 (+)	89 (-) 133 (+)	0 : 100
4 FSHD2-13	769 (-) 0 (+)	323 (-) 193 (+)	0 : 100
5 FSHD2-28	316 (-) 0 (+)	271 (-) 323 (+)	0 : 100
6 FSHD2-38	111 (-) 0 (+)	100 (-) 84 (+)	0 : 100
7 FSHD2-61	283 (-) 181 (+)	209 (-) 187 (+)	56,7 : 43,3
8 FSHD2-82	176 (-) 43 (+)	137 (-) 45 (+)	55,1 : 44,9
9 FSHD2-89	397 (-) 202 (+)	- (-) - (+)	nicht informativ
10 FSHD2-130	178 (-) 103 (+)	152 (-) 43 (+)	73,7 : 26,3
11 FSHD2-131	183 (-) 0 (+)	111 (-) 89 (+)	0 : 100
12 FSHD2-R1	483 (-) 705 (+)	474 (-) 492 (+)	59,4 : 40,6
13 FSHD2-R2	869 (-) 113 (+)	682 (-) 112 (+)	56,2 : 43,8
14 FSHD2-R3	201 (-) 118 (+)	158 (-) 222 (+)	40,3 : 59,7

3.2.2.3 Statistische Analyse von gesunden Kontrollen und FSHD2-Patientinnen

Die Ergebnisse der X-Inaktivierung wurden zunächst auf Normalverteilung hin untersucht (Shapiro-Wilk-Test). Die Daten der gesunden Kontrollen zeigen eine Normalverteilung ($p = 0,489$), dagegen sind die Daten der FSHD2-Patientinnen nicht normalverteilt ($p = 0,032$).

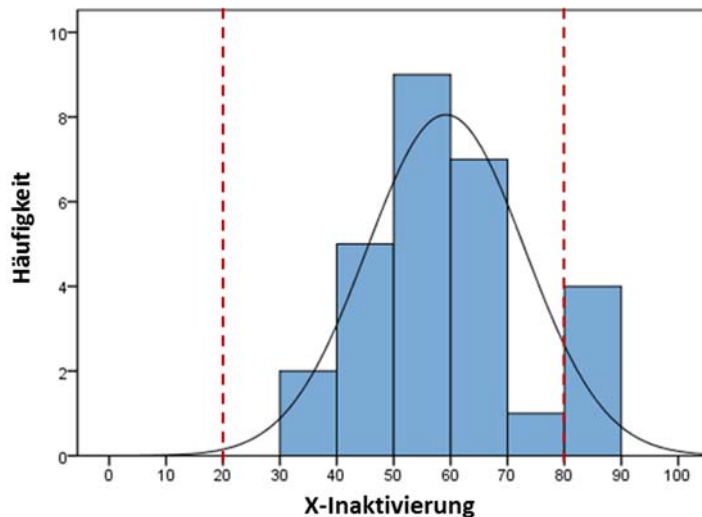


Abbildung 43: Verteilung der X-Inaktivierung bei gesunden Kontrollen. In dem Histogramm sind die Werte des jeweils ersten Allels dargestellt. Die Kurve gibt die statistische Normalverteilung der Werte an. Die gestrichelten roten Linien markieren den Grenzbereich der normalen X-Inaktivierung $> 20:80$ und $< 80:20$. $N = 28$, Mittelwert = 59,2, Standardabweichung = 13,9.

Der Mittelwert der X-Inaktivierung liegt bei den gesunden Kontrollen bei 59,2 mit einer Standardabweichung von 13,9. Die Daten der FSHD2-Patientinnen lassen sich nicht sinnvoll in einem Mittelwert ausdrücken, da sie scheinbar in zwei Gruppen clustern. Sechs der untersuchten Proben weisen ein Verhältnis der X-Inaktivierung von 0:100 oder 100:0 auf, eine Probe war durch Homozygotie des Locus nicht informativ, die übrigen Proben weisen eine normale Verteilung $> 20:80$ oder $< 80:20$ auf. Statistische Werte sind in Tabelle 27 zusammengestellt. Die Daten sind in Form eines kombinierten Bienenschwarm-Boxplot Diagramms in Abbildung 44 dargestellt.

Tabelle 27: Statistische Daten der Analyse der X-Inaktivierung.

	gesunde Kontrollen	FSHD2-Patientinnen
Mittelwert	59,2	39,7
Standardabweichung	13,9	35,5
Varianz	192,3	1260,0
Standardfehler	2,6	9,8
95 % Konfidenzintervall	53,8 – 64,5	18,3 – 61,2
Median	56,6	55,1
Minimum	31,6	0,0
Maximum	84,8	100,0
Stichprobenzahl	28	13

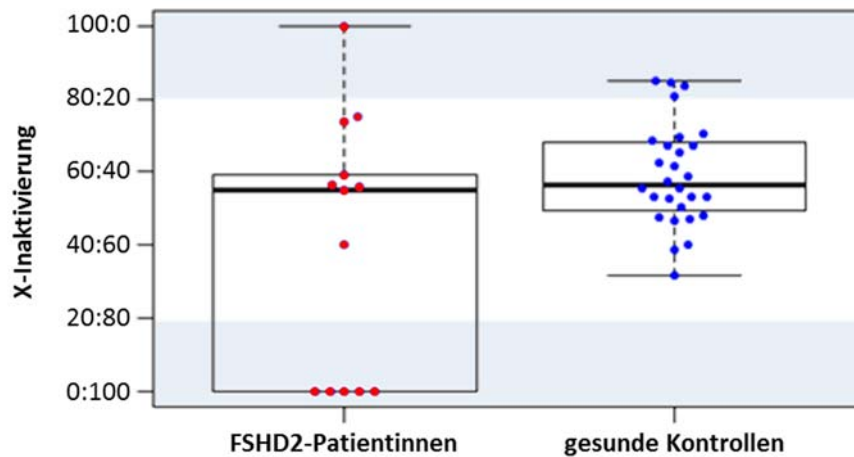


Abbildung 44: Graphische Darstellung der X-Inaktivierung bei FSHD2-Patientinnen und gesunden Kontrollen. Die Daten sind in einem kombinierten Bienenschwarm-Boxplot Diagramm dargestellt, welches sowohl die einzelnen Datenpunkte zeigt (FSHD2 in rot, Kontrollen in blau), als auch die statistische Verteilung der Daten. Die Werte außerhalb des normalen Bereichs der X-Inaktivierung ($> 80:20$ und $< 20:80$) sind durch einen hellblauen Hintergrund gekennzeichnet. Die XI der gesunden Kontrollen liegt normalverteilt um den Mittelwert 59,2 vor. Die Daten der FSHD2-Patienten sind nicht normalverteilt und clustern scheinbar in zwei Gruppen im Normalbereich und im Bereich einer völlig einseitigen Verschiebung.

Die statistische Analyse der Daten mit dem F-Test, welcher testet, ob sich die Varianz der beiden Stichproben signifikant voneinander unterscheidet, ergab ein hoch signifikantes Ergebnis ($p = 5.203 \times 10^{-5}$) für die beiden Gruppen.

3.2.3 FSHD2 Ergebnisse – Zusammenfassung

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2 für einen Gesamtüberblick zusammengefasst werden. In der unten stehenden Tabelle 28 sind die Daten für alle Patienten mit relevanten Ergebnissen zusammengetragen. Neben klinischen Informationen zu Geschlecht und Manifestation sind die hier erfassten genetischen Parameter zu der Länge des D4Z4 Repeats, der Methylierung von D4Z4 (ermittelt durch die Methoden Southern Blot und Pyrosequenzierung), Varianten in *SMCHD1*, das Ergebnis der RNA-Analyse (nur für FSHD2-61 und -130), eine Einteilung der Effekte der Mutation in das ORF erhaltende und das ORF zerstörende Varianten sowie die Analyse der X-Inaktivierung (für weibliche Patientinnen) angegeben.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der FSHD-Loci bei 12 Familien. Zusätzlich sind die Ergebnisse von drei Patientinnen aus der Routinediagnostik mit angegeben.

Patient	♂/♀	Klinischer Befund	D4Z4 Repeats	Methylierung [%]		Haplotyp	SMCHD1 Variante	RNA-Analyse	Mutations- X-Inaktivierung
				SB	Pyro				
1	♂	FSHD2	>10	25	11	4qA161	c.1433G>A	p.Gly478Glu	- P-ORF
	♂	FSHD2	>10	12	14	4qA161	c.1433G>A	p.Gly478Glu	-
2	♀	FSHD2	>10	21	6	4qA161	c.3276_3276+4del	p.Val1093Leufs*26	- D-ORF 75,2 : 24,8
	♀	FSHD2	>10	9	5	4qA161	c.3276_3276+4del	p.Val1093Leufs*26	- 0 : 100
	♀	FSHD2	>10	-	10	4qA161	c.3276_3276+4del	p.Val1093Leufs*26	- 100 : 0
	♀	normal	>10	51	54	4qA161	-	-	-
3	♀	FSHD2	>10	12	19	4qA161	c.3274_3276+1del	p.Lys1092del	- D-ORF 0 : 100
4	♀	FSHD2	>10	15	16	4qA161	c.4346G>A	p.Arg1449Lys	- P-ORF 0 : 100
5	♀	FSHD2	>10	15	17	4qA161	c.1844T>A	p.Val1615Asp	- P-ORF 0 : 100
	♀	normal	>10	49	45	4qA161	-	-	-
	♂	normal	>10	17	15	4qA161	c.1844T>A	p.Val1615Asp	-
6	♀	FSHD1+2?	6	20	49	4qA161	c.1957-3C>T	?	ca. 1 % D-ORF 56,7 : 43,3 mut-RNA
7	♀	FSHD2	>10	16	12	4qA161	c.4988T>G	p.Leu1663*	- D-ORF 55,1 : 44,9
8	♀	FSHD1+2	10	13	13	4qA161	c.4388A>C	p.Gln1463Pro	- P-ORF nicht informativ
	♂	normal	>10	10	33	4qA161	c.4388A>C	p.Gln1463Pro	-
	♀	normal	10	37	38	4qA161	-	-	-
	♂	normal	>10	20	39	kein 4qA161	c.4388A>C	p.Gln1463Pro	- P-ORF
9	♂	FSHD1+2	10	18	16	4qA161	c.4454C>T	p.Pro1485Leu	- D-ORF
10	♂	FSHD2	>10	-	8	4qA161	c.3274_3276+1del	p.Lys1092del	- D-ORF
11	♀	FSHD2	>10	-	27	4qA161	c.1463+5G>A	?	ca. 10 % D-ORF 73,7 : 26,3 mut-RNA
12	♀	FSHD2	>10	-	13	4qA161	c.328G>A	p.Ala110Thr	- P-ORF 0 : 100
13	♀	FSHD2	>10	-	-	-	c.1991_1992delTG	p.Val1664Alafs*7	- D-ORF 59,4 : 40,6
14	♀	FSHD2	>10	-	6	-	c.3529G>T	p.Asp1177Tyr	- P-ORF 56,2 : 43,8
15	♀	FSHD2	>10	-	59	-	c.3815T>C	p.Ile1272Thr	- P-ORF 40,3 : 59,7

♂männlich, ♀weiblich, (-) keine Information; P-ORF: erhält das ORF, D-ORF: zerstört das ORF (Einteilung der Mutationen nach Lemmers *et al.* (2015))

4 DISKUSSION

4.1 Projekt Myotone Dystrophie

Von der klinischen Seite her betrachtet ist die Myotone Dystrophie die zweithäufigste genetische Muskelerkrankung mit einer Inzidenz von ca. 2 : 8000 [Udd *et al.* 2006]. Der Phänotyp ist sehr variabel mit gemeinsamen charakteristischen Merkmalen. Von der genetischen Seite her betrachtet ist die Erkrankung heterogen und noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genetik der Myotonen Dystrophie unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten bearbeitet.

Im ersten Teil wurde eine Methode zum Nachweis der beiden bekannten Typen DM1 und DM2 in einem einzigen Ansatz etabliert. Wegen der großen Überlappung der klinischen Symptome werden häufig beide konventionelle Tests gemeinsam oder nacheinander als Stufendiagnostik angefordert. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Test bietet außerdem erstmals eine Möglichkeit zur Einzelmolekülanalyse der Repeatlänge, was vor allem für die DM2 von großem Interesse ist.

Das zweite Teilprojekt beschäftigt sich mit der Suche nach weiteren genetischen Ursachen der Erkrankung. Es wurde dabei nicht nach einem zusätzlichen kurzen GC-reichen Repeat in einem unbekanntem Gen gesucht. Der Arbeitshypothese liegt vielmehr der gemeinsame Pathomechanismus der beiden Typen 1 und 2 zugrunde, der die Möglichkeit nahelegt, dass ein Defekt in einem nachgeschalteten Gen die gleichen Auswirkungen haben könnte.

4.1.1 Molecular Combing DM-Test

Durch die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Sonden auf gleichmäßig gestreckte DNA-Moleküle werden im Molecular Combing DM-Test die Loci der beiden Erkrankungen (DM1 und DM2) sichtbar gemacht. Die Methode leitet sich ab von dem *fiber*-FISH Nachweis des DM2-Repeats von Sallinen *et al.* (2004) und dem Nachweis einer Repeaterkrankung mittels Molecular Combing, der für FSHD entwickelt wurde [Nguyen *et al.* 2011]. Im Folgenden soll diskutiert werden, was der hier entwickelte Test leisten kann und welche Anwendungsmöglichkeiten er mit sich bringt.

4.1.1.1 Beweis des Prinzips, Möglichkeiten und Grenzen

Das Molecular Combing als Methode bietet einige Möglichkeiten im Hinblick auf die Analyse der Repeatloci der Myotonen Dystrophien. Im Molecular Combing wird die gesamte genomische DNA von rund 50 Zellen des Patienten auf Einzelmolekülebene analysiert. Der begrenzende Faktor ist dabei hauptsächlich das optische Auflösungsvermögen des mikroskopischen Nachweises. Die DNA liegt mit einer konstanten Streckung von $1 \mu\text{m} = 2 \text{ kb}$ auf einer festen Oberfläche vor [Michalet *et al.* 1997]. Eine fluoreszenzmarkierte Sonde einer Länge von 1 kb ist bei einer 40fachen Vergrößerung als einzelner Punkt im mikroskopischen Bild erkennbar. Auch kürzere Sonden sind erkennbar, ihre

Länge ist jedoch durch die ermittelte Genauigkeit des Tests von $0,75 \pm 0,45$ kb nicht zuverlässig messbar. Abbildung 45 zeigt die genetischen Loci mit den Wiederholungseinheiten und den daraus resultierenden Repeatlängen im gesamten Krankheitsspektrum von DM1 und DM2. Sie soll veranschaulichen, welche Größenordnung und Spanne ein Test zum Nachweis der Erkrankungen abdecken muss. Die Normalallele beider Erkrankungen sind mit bis zu 111 bp für DM1 bzw. 120 bp für DM2 sehr kurz, die expandierten Elemente erreichen jedoch eine Länge bis zu 15 kb bei DM1 und sogar 44 kb bei DM2. Ein Nachweistest sollte diese enorme Größenspanne mit einer möglichst gleichmäßigen Genauigkeit abdecken.

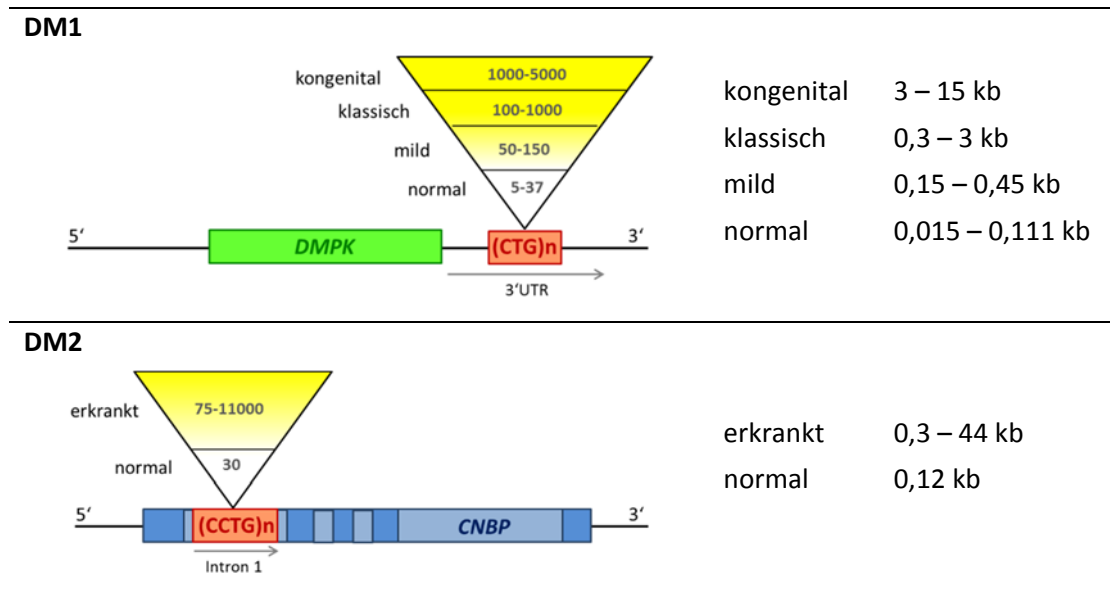


Abbildung 45: Schematische Darstellung der genetischen Loci von DM1 und DM2. Gezeigt ist die typische Länge der Repeatexpansion für gesunde Personen und für die verschiedenen Formen des Schweregrads. Rechts ist jeweils die theoretische Repeatlänge in kb angegeben. Im Molecular Combing sind erst Wiederholungseinheiten ab einer Länge von > 1 kb messbar.

Die molekulargenetische Standarddiagnostik der DM1 und DM2 wird, wie bereits in der Einleitung (1.4.4) erwähnt, in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wird über eine PCR-basierte Fragmentanalyse ermittelt, ob der Patient über ein oder zwei Normalallele des Krankheitslokus verfügt. Hier können Fragmente bis zu einer Länge von ca. 300 bp (bis ca. $(CTG)_{100}$) für DM1 und ca. 160 bp (bis ca. $(CCTG)_{40}$) ermittelt werden [IDMC 2000, Carson 2009]. Expandierte Allele werden im Southern Blot nachgewiesen, der jedoch ebenfalls seine Grenzen hat. Für die DM1 ist die Auswertung recht genau und die Aussagen zufriedenstellend, da auch expandierte Allele als mehr oder weniger diskrete Banden dargestellt werden. Es können sowohl Normalallele als auch expandierte Allele bestimmt werden, wobei die Genauigkeit der Größenbestimmung nach oben hin abnimmt. Außerdem müssen zwei Blots mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt werden, um die Größenbereiche für große und kleine Fragmente abdecken zu können.

Die Diagnostik der DM2 ist dagegen etwas weniger zufriedenstellend. Mit einem Southern Blot mit gespaltener genomischer DNA wird eine Sensitivität von lediglich 70-80 % erreicht. Ursache dafür ist die hohe somatische Instabilität des Locus [Day *et al.* 2003]. Durch die Verwendung der TP-PCR mit

anschließender Southern Blot Hybridisierung kann das Sensitivitätsproblem behoben werden. Dies führt jedoch dazu, dass keine scharfen Banden mehr im Blot erscheinen, sondern lediglich ein Schmier über einen weiten Bereich von Fragmentgrößen. Die Methode ermöglicht es, Normalallele und grenzwertige Allele von expandierten Repeats zu unterscheiden, eine Bestimmung der Repeatzahl ist jedoch nicht erreichbar. Im Gesamten betrachtet ist die DM-Diagnostik sehr aufwändig und langwierig. Es können jedoch die diagnostisch wichtigen Grundaussagen getroffen werden, ob ein Patient die typische Mutation trägt, oder nicht.

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Molecular Combing DM-Test ist es erstmals möglich geworden, die genetischen Loci von DM1 und DM2 in einem Ansatz darzustellen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Barcodes konnten die Loci zuverlässig unterschieden werden. Die Darstellung der Repeatsequenz selbst konnte durch die Verwendung von Oligo-Repeatsonden erreicht werden, welche neben DNA-Nukleotiden auch LNA-Nukleotide enthalten, um die Spezifität der Hybridisierung zu steigern. Die Repeatlänge kann daraufhin direkt gemessen und berechnet werden. Durch den Vergleich der erwarteten und der tatsächlichen Messwerte des Tests ergibt sich für die Berechnung der Repeatzahl für DM1 eine Genauigkeit von 265 ± 135 Repeateinheiten, für DM2 von 175 ± 125 Repeateinheiten. Das Beispiel des untersuchten DM1-Patienten zeigt, dass die Ergebnisse von Southern Blot und Molecular Combing gut übereinstimmen.

Für die Etablierung der Methode wurden lediglich Patientenproben mit einer großen Repeatexpansion verwendet. Deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein grenzwertig expandiertes Fragment von einem Normalallel unterschieden werden kann. Aufgrund der optischen Auflösung der Fluoreszenzsignale wird jedoch vermutet, dass dies nicht der Fall ist. Die untere Nachweisgrenze, sprich welche kleinste Expansion noch zuverlässig erkannt wird, wurde nicht ermittelt.

Die Genauigkeit des Southern Blots nimmt mit steigender Repeatlänge ab, im Molecular Combing ist sie oberhalb der Auflösungsgrenze gleichförmig und nach oben theoretisch nur durch die Kantenlänge des Deckgläschens begrenzt. Das Problem der Auflösung im unteren Bereich bleibt jedoch bestehen. Es ist denkbar, durch Optimierung der Probenvorbereitung im Molecular Combing und durch eine stärkere Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop diese Grenze nach unten zu verschieben. Durch die Verwendung von 20- bzw. 21-mer Sonden zur Detektion des Repeats selbst, ist es in der Theorie möglich, Allele jeder Größe zu detektieren. Dafür muss jedoch sowohl die Effizienz der Hybridisierung, als auch die Sensitivität der Sondendetektion erhöht werden, was technisch zurzeit noch nicht erreicht werden konnte.

Der Test selbst könnte dahingehend optimiert werden, dass durch die Verwendung einer weiteren Fluoreszenzfarbe, z.B. blau, die Unterscheidung der beiden Loci optisch weiter vereinfacht wird. Ein dreifarbiges Barcode wurde bereits für den Nachweis des FSHD-Repeats vorgestellt [Nguyen *et al.* 2011]. Das CCTG-Repeat in DM2 kann auch ein imperfektes Repeat sein und Unterbrechungen von GCTG, TCTG und TCTG enthalten [Liquori *et al.* 2003]. Diese Tatsache wurde bei dem Design der Sonden nicht berücksichtigt und könnte die Ursache für die teilweise nicht kontinuierliche Darstellung der Sonde sein. Wahrscheinlicher ist jedoch eine unvollständige Hybridisierung.

Der Arbeitsaufwand und Ablauf für das Molecular Combing ist relativ umfangreich und nur eingeschränkt flexibel. Die Methode erfordert eine gesonderte Probenvorbereitung zur Gewinnung besonders hochmolekularer DNA und feste Inkubationszeiten bei den Arbeitsabläufen. Die Zeitspanne zwischen Probeneingang und dem Vorliegen eines Ergebnisses benötigt mind. fünf Arbeitstage. Dem Molecular Combing fehlt es außerdem zurzeit noch an Robustheit, um als Routinemethode eingesetzt werden zu können [Larsen 2011].

4.1.1.2 Das expandierte Repeat bei DM2 – Anwendung und Ausblick

Mit der hier etablierten Anwendung ist es erstmals möglich, große Expansionen bei DM2-Patienten zu quantifizieren. Durch die Einzelmolekülanalyse konnte sowohl die Fragestellung nach der tatsächlichen Länge eines (CCTG)_n-Repeats als auch die Verteilung innerhalb verschiedener Zellen eines Patienten betrachtet werden. Es wurde bereits vermutet, dass das Repeat sehr instabil und damit somatisch heterogen ist. Day *et al.* (2003) beschreiben eine Streuung der Repeatlänge bei 70 % der Patienten, die im Southern Blot als multiple Banden oder Schmier sichtbar wird. Diese somatische Instabilität besteht nicht nur innerhalb eines Gewebes, sondern auch zwischen verschiedenen Geweben. In DM1-Patienten kann die Expansion im Muskel zwei bis 13x größer sein als in Lymphozyten [Thornton *et al.* 1994, Nakamori *et al.* 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von zwei Proben gezeigt werden, dass bei DM2-Patienten ein Mosaik von verschieden langen Repeatenheiten innerhalb eines Gewebes vorliegt. Für Patient DM2-a ist dies beispielhaft in Abbildung 46 dargestellt. Dieser Befund stimmt mit zuvor gemachten Beobachtungen überein [Nakamori *et al.* 2009].

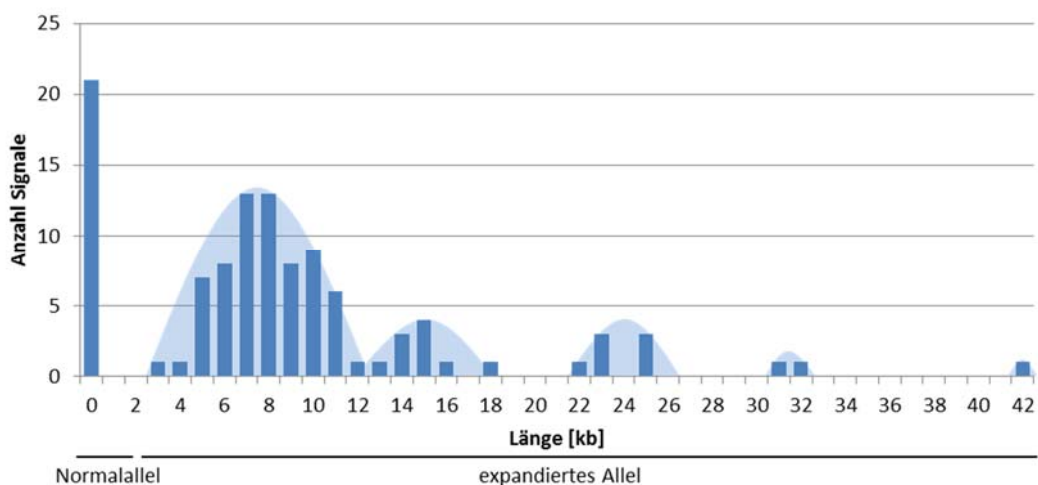


Abbildung 46: Darstellung der Repeatexpansion eines DM2 Patienten. Gezeigt ist das Histogramm der Repeatlängen von N = 109 Einzelmolekülen des Patienten DM2-a. Die hellblauen Kurven deuten die mosaikartige Verteilung der Länge des expandierten Repeats an.

Unter der Berücksichtigung der Auflösung und Genauigkeit des Molecular Combing stellt diese Methode für die genetische Diagnostik zurzeit keine echte Alternative zum Southern Blot dar. Zum Nachweis von Normalallelen und grenzwertigen Fragmenten muss nach wie vor eine

Fragmentanalyse durchgeführt werden. Ein praktischer Vorteil besteht jedoch in der Möglichkeit, beide Erkrankungen gleichzeitig untersuchen zu können und in der quantitativen Analyse von Einzelmolekülen.

Die Anwendung des Molecular Combing DM-Tests liegt (bisher) mehr auf der wissenschaftlichen Seite, im Hinblick auf den Nachweis sehr langer Repeats auf der Ebene einzelner Moleküle. Die Methode gibt einen realen Einblick in das Genom, was für DM2 bislang nicht möglich war. Damit könnten Fragen nach der Instabilität des Lokus in verschiedenen Geweben, in unterschiedlichem Alter und zwischen den Generationen beantwortet werden. Erst mit dem Befund, dass ein bestimmter Sachverhalt vorliegt, kann danach gefragt werden, wie dieser zustande kommt und warum. Für DM1 ist bereits das Phänomen der Antizipation beschrieben worden [Hunter *et al.* 1992]. Für DM2 wurde der Nachweis mangels geeigneter Nachweismethoden bislang nicht erbracht. Das Molecular Combing bietet eine Möglichkeit, diese Fragestellungen zu bearbeiten.

4.1.2 Analyse von Kandidatengenens als alternative Ursache von DM

Das Krankheitsbild der Myotonen Dystrophie ist sehr heterogen, weshalb es schwerfällt, einen genauen Anteil an Patienten zu benennen, die zwar den DM Phänotyp zeigen, jedoch nachweislich keine bekannte Mutation tragen. Mit Sicherheit gibt es jedoch diese Patienten, allerdings fehlen noch Hinweise auf die genetische Ursache deren Erkrankung [Udd *et al.* 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen in Genen, welche mit dem Pathomechanismus der DM assoziiert sind, einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen könnten.

4.1.2.1 Die untersuchten Gene im Zusammenhang mit der Myotonen Dystrophie

Die typische Repeatexpansion in DM1 Patienten liegt in der 3' untranslatierten Region des *DMPK*-Gens, was zunächst einmal keine Einschränkung in der Funktion des Proteins vermuten lässt, da die Mutation keine direkte Auswirkung auf das Protein hat [Brook *et al.* 1992, Fu *et al.* 1992, Mahadevan *et al.* 1992]. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich dennoch durch die Verminderung der Transkriptionsrate [Davis *et al.* 1997] ein Effekt auf den Phänotyp auswirkt. Wenn also eine Verminderung der Menge an verfügbarem DMPK-Protein mögliche phänotypische Folgen hat, könnte der gleiche Effekt auch durch andere, funktionsmindernde Mutationen in dem Gen hervorgerufen werden. Das *DMPK knock-out* Mausmodell zeigt zwar keine deutlichen Hinweise auf einen direkten Einfluss des Gens auf den Phänotyp der DM, eine Mitwirkung konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden [Jansen *et al.* 1996].

Das gleiche gilt für das *CNBP*-Gen der Myotonen Dystrophie 2, wo die typische Expansion in einer intronischen Sequenz vorliegt [Liquori *et al.* 2001]. Eine verminderte CNBP-Proteinmenge wurde bei DM2-Patienten gezeigt [Raheem *et al.* 2010]. Die Struktur des Gens als Zinkfinger-Protein weist nicht auf den ersten Blick auf eine Funktion in der Muskulatur hin, im Mausmodell ruft jedoch die Haploinsuffizienz des Proteins typische DM-Symptome hervor [Chen *et al.* 2007]. Es ist demnach durchaus denkbar, dass funktionsmindernde Mutationen in *CNBP* einen DM-ähnlichen Phänotyp auch beim Menschen hervorrufen können.

Wie in der Einleitung (1.4.3) erläutert, spielen die Gene *CELF1* und *MBNL1* eine tragende Rolle auf der sekundären Ebene des Pathomechanismus, da sie mit den expandierten RNAs von *DMPK* und *CNBP* interagieren. Verursacht durch die Repeatexpansion liegt bei DM-Patienten eine gesteigerte Funktion von *CELF1* vor [Timchenko *et al.* 1996], wodurch zu vermuten wäre, dass Funktionsgewinn-Mutationen in dem Gen, genauso wie die Überexpression im Mausmodell [Timchenko *et al.* 2004], für einen DM-ähnlichen Phänotyp verantwortlich sein könnten.

MBNL1 dagegen liegt in DM-Patienten in verminderter Menge vor, was gleichzeitig eine verminderte Funktion des Proteins bedeutet [Miller *et al.* 2000]. Es wären also Funktionsverlust-Mutationen zu erwarten, welche DM-Symptome verursachen, wie es auch das *MBNL1 knock-out* Mausmodell zeigen konnte [Kanadia *et al.* 2003].

Aufgrund der eben erläuterten Mechanismen wurden die vier beschriebenen Gene in der vorliegenden Arbeit auf Mutationen in Patienten mit Symptomen der Myotonen Dystrophie untersucht, um abzuklären, ob Defekte in diesen Genen für einen ähnlichen Phänotyp der Erkrankung („DM3“) verantwortlich sein könnten.

Bei der Sequenzierung von *DMPK* und *CNBP* bei 90 Patienten fiel eine seltene Variante im *DMPK*-Gen auf. Das *CNBP*-Gen zeigte keine Auffälligkeiten. Bei der Analyse von *CELF1* und *MBNL1* in 138 Patienten waren keine auffälligen Varianten in dem *CELF1*-Gen zu beobachten. Es zeigten sich aber drei potentiell pathogene Varianten in *MBNL1*. Im Folgenden sollen die auffälligen Varianten interpretiert und diskutiert werden.

4.1.2.2 Potentiell pathogene Varianten im *DMPK*-Gen

Bei der Sequenzierung des *DMPK*-Gens bei 90 Patienten fiel eine seltene Variante auf. Der Aminosäureaustausch p.Ser308Cys in Patient DM3-173 wird von den Vorhersageprogrammen nicht eindeutig beurteilt, die Vorhersagen reichen von pathogen bis zu toleriert (siehe Tabelle 15 in Abschnitt 3.1.2.2). Die Variante ist als rs149803658 beschrieben und wird mit einer allgemeinen MAF von 0,1 % angegeben [ESP 2015, ExAC 2015]. Die Konservierung des betroffenen Nukleotids und der Aminosäure sind moderat. Auffällig ist jedoch die Lage der Variante innerhalb einer konservierten Domäne des Proteins. Sie liegt innerhalb der funktionsbestimmenden Serin-/Threonin-Kinase-Domäne (p.71-339) [Bush *et al.* 2000], was in Abbildung 47 gezeigt ist. Es ist daher denkbar, dass die Funktion der Domäne durch die Mutation beeinträchtigt wird.

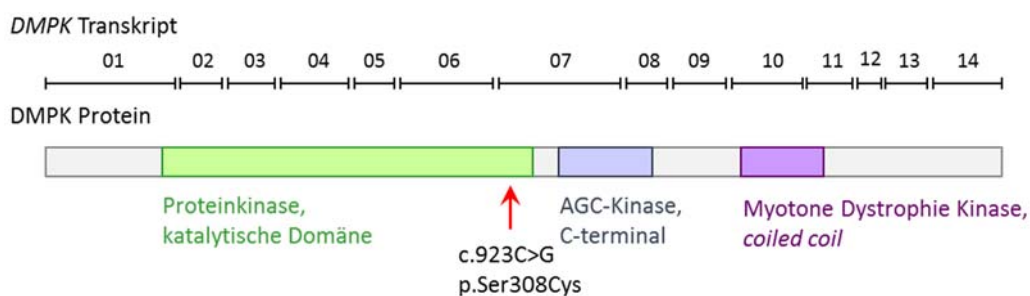


Abbildung 47: Das *DMPK*-Gen mit seinen funktionellen Domänen. Das Gen (NM_001081563.2) ist mit seinen 14 codierenden Exons und das Protein (NP_001075032.1) mit den drei konservierten Domänen (grün, blau, lila) dargestellt. Die Position der hier gefundenen Variante in Exon 7 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.1.2.3 Mutationen im *MBNL1*-Gen

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie wurden unter 138 Patienten drei potenziell pathogene Varianten in dem Gen *MBNL1* identifiziert, die im Folgenden näher diskutiert werden sollen.

Das *MBNL1*-Gen kodiert für ein RNA-bindendes Protein, wobei die spezifische Bindung der Target-RNAs über vier Zinkfingerdomänen erreicht wird, welche tandemartig angeordnet sind. Eine schematische Darstellung des Gens und Proteins mit seinen konservierten Regionen findet sich in Abbildung 48. Die Lokalisierung der gefundenen Varianten ist ebenfalls dargestellt, sie liegen am Anfang, in der Mitte und am Ende des Proteins.

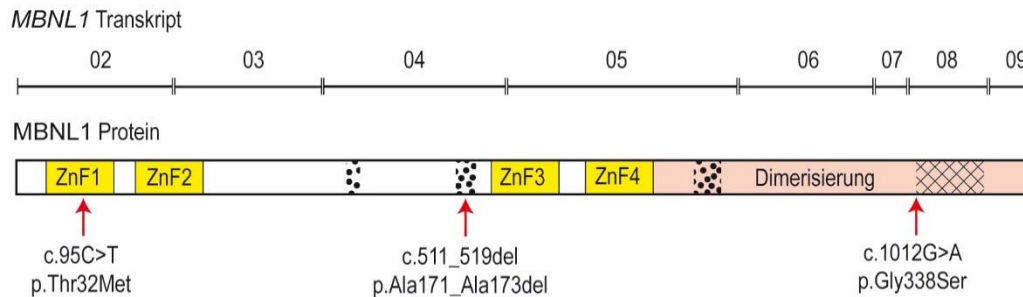


Abbildung 48: Schematische Darstellung des *MBNL1*-Gens und Proteins. Gezeigt sind das Haupttranskript (NM_021038.3) mit den acht codierenden Exons 2-9 und das Protein (NP_066368.2) mit den funktionellen Domänen und konservierten Regionen. Dieses enthält vier Zinkfinger Domänen (ZnF1-4, gelb), eine Dimerisierungsdomäne (rosa), Alanin-reiche Regionen (gepunktet) und eine Serin/Threonin-reiche Region (kariert). Die Position der gefundenen Varianten ist durch Pfeile markiert.

Variante p.Thr32Met von Patient DM3-192 führt zu einem Aminosäureaustausch innerhalb der ersten Zinkfinger Domäne (ZnF) des *MBNL1*-Proteins. *MBNL1* verfügt über vier konservierte CCHC Zinkfinger-Domänen, welche durch die Exons 2, 3 und 5 codiert werden (siehe Abbildung 48). Die Funktion der ZnFs liegt in der spezifischen Bindung von GC-Dinukleotiden innerhalb einzelsträngiger RNA [Teplova und Patel 2008, Cass *et al.* 2011]. In einer Arbeit von Edge *et al.* (2013) wird beschrieben, dass *MBNL1* erstaunlich tolerant gegenüber Mutationen in einzelnen ZnFs ist, treten jedoch Mutationen innerhalb ZnF1 und 2 gemeinsam auf, so ist dies höchst schädlich. Die hier beschriebene Variante ist als rs185894411 beschrieben, mit einer MAF von 0,004 % [ExAC 2015]. Die Pathogenität wird von den Vorhersageprogrammen als moderat hoch eingeschätzt, das betroffene Nukleotid und die Aminosäure sind evolutiv moderat konserviert (siehe Tabelle 16). Innerhalb eines Zinkfingermotifs koordinieren drei Cystein-Reste und ein Histidin-Rest das Zink-Atom. Die hier beschriebene Variante ist zwischen dem zweiten und dritten Cystein in einem 3_{10} -Helix Element lokalisiert. In einem 3D-Model der ersten beiden Zinkfinger, erzeugt mit Swiss-Model [Biasini *et al.* 2014] basierend auf der bekannten Kristallstruktur der *MBNL1* Tandem ZnF1 und 2 Domäne (PDB: 3D2N [Teplova und Patel 2008]), wurden der Wildtyp und die Variante p.Thr32Met miteinander verglichen. Dabei waren zwei Veränderungen sichtbar: eine Veränderung in der Tertiärstruktur des Proteins aufgrund des Aminosäureaustausches an Position 32 und eine Verschiebung der Hydrophobizität der Region (siehe Abbildung 32, Abschnitt 3.1.2.5). Diese Änderungen von Konformation und Eigenschaften des Zinkfingers können möglicherweise seine Funktion beeinträchtigen, insbesondere die Interaktion mit Target-RNAs.

Die Variante c.511_519del resultiert in einer Deletion von drei Alanin-Resten innerhalb einer Alanin-reichen Sequenz in der Linker-DNA von Exon 4 zwischen den beiden ZnF-Paaren. Dieser Linker sorgt

für die nötige Flexibilität des Proteins für die Bindung einer großen Zahl von Target RNAs [Cass *et al.* 2011]. Die vorgestellte Variante ist sowohl in der ESP (2015) als auch in der ExAC (2015) Datenbank zu finden, mit einer Frequenz von 0,02 % (siehe Tabelle 16). Es ist möglich, dass die Verkürzung dieses Alanin-Stretches von sieben auf vier Reste die Flexibilität des Linkers herabsetzt und damit die Bindung von Target RNAs beeinträchtigt.

Die Variante p.Gly338Ser liegt ganz am Ende der Aminosäurekette des MBNL1-Proteins innerhalb einer Serin-Threonin-reichen Sequenz. Die Variante ist in keiner öffentlichen Datenbank aufgeführt. Das Nukleotid ist moderat konserviert und die Vorhersageprogramme stimmen in einer hohen Pathogenität für den Austausch überein (siehe Tabelle 16). Über die Funktion der C-terminalen Region des MBNL1-Proteins ist bislang wenig bekannt, auch wenn die Sequenz hoch konserviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass sich MBNL1 in Dimeren organisiert und die Interaktion mit sich selbst dabei durch die C-terminale Region (p.239–382) vermittelt wird [Yuan *et al.* 2007]. Die beschriebene Variante ist in dieser Region lokalisiert und es ist daher möglich, dass dadurch die Dimerisierung und damit die Funktion des Proteins beeinträchtigt werden.

4.1.2.4 Funktionelle Analysen von MBNL1

In der vielfältigen Literatur zu dem Thema Myotone Dystrophie, fällt MBNL1 eine bedeutende Rolle im Pathomechanismus der Erkrankung zu [Meola und Cardani 2015]. Verschiedene Studien haben sich mit den Effekten des Verlustes von MBNL1 auf der molekularen sowie auf der phänotypischen Ebene befasst [Kanadia *et al.* 2003, Lin *et al.* 2006, Osborne *et al.* 2009, Du *et al.* 2010]. In einer Arbeit von Du *et al.* (2010) wurden zwei Mausmodelle miteinander verglichen, wobei das erste Modell eine (CUG)_n-Expansion exprimiert und in dem zweiten Modell ein *knock-out* von *mbnl1* vorliegt. In beiden Modellen zeigte sich eine stark gestörte RNA-Expression, die sich hauptsächlich in Form von Spleißdefekten äußerte. Ein Anteil von > 80 % dieser Defekte ist auf den Verlust der Funktion von *mbnl1* zurückzuführen. Dieser Befund spricht dafür, dass auch ein auf andere Weise verursachter Mangel an MBNL1 einen DM-Phänotyp erzeugen könnte.

In verschiedenen Publikationen ist der Spleißdefekt *ex vivo* in Muskelgewebe von DM-Patienten gezeigt worden (Übersicht bei Ranum und Cooper (2006)). Von den Patienten in dieser rückwirkend angestellten Studie war jedoch kein Muskelgewebe zugänglich. Lediglich von einem der identifizierten Patienten mit einer Variante in *MBNL1* (DM3-192) waren Blutproben für RNA-Isolierung und Spleißanalysen verfügbar. Daran sollten die Spleißprodukte der Target-Gene quantitativ untersucht werden, wobei erwartet wurde, dass es im Vergleich zwischen gesunden Kontrollen und DM-Patienten zu einer Verschiebung des adulten Spleißmusters hin zu einem fetalen Spleißmuster kommen würde.

In einem semiquantitativen Ansatz wurden in dieser Arbeit Unterschiede in dem Expressionslevel der MBNL1-Targetgene *MBNL1*, *MBNL2*, *CAPN3*, *SPAG9*, *PPP2R5C* und *ATP2A2* (*SERCA2*) gefunden. Jedoch konnte keine Umlagerung des Spleißmusters von einem adulten zu einem fetalen Zustand beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Gewebespezifität des Spleißmusters sein. Es ist nichts über Spleißereignisse im Blut bekannt, da alle veröffentlichten Beobachtungen in

pathologisch betroffenen Geweben gemacht wurden. Für das Screening von Spleißereignissen wird daher die Verwendung von Muskelproben empfohlen [Nakamori *et al.* 2013].

Hinsichtlich der Spezifität der Spleißeffekte wird jedoch kontrovers diskutiert, ob Spleißveränderungen überhaupt DM-spezifisch sind oder ob sie einen generalisierten Effekt in Neuromuskulären Erkrankungen darstellen. So zeigten Nakamori *et al.* (2013) in einem Spleiß-Array eine Vielzahl von Missspleißereignissen in den Myotonen Dystrophien 1 und 2, jedoch kein einziges Ereignis in FSHD. Alle Effekte in DM1 waren zudem auch in DM2-Patienten vorhanden. Bachinski *et al.* (2014) dagegen fanden ebenfalls über einen Array, dass viele Expressions- und Spleißveränderungen auch bei anderen Neuromuskulären Erkrankungen auftreten. Sie verglichen in ihrer Studie DM Patienten mit DMD-, BMD- und TMD- (Tibiale Muskeldystrophie) Patienten und fanden, dass sich die meisten Expressionsänderungen nicht zwischen DM und anderen Neuromuskulären Erkrankungen unterscheiden. Sie räumten jedoch ein, dass die Verlässlichkeit des verwendeten Exon-Array-Systems begrenzt ist, da verschiedene bekannte und validierte Spleißeffekte nicht wiedergefunden wurden. Dennoch ist dieser Befund ein Hinweis darauf, dass einige der Veränderungen auf sekundäre kompensatorische Mechanismen in Muskelerkrankungen allgemein zurückzuführen sein könnten [Udd und Krahe 2012].

Nakamori *et al.* (2013) zeigten außerdem, dass Spleißereignisse im Menschen bei 12 von 50 untersuchten Genen in keinem Tiermodell wiedergefunden werden konnten. Dies zeigt deutlich, dass die Modellsysteme den tatsächlichen Zustand im Menschen nicht vollständig wiedergeben und dies bei der Interpretation der Daten immer berücksichtigt werden muss.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Spleißanalysen zeigen einen deutlichen Unterschied in der Expressionsstärke der Transkripte zwischen gesunden Kontrollen und allen Patienten mit einer Muskelerkrankung. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass der analysierte MBNL1-Patient in die Gruppe der Neuromuskulären Erkrankungen einzuordnen ist und nicht in die gesunde Kontrollgruppe. Es war jedoch nicht möglich, den erwarteten Wechsel von einem adulten zu einem fetalen Spleißmuster zu zeigen, weder in dem MBNL1-Patienten, noch in DM2-Patienten.

Die meisten phänotypischen und molekularen Effekte wurden bislang an homozygot mutierten Modellen untersucht [Kanadia *et al.* 2003]. In dieser Arbeit wurden jedoch heterozygote Varianten gefunden. Die Arbeit von Jog *et al.* (2012) zeigt eindrücklich, dass der Spleißeffekt von MBNL1 dosisabhängig ist und von der Menge aktiver Proteine abhängt. Sie bewiesen einen graduellen Wechsel zwischen den Spleißprodukten in Abhängigkeit von der MBNL1-Konzentration. Die verschiedenen Target-Gene weisen dabei eine individuelle Empfindlichkeit auf, wobei bereits ein Level von 50 % einen deutlichen Effekt auf manche Gene hatte. Das Spleißmuster wechselt von einem adulten Muster in ein fetales Muster, in Abhängigkeit von der Rate der MBNL1-Aktivität. Dies bedeutet, dass auch ein gradueller Verlust der MBNL1-Aktivität bereits einen funktionellen Effekt erzeugen kann.

4.1.2.5 *Muscleblind* Proteine im Pathomechanismus der Myotonen Dystrophie

Neben *MBNL1* existieren im menschlichen Genom zwei weitere homologe *muscleblind* Gene – *MBNL2* (MIM *607327) auf Chromosom 13 und *MBNL3* (MIM *300413) auf Chromosom X. Sie unterscheiden sich untereinander in ihrer Expression und spezifischen Funktion, die allgemein in der gewebespezifischen Regulation des RNA-Metabolismus besteht. *MBNL1* und *MBNL2* werden ubiquitär in adulten Geweben exprimiert, *MBNL1* besonders in der Skelett- und Herzmuskulatur, *MBNL2* vorwiegend im Gehirn. Dagegen ist die Expression von *MBNL3* eingeschränkter und findet in der Placenta, während der Embryonalentwicklung und bei verletzungsbedingter Muskelregeneration statt. Die Gene zeigen eine große Sequenzhomologie (siehe Abbildung 49), eine ähnliche genomische Organisation und ähnliche Spleißformen [Fardaei *et al.* 2002, Poulos *et al.* 2013].

Alle drei *muscleblind*-Proteine haben eine hohe Bindungsfähigkeit von (C/CUG)_{exp} RNA. Wie *MBNL1* colokalisieren auch die beiden homologen Proteine mit den Repeat-Foci in DM1- und DM2-Patienten. *MBNL1* kontrolliert den Wechsel von einem fetalen zu einem adulten Spleißmuster im Muskel, wohingegen *MBNL2* die gleiche Funktion im Gehirn einnimmt. Für *MBNL3* wird eine antagonistische Wirkung zu *MBNL1* vermutet, welche die Muskelentwicklung hemmt [Fardaei *et al.* 2002, Squillace *et al.* 2002, Holt *et al.* 2009].

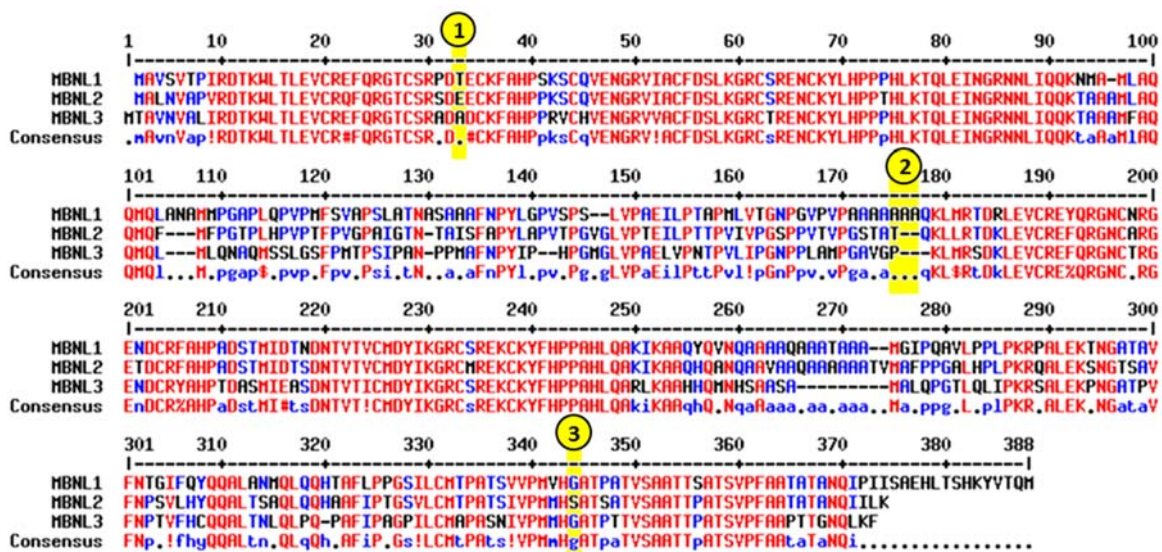


Abbildung 49: Alignment der Sequenz der *muscleblind*-Proteine. Dargestellt sind die Proteinsequenzen von humanem *MBNL1* (NP_066368), *MBNL2* (NP_659002) und *MBNL3* (NP_060858) und darunter die Konsensus-Sequenz. Die drei Proteine zeigen eine große Sequenzhomologie. Sequenzen mit hohem Konsens sind in rot, mit niedrigem Konsens in blau und ohne Übereinstimmung in schwarz dargestellt. Die drei in dieser Arbeit identifizierten Varianten – (1) p.Thr32Met, (2) p.Ala171_Ala173del und (3) p.Gly338Ser – sind gelb unterlegt. (Grafik erzeugt mit MultAlin [Corpet 1988])

Das Alignment der drei homologen Proteine in Abbildung 49 zeigt, dass sich die gefundenen *MBNL1*-Sequenzvarianten in allen drei Fällen auf Aminosäuren beziehen, bei denen kein Konsens zwischen den drei homologen Proteinen besteht. Innerhalb des *MBNL1*-Proteins sind die

Aminosäuren in verschiedenen Spezies jedoch konserviert (vgl. Abschnitt 4.1.2.3). Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass die Reste eine für MBNL1 spezifische Funktion erfüllen.

Die *knock-out* Mausmodelle MBNL1^{-/-}, MBNL2^{-/-} und MBNL3^{-/-} zeigen alle einen Phänotyp mit DM-relevanten Eigenschaften wie Myotonie, Myopathie und Katarakt [Kanadia *et al.* 2003, Hao *et al.* 2008, Poulos *et al.* 2013]. Lee *et al.* (2013) konnten zeigen, dass MBNL1 und MBNL2 eine kompensatorische Wirkung haben. So findet sich bei dem Verlust von MBNL1 ein deutlicher Anstieg in der MBNL2 Expression, welcher den Spleißdefekt wenigstens teilweise ausgleichen kann. Mbnl1^{-/-} - Mbnl2^{-/-} doppel-*knockout* Mäuse sind embryonal letal, was für eine wichtige Funktion der beiden Proteine spricht.

Der heterozygote Zustand der hier gefundenen MBNL1 Varianten lässt im Hinblick auf den kompensatorischen Effekt von MBNL2 nur Spekulationen dahingehend zu, ob die Varianten eine Auswirkung auf den Phänotyp haben. Die durchgeführten Spleißanalysen zeigen, dass die MBNL2 Expression des MBNL1-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich vermindert ist. Dieser Befund spricht nicht für einen kompensatorischen Effekt. Wie bereits unter 4.1.2.4 erläutert, ist die Interpretation der Spleißanalysen aufgrund einer möglichen Gewebespezifität nur eingeschränkt möglich.

4.1.2.6 Differenzialdiagnose - Muskelpanel

Die drei Patienten, bei denen eine potenziell pathogene Variante in *MBNL1* gefunden wurde, wurden zu Zwecken der Differenzialdiagnostik weiter untersucht. Es wurden im Rahmen eines Multi-Genpanels 37 Gene, welche mit Muskelerkrankungen in Zusammenhang stehen, untersucht. Bei keinem der drei Patienten wurde eine auffällige Variante in einem der 37 Gene gefunden. Dieser Befund schließt andere, häufige Ursachen von Muskeldystrophien aus.

4.1.2.7 *MBNL1*-Mutationen als Ursache für DM - Schlussfolgerung und Ausblick

Die Myotonen Dystrophien sind multifaktorielle Erkrankungen, in denen verschiedene Organsysteme betroffen sind. Der Pathomechanismus ist sehr komplex mit der Repeatexpansion in seinem Zentrum. Auch wenn MBNL1 für einen Großteil der molekularen Effekte verantwortlich zu sein scheint, so wirken mit Sicherheit auch die anderen hier beschriebenen Faktoren an dem DM-Phänotyp mit. Bei einem Defekt in dem *MBNL1*-Gen wäre demnach zu erwarten, dass zwar ein Großteil der Effekte wiedergefunden wird, der Phänotyp könnte sich jedoch durchaus von der bekannten DM unterscheiden.

Aus den hier gefundenen Ergebnissen lässt sich keine eindeutige abschließende Aussage über die Wirkung der gefundenen Varianten in *MBNL1* treffen. Es ist möglich, dass sie tatsächlich für die Symptomatik der drei Patienten ursächlich sind, es könnte sich aber auch um tolerierte Varianten ohne Relevanz für den DM-Phänotyp handeln. Die Tatsache, dass in der untersuchten Kohorte von 138 Patienten *MBNL1*-Varianten in drei Patienten identifiziert wurden, ist jedoch verdächtig. Die

vorliegende Arbeit bestätigt *MBNL1* daher als ein vielversprechendes Kandidatengen für eine alternative Ursache der Myotone Dystrophie, der abschließende Beweis konnte bislang jedoch noch nicht erbracht werden.

Es sind verschiedene weiterführende Analysen denkbar, um der Frage nach der Pathogenität weiter nachzugehen. Die Zugänglichkeit von Untersuchungsmaterial und die damit verbundene Auswahl der Zielgene für funktionelle Analysen schränken die möglichen Experimente ein. Die Untersuchung von RNA aus Muskelgewebe der identifizierten Patienten würde ein besser vergleichbares Ergebnis zu den literaturbekannten Daten liefern. Ein Spleiß-Array würde einen breiten Überblick über die Spleißereignisse geben, anstatt nur einzelne Gene zu untersuchen. Die Protein-Analyse der gefundenen Varianten über eine native PAGE (Polyacrylamidgel-Elektrophorese) und anschließenden Western Blot könnte einen Pathogenitätsnachweis erbringen, z.B. im Hinblick auf eine Störung der Dimerisierung, wie sie bei der Variante p.Gly338Ser vermutet wird. Die gefundenen Varianten könnten außerdem durch Mutagenese in einem *in vitro* Spleiß-Assay eingebracht werden, in dem der Spleißeffekt auf „Mini-Target-Gene“ geprüft werden könnte [Jog *et al.* 2012]. Auch das Einbringen der gefundenen Varianten in ein Tiermodell, wie den Zebrafisch mit dem CRISPR-Cas9-System wäre denkbar. Eine Segregationsanalyse bei Verwandten der betroffenen Patienten würde die Frage nach dem Vererbungsmodus weiter beleuchten. Außerdem könnte die Kohorte der analysierten Patienten weiter vergrößert werden, um möglicherweise weitere positive Kandidaten zu identifizieren. Die soeben vorgestellten Möglichkeiten übersteigen jedoch leider aus Material-limitierenden oder zeitlichen Gründen den Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die erbrachten Ergebnisse regen jedoch hoffentlich zukünftige Untersuchungen in diese Richtung an.

4.2 Projekt FSHD

Die FSHD ist die dritthäufigste Neuromuskuläre Erkrankung mit einer Inzidenz von 1 : 20000 Neugeborenen. Sie kann klinisch durch einige typische Charakteristika recht gut von anderen Muskelerkrankungen abgegrenzt werden [Padberg 1982]. Die Vererbung der FSHD1 ist autosomal dominant mit einer hohen Penetranz von 83 % bis zum 30. Lebensjahr [Zatz *et al.* 1998]. Durch die Entdeckung eines zweiten FSHD Typs hat sich das genetische Bild der Erkrankung etwas verändert und neue Perspektiven eröffnet. Patienten mit fehlender Diagnose können eingruppiert werden. Die Genetik und damit die Vererbung und auch die Prognose für FSHD-Patienten kann neu interpretiert werden. Diese Punkte sollen im Folgenden diskutiert werden. Außerdem hat das mit der FSHD2 assoziierte Gen noch weitere Funktionen, deren Effekte nur teilweise bekannt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch darauf weiter eingegangen werden.

4.2.1 Charakterisierung der FSHD Typ 2

Für rund 95 % der Patienten mit dem FSHD-Phänotyp liegt die genetische Krankheitsursache in der Kontraktion des D4Z4-Repeats [de Greef *et al.* 2010]. Für die verbleibenden Patienten war die Ursache lange unklar. Im Jahr 2012 postulierte die Gruppe um Lemmers *et al.* (2012b) die genetische Ursache für einen FSHD Typ 2. Im Folgenden wurde die aufgestellte Annahme geprüft und die Erkrankung weiter charakterisiert. Außerdem wurde ein Schema zur Diagnostik der FSHD2 als Routineanwendung erarbeitet.

4.2.1.1 Die Patientenkohorten und untersuchten Parameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kohorten von nicht miteinander verwandten FSHD-Patienten untersucht. Gruppe A bestand aus 55 Patienten mit normalem (> 11 Kopien) D4Z4-Repeat, Gruppe B umfasste 40 Patienten mit verkürztem D4Z4-Repeat (< 11 Kopien). Für alle untersuchten Patienten wurden die für FSHD2 relevanten Kriterien untersucht, welche in der Literatur beschrieben wurden: (1) das Vorliegen eines permissiven Haplotyps, hier 4qA161, (2) der Methylierungsstatus von D4Z4 und (3) Mutationen in *SMCHD1* [Lemmers *et al.* 2012b]. Zusätzlich wurde für alle Patienten im Vorfeld überprüft, ob eine Kontraktion von D4Z4 vorliegt. Für die zu untersuchenden Parameter wurden zunächst geeignete Tests etabliert.

Die Charakterisierung des permissiven Haplotyps wurde durch einen Assay von Tsumagari *et al.* (2010) erreicht, welcher zeigt, ob bei dem Patienten der häufigste permissive Haplotyp 4qA161 vorliegt, oder nicht. Die Kenntnis über den Haplotyp ist von erheblicher Wichtigkeit, da nur Patienten mit einem permissiven Haplotyp überhaupt eine FSHD entwickeln können (vgl. Abschnitt 1.5.2.2). Abbildung 50 zeigt die Verteilung der Haplotypen in Europa und der ganzen Welt. Dabei ist zu sehen, dass in verschiedenen ethnischen Gruppen die Haplotypen mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. In Europa sind 38 % der Allele 4qA161 (14 % der Menschen homozygot, 47 % heterozygot). Die permissiven Haplotypen 4qA159 (0,1 %) und 4qA168 (0,3 %) sind so selten

[Lemmers *et al.* 2010b], dass nur < 1 % der potenziellen FSHD Patienten bei dem hier verwendeten Test nicht erfasst werden.

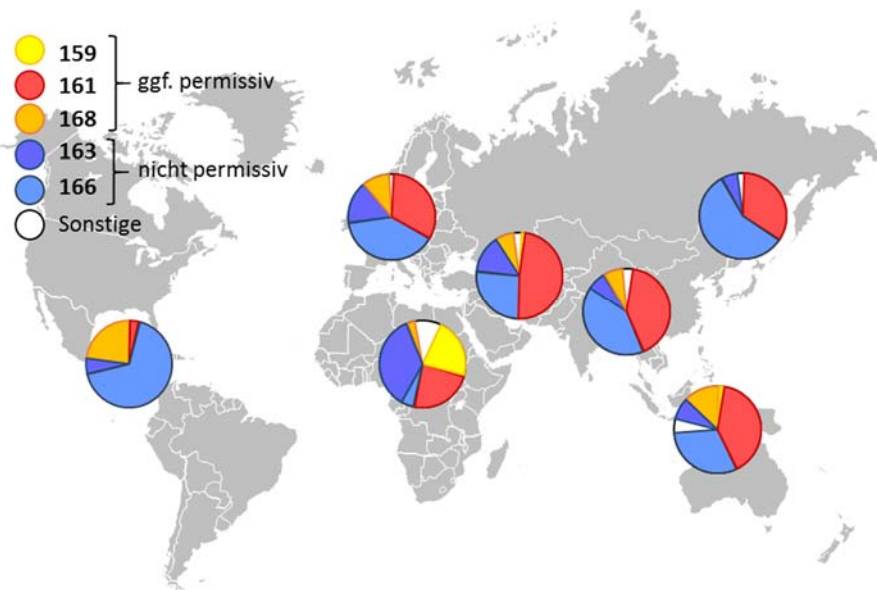


Abbildung 50: Verteilung der FSHD-Haplotypen auf Chromosom 4 über die ethnischen Gruppen der Erde (Amerika, Europa, Afrika, Mittlerer Osten, Süd- und Zentralasien, Ostasien und Ozeanien). Gezeigt ist die relative Häufigkeit der Sequenzvarianten des SLP proximal zu D4Z4 in Form eines Tortendiagramms. Die größte Diversität besteht in der afrikanischen Bevölkerung. Die Varianten kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit in Kombination mit den distalen Haplotypen A oder B vor. Diese sind in etwa gleich häufig (qA 44 % und qB 50 %). Auf 4qA sind 159, 161 und 168 permissiv für FSHD, 163 und 166 jedoch nicht. In der europäischen Bevölkerung macht 4qA161 86 % und 4qA166 11% des A-Haplotyps aus, 4qA159 und 4qA168 sind sehr selten, auf Haplotyp B sind 4qB163 mit 68 % und 4qB168 mit 21 % die häufigsten. Die Kombination mit Haplotyp B ist nicht permissiv. (Verändert nach Lemmers *et al.* (2010b))

Einen weiteren wichtigen Parameter stellt der Methylierungsstatus des D4Z4-Repeats dar. Um diesen zu ermitteln, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die klassische Methode ist der methylierungssensitive Southern Blot, wobei die Methylierung von einem einzelnen CpG innerhalb der proximalen D4Z4-Einheit ermittelt wird [de Greef *et al.* 2009, Lemmers *et al.* 2012b]. Wie über einen Assay mit Bisulfit-Konvertierung und Klonierung verschiedener PCR-amplifizierter Regionen innerhalb von D4Z4 (aller Repeats auf allen vier Allelen) mit anschließender Sequenzierung gezeigt werden konnte, ist die Methylierung über das D4Z4-Repeat nicht gleichförmig. Es wurde jedoch eine Region extremer Demethylierung (DR1) vorgestellt, in der sich FSHD-Patienten und gesunde Kontrollen signifikant voneinander unterscheiden [Hartweck *et al.* 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Methylierungsassay auf der Basis der Pyrosequenzierung von Bisulfit-konvertierter DNA entwickelt, welcher neun CpGs der DR1 Region untersucht. Dabei werden ebenfalls alle D4Z4 Einheiten aller vier FSHD-Allele gleichzeitig betrachtet. Dieses Vorgehen der Untersuchung aller internen Einheiten hat zum Vorteil, dass Patienten mit FSHD2, bei denen eine Demethylierung gleichermaßen auf allen vier Allelen vorliegt, sich noch stärker von den Gruppen der gesunden Kontrollen und FSHD1-Patienten abgrenzen. Es wurde ein Grenzwert der Methylierung für FSHD2 von $\leq 20\%$ ermittelt. Bei dem Vergleich der Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen

den FSHD2-Patienten ($12,15 \pm 5,65$ %) im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($47,70 \pm 8,01$ %; $p < 0,001$), sowie zu FSHD1-Patienten ($40,16 \pm 11,56$ %; $p < 0,001$) gezeigt werden. Und auch die FSHD1-Patienten waren signifikant verschieden zu den Kontrollen ($p < 0,01$). Die Gruppe der phänotypischen FSHD-Patienten (FSHD1 und FSHD2 negativ) zeigt eine Methylierung ähnlich der Kontrollgruppe ($53,35 \pm 10,29$ %), sie ist damit signifikant verschieden von den Gruppen FSHD1 und FSHD2. Diese Patienten leiden vermutlich an einer anderen Muskelerkrankung und nicht an FSHD. Zur Validierung des Tests wurde eine Reihe von Patienten mit dem klassischen methylierungssensitiven Southern Blot untersucht. Alle klinisch betroffenen Patienten zeigten eine Methylierung von ≤ 25 %, was mit vorhergehenden Beobachtungen übereinstimmt [Lemmers *et al.* 2012b]. Die erhaltenen Werte weichen jedoch in einzelnen Fällen von den Daten der Pyrosequenzierung ab. Besonders auffällig ist dies bei den Patienten FSHD2-61 (SB 20 %, Pyro 49 %) und FSHD2-89_II.1 (SB 10 %, Pyro 33 %), welche beide ein kontrahiertes Allel tragen (siehe Tabelle 28). Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass durch die beiden Assays zwei unterschiedliche Loci auf verschiedene Weise untersucht werden. Der Southern Blot zeigt die Methylierung eines einzelnen CpGs in dem ersten D4Z4-Repeat der vier FSHD-Allele, der Pyro-Assay untersucht dagegen neun CpGs auf allen Repeateinheiten der vier Allele gleichzeitig (vgl. Abbildung 17). Die Anzahl aller Wiederholungseinheiten eines Patienten beeinflusst also das Ergebnis, besonders bei FSHD1-Patienten, bei denen lediglich das verkürzte Repeat eine verminderte Methylierung zeigt. Im Vergleich zum Southern Blot ist die hier etablierte Methode jedoch viel weniger zeitaufwendig und fehleranfällig, außerdem entfällt die Arbeit mit radioaktiven Substanzen.

Das *SMCHD1*-Gen ist an der Methylierung von CpG-Inseln beteiligt und spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der X-Inaktivierung in Weibchen [Blewitt *et al.* 2008]. Wie durch den Zusammenhang mit der FSHD2 gezeigt werden konnte, hat *SMCHD1* außerdem eine Funktion in der Stilllegung des *DUX4*-Gens in somatischen Zellen [Lemmers *et al.* 2012b]. Bisher sind lediglich heterozygote Mutationen in dem Gen beschrieben worden und Beobachtungen an Mäusen deuten auch darauf hin, dass homozygote Mutationen in Weibchen letal sind [Blewitt *et al.* 2008]. Bei der Sequenzierung des Gens werden also heterozygote Varianten erwartet. Bisher sind sowohl das Protein trunkierende Varianten, als auch Aminosäureaustausche und kleine Deletionen in der LOVD Datenbank [Fokkema und den Dunnen 2015] beschrieben worden.

4.2.1.2 Potenziell pathogene Varianten im *SMCHD1*-Gen

Für zwölf der insgesamt 95 untersuchten Patienten trafen alle drei Kriterien für FSHD2 zu (Tabelle 28). Darunter konnten elf verschiedene pathogene Varianten in *SMCHD1* nachgewiesen werden, von denen zehn noch nicht beschrieben worden waren.

Sechs der gefundenen Varianten führen auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch. Die Varianten c.328G>A (p.Ala110Thr), c.1844T>A (p.Val615Asp), c.4346G>A (p.Arg1449Lys), c.4388A>C (p.Gln1463Pro) und c.4454C>T (p.Pro1485Leu) wurden von allen verwendeten Softwaretools als pathogen eingestuft. Die Vorhersage der Pathogenität war lediglich für die Variante c.1433G>A

(p.Gly478Glu) in Patient FSHD2-08 etwas geringer. Daraufhin wurde ein weiteres betroffenes Mitglied dieser Familie untersucht, um die Segregation der Variante innerhalb der Familie nachzuvollziehen. Die Variante konnte in diesem zweiten betroffenen Verwandten ebenfalls nachgewiesen werden. Auch die niedrigen Methylierungslevel in D4Z4 unterstützen die Annahme, dass hier eine pathogene Variante vorliegt (vgl. Abbildung 42).

Die Variante c.3276_3276+4del in FSHD2-10 hat wahrscheinlich kryptisches Spleißen und das Überspringen von Exon 25 mit einer daraus resultierenden Störung des Leserasters in der mRNA (p.Val1093Leufs*26) zur Folge. Diese Variante wurde bereits zuvor als pathogen beschrieben [Lemmers *et al.* 2012b]. Die gleiche Spleißstelle ist durch die Variante c.3274_3276+1del in den Patienten FSHD2-13 und FSHD-120 betroffen. Von der funktionellen Seite her betrachtet, dürfte die Auswirkung dieser Variante der eben beschriebenen sehr ähneln, womit sie wahrscheinlich ein Überspringen von Exon 25 verursacht.

Gesamt betrachtet verteilen sich die hier gefundenen Varianten über das gesamte *SMCHD1*-Gen, wie Abbildung 51 veranschaulicht. Es sind Anhäufungen von Mutationen in den Bereichen von Exon 12 und Exon 25 zu erkennen. Kleine Deletionen in der 3'-Region des Exons 25 wurden bereits bei neun unabhängigen Patienten identifiziert [Lemmers *et al.* 2012b, Larsen *et al.* 2015, Lemmers *et al.* 2015, van den Boogaard *et al.* 2015]. Dieser Befund deutet auf einen Mutationshotspot oder einen Gründereffekt hin, es ist jedoch nichts Genaueres über die Vorfahren dieser Patienten bekannt.

Das *SMCHD1*-Gen verfügt über zwei hochkonservierte Domänen am Beginn und am Ende der Aminosäurekette. Bereits zehn Varianten wurden innerhalb der hoch konservierten ATPase-Domäne (p.111-364) identifiziert. Die betreffenden Patienten sind als mild bis moderat betroffen beschrieben worden [Lemmers *et al.* 2015]. Die Variante c.328G>A (p.Ala110Thr) ist direkt proximal zu der ATPase-Domäne lokalisiert, der Patient FSHD2-131 zeigt milde Symptome bei einem späten Krankheitsbeginn im Alter von 60 Jahren.

In dieser Arbeit wurde außerdem ein Patient mit einer Nonsense Mutation in Exon 40 identifiziert. Die Variante c.4988T>G in Patient FSHD2-82 führt zu dem Austausch von Leucin-Codon 1663 zu einem Stop-Codon (p.Leu1663*), wodurch der Verlust der SMC *flexible hinge* Domäne (p.1681-1875) vorhergesagt wird. Stop-Mutationen wurden bereits für *SMCHD1* beschrieben, wobei die am weitesten proximal gelegene Mutation in Exon 3 lokalisiert ist. Auch verschiedene Mutationen, welche das Leseraster zerstören und ein vorzeitiges Stop-Codon erzeugen, sind bereits beschrieben worden [Lemmers *et al.* 2015].

Für die hier gefundene Spleißvariante c.1957-3C>T (FSHD2-130) in Intron 11 wird das Überspringen von Exon 11 und eine daraus resultierende Verschiebung des Leserasters mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt. Die Variante c.1957-3C>T (FSHD2-61) in Intron 14 soll zu dem Verlust der Bindestelle eines Spleißfaktors führen, was wiederum das Überspringen der Spleißstelle mit sich bringen würde. Dies wiederum führt zu einer Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Stop-Codon. Für beide Varianten, wurde der Effekt der Mutation auf RNA-Ebene untersucht. In der cDNA-Sequenzierung war jeweils kein Unterschied zwischen der normalen Referenzsequenz und der Sequenz des Patienten erkennbar. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass es sich hier nicht um eine kausale Variante handelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Spleißverhalten von *SMCHD1* in verschiedenen Geweben ähnlich ist, weshalb eine Gewebespezifität unwahrscheinlich

ist. Für eine große Zahl an Mutationen mit zerstörtem Leseraster konnte jedoch auf RNA-Ebene gezeigt werden, dass diese durch *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut wird, wobei Transkriptlevel von 0 - 40 % im Vergleich zu der wildtypischen RNA (wtRNA) nachgewiesen wurden [Lemmers *et al.* 2015]. Dieser Effekt trifft wahrscheinlich auch auf die hier beschriebenen Varianten zu, da in einer semiquantitativen Spleißanalyse deutlich verminderte Level der mutierten Transkripte nachgewiesen wurden, was diese Annahme eines NMD bekräftigt. Da die Patientin FSHD2-61 zusätzlich zu der *SMCHD1*-Variante auch eine D4Z4-Kontraktion trägt, bleibt in diesem Fall jedoch eine Unsicherheit, auf welche Ursache die Symptome zurückgehen.

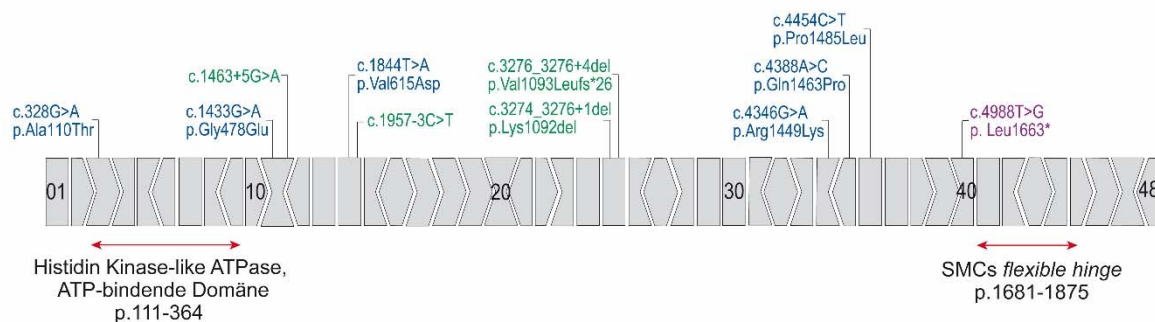


Abbildung 51: Überblick über Varianten im *SMCHD1*-Gen. Gezeigt sind die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten im Kontext zu ihrer Lokalisation in den insgesamt 48 Exons des *SMCHD1*-Gens (5' Spleißstelle: | 0, > +1, < +2; 3' Spleißstelle: | 0, > -1, < -2). Es wurden Missense-Mutationen (blau), Spleiß-Mutationen (grün) und eine Stop-Mutation (lila) gefunden. Variante c.3274_3276-1del wurde bei zwei Indexpatienten gefunden. Die funktionellen Domänen des Gens sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

In einer aktuellen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe aus den Niederlanden werden 45 verschiedene *SMCHD1*-Varianten miteinander verglichen. Darunter befinden sich Missense-Mutationen (13x), Stop-Mutationen (8x) sowie Spleiß-Mutationen (19x) und Indel-Mutationen (5x), jeweils mit (gesamt 9x) und ohne (gesamt 15x) Verschiebung des Leserasters. Die Vorhersagen für diese Varianten reichen von einer hohen bis moderaten, für manche sogar zu einer geringen Pathogenität. Es fällt auf, dass sowohl Varianten mit einer Trunkierung des Proteins, als auch einfache Aminosäureaustausche für FSHD2 kausal sein können. Alle Varianten treten jedoch heterozygot auf. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Über die Befunde aus RNA-Analysen konnten die Varianten in zwei Kategorien eingeteilt werden: Mutationen, bei denen das Leseraster zerstört wird (*disrupting ORF*, D-ORF), bewirken einen herabgesetzten Level des mutierten Transkripts (mutRNA) durch NMD der mRNA. Mutationen ohne Störung des Leserasters (*preventing ORF*, P-ORF), erzeugen dagegen gleiche Level von wtRNA und mutRNA. Die gefundenen Transkriptlevel waren unabhängig von dem untersuchten Gewebe (Blut, Fibroblasten, Myoblasten) [Lemmers *et al.* 2015]. In der vorliegenden Arbeit konnten bei lediglich zwei Patienten mit Spleißmutationen RNA-Untersuchungen durchgeführt werden, wodurch die dargestellten Effekte für die neun übrigen Varianten auf Vorhersagen beruhen. Begründet auf diesen Daten können die hier gefundenen Varianten zu gleichen Teilen in die Gruppen D-ORF (6x) und P-ORF (6x) eingeordnet werden (siehe Tabelle 28).

4.2.1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Um eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation aufzudecken, wurde der Effekt der gefundenen Varianten mit dem Phänotyp verglichen. Alle FSHD2-Patienten der Kohorte A (FSHD1-negative Patienten) zeigen die für FSHD typische Verteilung der Muskelschwäche mit einem langsamen Fortschreiten der Erkrankung (siehe Tabelle 19). Keiner der Patienten zeigte einen Erkrankungsbeginn im Kindesalter, sondern in der zweiten Lebensdekade oder später. Werden die Mutationstypen verglichen, so zeigt sich der Phänotyp von Patienten mit einer D-ORF Mutation als nicht deutlich schwerer, als derjenige von Patienten mit P-ORF Mutationen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass weder Mutationen in der ATPase Domäne noch der Verlust der *SMC flexible hinge* Domäne eine Verschlechterung des Phänotyps verursacht. Daraus lässt sich schließen, dass die Haploinsuffizienz des verbleibenden intakten *SMCHD1*-Allels vermutlich den der FSHD2 zugrundeliegenden Pathomechanismus darstellt. Die Zahl der hier untersuchten Patienten ist jedoch zu gering um eine abschließende Aussage treffen zu können. Außerdem wurde die Beurteilung des Schweregrads der Erkrankung subjektiv von verschiedenen Neurologen und nicht nach festen Standards durchgeführt. Auch eine Alterskorrektur des Schweregrads der Erkrankung wurde nicht durchgeführt.

Bei allen hier untersuchten Patienten wurden heterozygote Mutationen in *SMCHD1* gefunden. Homozygote Veränderungen sind bisher nicht beschrieben worden. van den Boogaard *et al.* (2015) stellen Familien mit zwei Varianten im *SMCHD1*-Gen vor. Abhängig von der Lokalisation *in cis* oder *in trans* haben die Varianten eine unterschiedliche Wirkung. Liegen die Varianten auf dem gleichen Allel, so ist unabhängig vom Effekt der beiden Varianten ein intaktes Allel vorhanden. Bei zwei Missense-Mutationen auf verschiedenen Allelen konnte in einer Familie ein synergistischer Effekt auf den Phänotyp beobachtet werden.

In einer aktuellen Veröffentlichung stellen Lemmers *et al.* (2015) eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand einer Kohorte von 51 FSHD2 Familien in vor. In diese Untersuchungen gingen neben Sequenzvarianten von *SMCHD1* auch die Methylierung von D4Z4 an der *FseI*-Schnittstelle sowie Haplotyp und Länge aller vier FSHD-Allele mit ein. Der Phänotyp der Patienten wurde nach standardisierten Normen erfasst und nach einer Alterskorrektur in einem Score ausgedrückt. Die Methylierung wurde in Zusammenhang mit der kumulierten Repeatlänge aller FSHD-Allele gebracht. Der vorgestellte Delta I Score bezeichnet die Differenz zwischen der erwarteten D4Z4-Methylierung basierend auf der Gesamtzahl der D4Z4-Einheiten aller Allele und der ermittelten Methylierung an der *FseI*-Schnittstelle. Delta I ist für gesunde Kontrollen nahe null, für FSHD2-Patienten stark negativ. Werden die beiden Mutationstypen P-ORF und D-ORF miteinander verglichen, so stellt sich eine stärker schädliche Wirkung für P-ORF Mutationen heraus. Auch ein Positionseffekt spielt hier eine Rolle, wobei N-terminale Mutationen schädlicher erscheinen, als C-terminale. Der Effekt von P-ORF Mutationen kann damit als dominant negativ beschrieben werden. D-ORF Mutationen dagegen, scheinen über den Mechanismus der Haploinsuffizienz zu wirken.

4.2.1.4 *SMCHD1* als Modifier der FSHD1 und unvollständige Penetranz

Bei der Analyse von 40 Patienten mit Kontraktion in D4Z4, konnten drei Patienten (2x 10, 1x 6 D4Z4 Einheiten auf einem FSHD-permissiven Allel) mit zusätzlicher potenziell pathogener Variante in *SMCHD1* identifiziert werden. Bei dem Vergleich des Schweregrads der Erkrankung mit den übrigen FSHD2-Patienten, fällt auf, dass diese weitaus schwerer betroffen sind. Patient FSHD2-89 zeigte bereits die ersten Symptome im Alter von 11 Jahren, FSHD2-92 verlor im Alter von 50 Jahren die Gehfähigkeit. Patient FSHD2-61 zeigt einen klassischen FSHD-Phänotyp, es fehlen jedoch detailliertere Informationen, um eine weiterführende Aussage machen zu können. Diese Beobachtungen bestätigen insgesamt die von Sacconi *et al.* (2013) postulierten Befunde von drei nichtverwandten Patienten mit einer kombinierten FSHD1 und 2 und einem ungewöhnlich schweren Phänotyp. Diese Beobachtungen weisen auf eine Funktion von *SMCHD1* als Modifier für den Schweregrad der Erkrankung in FSHD1 hin. Die Methylierung der Patienten mit dieser Doppelmutation liegt für zwei der klinisch betroffenen Patienten im Bereich der FSHD2-Patienten mit, 13 % (FSHD2-89 II-2) und 16 % (FSHD2-92), Patient FSHD2-61 hat eine normale Methylierung von 49 %. Patient FSHD2-89 II-1 zeigt keine klinische Manifestation und eine ebenfalls normale Methylierung von 33 %.

Bei der Auswertung von molekularen und klinischen Daten stimmte nicht in allen Fällen die Erwartung mit den tatsächlichen Befunden überein. Diese Beispiele verdeutlichen die genetische Heterogenität und die Tatsache, dass neben den bekannten Kriterien auch unbekannte Aspekte in die Ausprägung der Erkrankung mit einspielen.

Für die Patientin FSHD2-61 mit einer D4Z4-Kontraktion auf sechs Wiederholungseinheiten und einer Variante in *SMCHD1* ist unklar, in welchem Maß die *SMCHD1*-Variante zu dem Phänotyp beiträgt. Die Vorhersagen sind nicht ganz eindeutig. In dem Spleißassay wurde ein verminderter Level von *SMCHD1* nachgewiesen, was für einen Effekt der Mutation spricht. Die Methylierung von D4Z4 ist mit 49 % jedoch normal. Es ist also wahrscheinlich, dass der Phänotyp von der FSHD1 dominiert wird, wobei ein Effekt von der *SMCHD1*-Variante nicht ausgeschlossen werden kann.

Patient FSHD2-38_I.2 zeigt genetisch alle drei Kriterien für eine FSHD2, den Haplotyp 4qA161, eine Hypomethylierung von 15 % sowie eine kausale Variante im *SMCHD1*-Gen. Die neurologischen Befunde zeigen jedoch keine Hinweise auf eine myopathische Erkrankung. Die betroffene Tochter des Patienten hat dagegen typische Anzeichen einer FSHD mit einer Schwäche der Gesichtsmuskulatur und *Skapulae alatae*, bei einem Erkrankungsbeginn mit 40 Jahren (siehe Tabelle 19). Das Beispiel dieser Familie bestätigt eine unvollständige Penetranz für FSHD2 [Lemmers *et al.* 2012b].

Die Relevanz der Methylierung für die Krankheitsmanifestation wird durch das Beispiel der Familie FSHD2-89 veranschaulicht. Die weibliche Index-Patientin (FSHD2-89_II.2) zeigte erste Symptome im Alter von 11 Jahren mit der für FSHD typischen Verteilung der Muskelschwäche. Ihr älterer Bruder zeigt keine deutlichen Anzeichen einer Myopathie im Alter von 26 Jahren. Die beiden Eltern konnten leider nicht neurologisch untersucht werden, sie zeigen jedoch beide keine muskulären Auffälligkeiten. Die Index-Patientin trägt 10 D4Z4 Einheiten auf einem FSHD-permissiven 4qA161

Allel, eine pathogene Variante in *SMCHD1* und einen Methylierungslevel von 13 %. Mit diesem Befund ist sie betroffene Trägerin von FSHD1 und FSHD2. Ihr Bruder (II.1) teilt die *SMCHD1* Variante, den 4qA161 Haplotyp und die 10 D4Z4 Einheiten, zeigt jedoch einen normalen Methylierungslevel von 33 %, was deutlich oberhalb der oberen Grenze für alle weiteren FSHD2-Patienten liegt. Es ist denkbar, dass er eine später manifestierende FSHD1 entwickelt. Der Vater (I.1) trägt die *SMCHD1* Variante, ihm fehlt jedoch der permissive Haplotyp und die D4Z4 Kontraktion. Seine Methylierung zeigt sich im normalen Bereich (39 %). Die Mutter (I.2) trägt die D4Z4 Kontraktion auf einem 4qA161, ihr fehlt jedoch die *SMCHD1*-Mutation und sie hat einen normalen Methylierungsstatus (38 %). Somit erfüllt lediglich die Index-Patientin alle Kriterien für FSHD1+2, während dem Bruder und Vater jeweils einer bzw. zwei Kriterien zur Manifestation der FSHD fehlen. Die Mutter ist wahrscheinlich ein Fall von verminderter Penetranz für FSHD1, was regelmäßig beobachtet wird, besonders bei einer grenzwertigen Zahl von 10 D4Z4 Kopien [Lunt *et al.* 1995, Zatz *et al.* 1998].

Unvollständige Penetranz wurde bereits zuvor im Zusammenhang mit FSHD beschrieben. In Italien wurde eine Häufigkeit von 1,2 % des permissiven Allels in Kombination mit einer Kontraktion von D4Z4 in der allgemeinen Bevölkerung beschrieben [Scionti *et al.* 2012]. Für FSHD2 verbleiben 19 % der Patienten mit allen drei genetischen Kriterien für FSHD2 ohne Symptomatik [Lemmers *et al.* 2012b]. Ein weiterer Aspekt ist die bekannte klinische Variabilität der FSHD sogar innerhalb von Familien, welche bereits bei der Erstbeschreibung der Erkrankung durch Landouzy und Dejerine im Jahr 1886 erwähnt wurde [Cabianca und Gabellini 2010].

4.2.1.5 Vererbung der FSHD – neue Aspekte

Mutationen in *SMCHD1* erklären lediglich einen Teil der verbleibenden Patienten mit dem FSHD-Phänotyp ohne D4Z4 Kontraktion. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass neben den bekannten Faktoren noch weitere genetische, epigenetische oder Umweltfaktoren einen Einfluss auf das Krankheitsbild der FSHD haben. Unter diesen Voraussetzungen ist die genetische Beratung von FSHD2-Patienten und ihren Familien eine große Herausforderung.

Es ist von einer echten kodominanten Vererbung des permissiven 4qA Haplotyps und der *SMCHD1*-Mutation auszugehen, die jeweils für sich genommen nicht pathogen sind. Das permissive FSHD-Allel kommt mit einer Allelfrequenz von 38 % in der allgemeinen Bevölkerung vor (siehe 4.2.1.1) [Lemmers *et al.* 2010b]. *SMCHD1*-Mutationen sind sehr selten. In einer Familie, in der eine *SMCHD1*-Mutationen segregiert, kann sich diese in verschiedenen genetischen Kontexten pathogen auswirken, die 4qA Variante muss nicht gleichzeitig segregieren, es können auch mehrere permissive Allele vorliegen. Das Wiederholungsrisiko ist also ausgehend von dem 50 % Risiko für die Weitergabe der *SMCHD1*-Mutation nur wenig vermindert durch die hohe Frequenz FSHD-permissiver Allele.

Noch komplexer wird es im Fall von FSHD1+2, wobei neben den gerade besprochenen Faktoren ein verkürztes FSHD Allel hinzukommt. Liegt dieses auf einem permissiven Haplotyp, ist der Patient an FSHD1 erkrankt und gibt diese Eigenschaft dominant an die Nachkommen weiter. Die *SMCHD1* Variante segregiert unabhängig und wirkt sich wie oben beschrieben aus. Es ergibt sich also ein getrenntes Wiederholungsrisiko von 50 % für FSHD1 und < 50 % für FSHD2. Daneben können

natürlich auch beide Varianten gleichzeitig vererbt werden, wodurch auch beide zum Ausdruck kommen.

4.2.1.6 FSHD2-Diagnostik - Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit bestätigen Mutationen in *SMCHD1* als die genetische Bedingung für FSHD2, sowie als Modifier des Schweregrads der Erkrankung bei FSHD1 [Lemmers *et al.* 2012b, Sacconi *et al.* 2013]. Außerdem konnte diese Arbeit zu der Liste an bekannten Mutationen zehn weitere Varianten beitragen.

Der Pathomechanismus der FSHD2 stellt sich demnach wie folgt dar: Die beiden genetischen Faktoren, welche in digenischer Weise zu der Erkrankung beitragen, sind ein permissiver FSHD Haplotyp und pathogene Varianten in *SMCHD1*. Die beiden Faktoren haben unabhängig voneinander keine pathogene Wirkung. Gemeinsam führen sie jedoch zu einer toxischen Funktionsgewinn-Mutation, die zu der Stabilisierung des distalen *DUX4*-Transkripts führen. Der gleiche *downstream* Pathomechanismus liegt der FSHD1 zugrunde, wie in der Einleitung (1.5.2.2) ausführlich erläutert wurde. Eine gemeinsame Darstellung findet sich in Abbildung 52. Da die beiden genetischen Faktoren der FSHD2 unabhängig voneinander vererbt werden, ist es nicht verwunderlich, dass diese auch in Kombination mit der klassischen FSHD-Kontraktion von D4Z4 vorkommen. In diesem Fall addiert sich vermutlich die pathogene Wirkung der beiden Mutationen zu einem schwereren Phänotyp [Lemmers *et al.* 2012b, Sacconi *et al.* 2013], was in dieser Arbeit an drei Beispielen gezeigt werden konnte.

Verschiedene Mutationstypen im *SMCHD1*-Gen haben scheinbar eine unterschiedliche Auswirkung auf die Schwere der Erkrankung. D-ORF Mutationen wirken vermutlich über den Mechanismus der Haploinsuffizienz. Dies ist dadurch erklärbar, dass nur 50 % der normalen Proteinmenge vorliegt, da das mutierte Transkript durch NMD abgebaut worden ist. Der größte Anteil des vorliegenden Proteins ist jedoch voll funktionsfähig. P-ORF Mutationen dagegen wirken wahrscheinlich über einen dominant negativen Mechanismus. Die Proteinmenge des mutierten Allels ist gegenüber der Menge des wildtypischen Allels nicht vermindert [Lemmers *et al.* 2015]. *SMCHD1* bildet vermutlich Dimere [Hirano 2006], was zur Konsequenz hat, dass bis zu 75 % der aktiven Proteine die Mutation tragen. Dies könnte erklären, warum P-ORF Mutationen verheerender sind, als die vermeintlich schwereren D-ORF Mutationen. Diese Beobachtungen können in der Zukunft vielleicht in die Prognosen für FSHD2-Patienten mit einfließen.

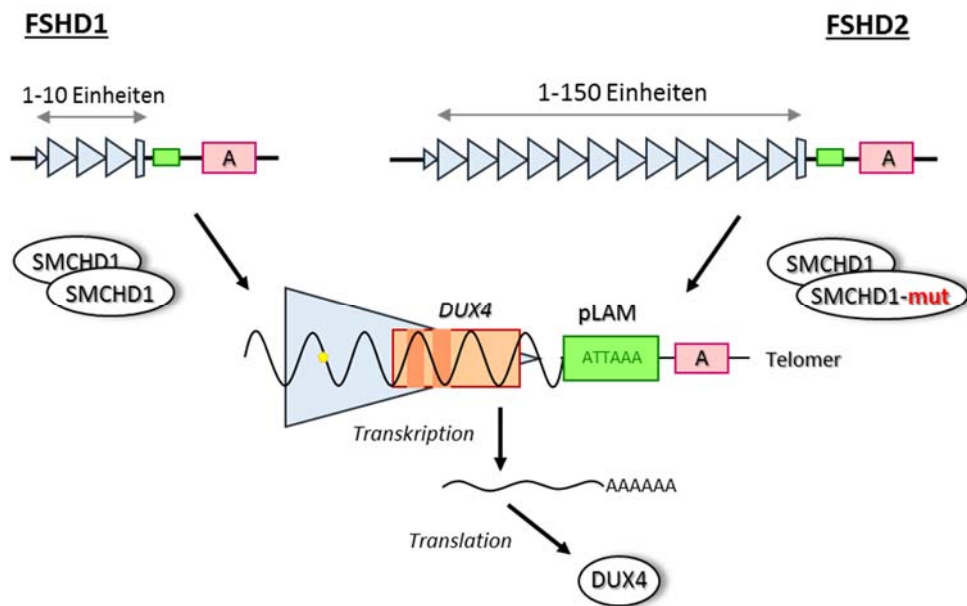


Abbildung 52: Gemeinsamer Pathomechanismus von FSHD1 und 2: toxische Funktionsgewinn-Mutation stabilisiert distales DUX4. Für FSHD1 und FSHD2 sind jeweils die genetischen Voraussetzungen gezeigt, in denen die Erkrankung ausgeprägt wird. Für FSHD1 ist eine D4Z4-Kontraktion auf einem permissiven Haplotyp notwendig und ausreichend. Für FSHD2 liegt ein normales D4Z4 auf einem permissiven Haplotyp vor, in Kombination mit einem heterozygoten Defekt in *SMCHD1* (*SMCHD1-mut*). Gemeinsam bilden sie einen digenischen Defekt. Beide Voraussetzungen (FSHD1 und FSHD2) führen unabhängig voneinander zu der Chromatin-Dekondensation von *D4Z4*, was die ektopische Expression von *DUX4* ermöglicht und das Transkript stabilisiert. *D4Z4* Repeat (blau) mit pLAM-Region (grün) und distalem permissivem Haplotyp (rosa), *DUX4* ORF (rot) und DNA-Methylierung (gelb).

Mit der Detektion von *SMCHD1*-Mutationen in 16,3 % (9 aus 55) der FSHD1-negativen Patienten (Gruppe A), spielt die FSHD2 durchaus eine bedeutende Rolle in der genetischen Ätiologie der FSHD. In der zweiten Kohorte von FSHD1-positiven Patienten (Gruppe B) zeigten 7,5 % (3 aus 40) der Fälle eine potenziell pathogene Variante in dem *SMCHD1*-Gen, welches dadurch die Rolle eines Modifiers für die Schwere der Erkrankung in Patienten mit *D4Z4*-Kontraktion einnimmt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Routinediagnostik für FSHD in unserem Labor durch die drei Analysen für FSHD2 erweitert: die Charakterisierung des Haplotyps, der Methylierungsstatus von *D4Z4* und die Sequenzierung von *SMCHD1*. In Abbildung 53 ist ein Vorschlag für einen Arbeitsablauf dargestellt. Für die abschließende Interpretation sind alle genetischen Kriterien notwendig, einschließlich der Anzahl der Repeateinheiten, dem Vorliegen eines permissiven Allels, dem Methylierungslevel von *D4Z4* und Mutationen in *SMCHD1*. Bei der Betrachtung der hier vorgestellten genetischen Daten erscheint es außerdem lohnenswert, die klinischen Daten erneut zu betrachten, mit der Möglichkeit, die diagnostischen Kriterien zu verfeinern.

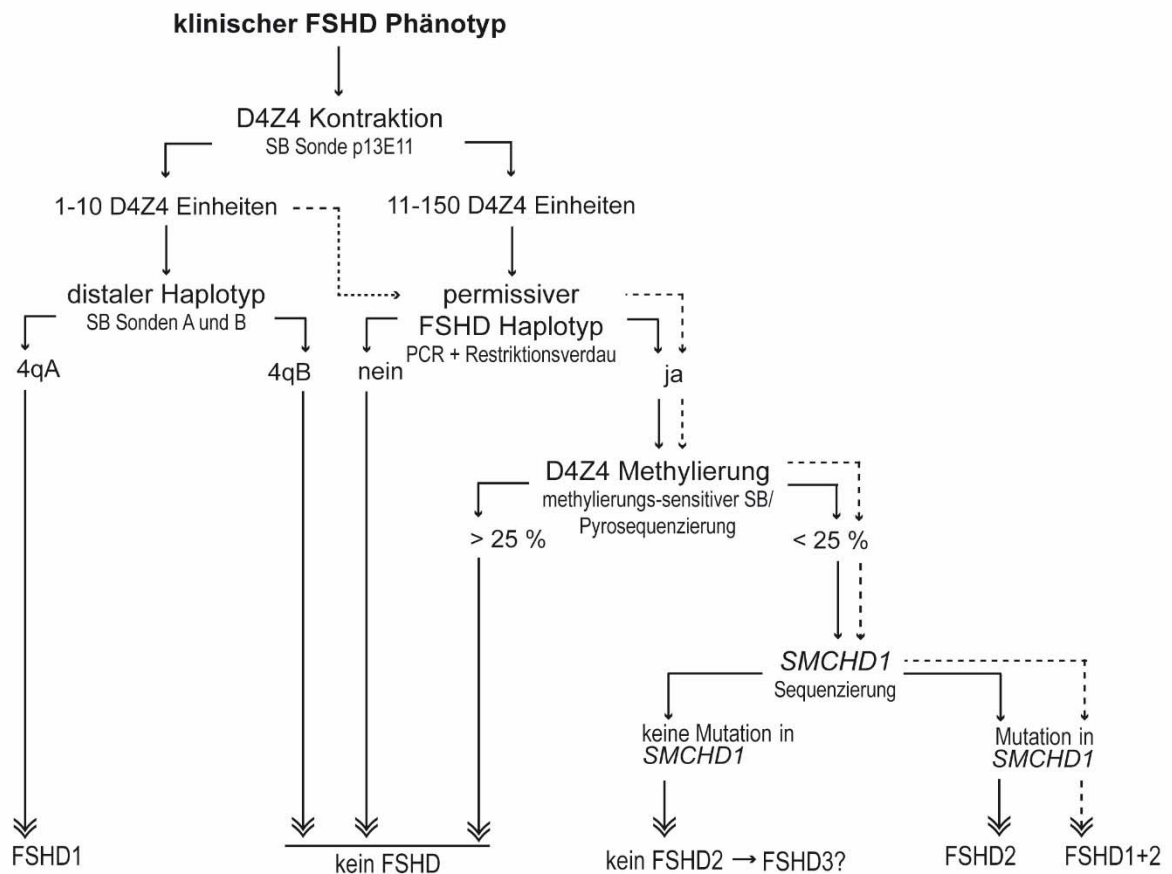


Abbildung 53: Diagnostik der FSHD – Vorschlag für das analytische Vorgehen bei der Diagnosefindung. 95 % aller FSHD-Fälle sind durch FSHD1 zu erklären, weshalb diese Diagnostik immer zuerst vorgenommen werden sollte. Liegt ein Normalbefund für FSHD1 vor, kann eine FSHD2 Diagnostik angeschlossen werden. Gestrichelte Linien geben den Weg der FSHD1+2 Diagnostik an, welche bei Patienten mit ungewöhnlich schwerem Phänotyp sinnvoll sein kann. (Verändert nach Larsen *et al.* (2015))

4.2.2 Auswirkung von Mutationen in *SMCHD1* auf die X-Inaktivierung

Das *SMCHD1*-Gen hat neben seiner Funktion bei der Repression des FSHD-Lokus noch weitere bekannte Funktionen, wie in der Einleitung (1.5.2.1) näher beschrieben worden ist. Eine dieser Funktionen ist die Beteiligung an der Aufrechterhaltung der X-Inaktivierung (XI) bei weiblichen Mäusen [Blewitt *et al.* 2008].

Die XI ist der Mechanismus zur Gen-Dosis-Kompensation bei Säugetieren, um den Level der X-chromosomalen Gene zwischen Frauen und Männern auszugleichen. Der Prozess findet in der frühen Embryonalentwicklung statt, im 8- bis 16-Zellstadium [Amos-Landgraf *et al.* 2006]. Die Auswahl, ob das mütterliche oder das väterliche X-Chromosom in einer Zelle inaktiviert wird, geschieht zufällig. Hinsichtlich der Aktivität des X-Chromosoms weist weibliches Gewebe dementsprechend ein Mosaik auf [Speicher 2011].

Die X-Inaktivierung beinhaltet mehrere Schritte: das Zählen der X-Chromosomen, die Auswahl des inaktiven X-Chromosoms (Xi), die Initiation der Chromosom-weiten Stilllegung und die Aufrechterhaltung der Repression. Die Inaktivierung geht von dem X-Inaktivierungszentrum (XIC) auf Xi aus, wo ein spezielles Transkript gebildet wird, das XIST (*X inactive specific transcript*), welches *in cis* wirkt. Die nicht-kodierende RNA XIST bindet an das gesamte Xi und initiiert so die Stilllegung des Chromosoms zu fakultativem Heterochromatin. Davon ausgenommen sind einige wenige Gene, die durch spezielle regulatorische Mechanismen dieser Inaktivierung entgehen. Darauf folgt die Phase der Aufrechterhaltung der Inaktivierung, welche keine konstante XIST Expression benötigt. Der Prozess von der Initialisierung zur Aufrechterhaltung beinhaltet eine Reihe epigenetischer Prozesse, wobei die Faktoren teilweise durch XIST rekrutiert werden. Dabei werden Chromatin-Modifikationen durch Komplexe der Polycomb Gruppe vorgenommen [Wutz 2011]. Das DNMT1-Protein (DNA (Cytosin-5-)-Methyltransferase 1, MIM *126375) führt die DNA-Methylierung von Promotorregionen aus und erfüllt damit eine Funktion bei der Gen-Repression [Sado *et al.* 2000]. *SMCHD1* spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Methylierung von CpG-Inseln, einem späten Schritt bei der X-Inaktivierung, um eine langfristige Aufrechterhaltung der Genrepression zu erreichen [Blewitt *et al.* 2008, Gendrel *et al.* 2012].

In einem *knock-out* Modell in Mäusen wurde gezeigt, dass Weibchen mit einem homozygot mutierten *Smchd1* nicht lebensfähig sind, heterozygote Weibchen und die Männchen jedoch überleben. Mutationen in *Smchd1* führen zu einer Reaktivierung von Genen auf Xi, was die Letalität der homozygoten Weibchen in der Embryonalphase erklären kann [Blewitt *et al.* 2008].

Bislang ist nichts über die Auswirkungen von Mutationen in *SMCHD1* auf die X-Inaktivierung beim Menschen bekannt. Deshalb sollte diese bei weiblichen FSHD2-Patientinnen untersucht werden.

4.2.2.1 X-Inaktivierung bei gesunden Frauen

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst gesunde Kontrollen untersucht, um das normale Ausmaß der X-Inaktivierung beurteilen zu können. In der Normalbevölkerung folgt die Verteilung der X-Inaktivierung auf die beiden X-Chromosomen einer Normalverteilung. Diese liegt im Mittel bei 50:50, 25 % der Frauen zeigen eine Verschiebung zu > 70:30 oder < 30:70 und nur 8 % der Frauen

haben eine Verschiebung auf $> 80:20$ oder $< 20:80$, was als unnormal angesehen wird. Daneben ist ein deutlicher Trend hin zu einer verschobenen X-Inaktivierung im Laufe des Lebens zu erkennen, was auf klonale Ereignisse zurückzuführen ist. Unter Neugeborenen liegt der Anteil an Gleichverteilung signifikant höher, als bei erwachsenen Frauen. Nur $< 5\%$ der Neugeborenen weisen eine unnormale Verschiebung der XI auf, was in diesen Fällen auch von diagnostischer Relevanz sein könnte [Amos-Landgraf *et al.* 2006].

In der Gruppe der hier untersuchten weiblichen Kontrollpersonen entspricht die Verteilung der X-Inaktivierungsmuster ebenfalls einer Normalverteilung, welche um einen Mittelwert von $59,2 : 40,8$ schwankt (vgl. Abbildung 44). Damit stimmen die hier gefundenen Ergebnisse im Allgemeinen mit den Daten aus vorangegangenen Studie überein, die Abweichung von dem Mittelwert $50:50$ ist mit großer Wahrscheinlichkeit in der geringen Stichprobenzahl begründet.

4.2.2.2 X-Inaktivierung bei FSHD2-Frauen

Es sollte untersucht werden, ob FSHD2-Patientinnen mit einer heterozygoten Mutation im *SMCHD1*-Gen eine veränderte X-Inaktivierung aufweisen. In der Gruppe der FSHD2-Patientinnen mit einer heterozygoten Mutation im *SMCHD1*-Gen weicht die Verteilung der X-Inaktivierung in der kleinen Stichprobe signifikant von einer Normalverteilung ab (siehe Abbildung 43). Es ergibt sich der Eindruck einer Aufspaltung in zwei Gruppen: solche mit einer vollständig einseitigen X-Inaktivierung ($0:100$ oder $100:0$, sechs Patientinnen) und solche mit einer normalen Verteilung der X-Inaktivierung auf beide Chromosomen ($> 20:80$ oder $< 20:80$, sieben Patientinnen). Ein statistischer Vergleich ergab, dass sich die beiden Gruppen der FSHD2-Patientinnen und der gesunden Kontrollen hinsichtlich der Varianz in den Stichproben signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0,001$).

Zur Interpretation der gefundenen Ergebnisse sollen die Befunde der X-Inaktivierung vor dem Hintergrund der entsprechenden *SMCHD1*-Varianten betrachtet werden. Tabelle 28 in Abschnitt 3.2.3 stellt die Daten direkt gegenüber. Es lässt sich kein klarer Zusammenhang zwischen der Art der Mutation und der Verschiebung der X-Inaktivierung herleiten, weder in Bezug auf den Mutationseffekt (D-ORF bzw. P-ORF), noch in Bezug auf die Sicherheit der Mutations-Vorhersage oder die Ergebnisse der D4Z4-Methylierung. Alle Patientinnen mit einseitiger X-Inaktivierung ($0:100$ oder $100:0$) weisen eine *SMCHD1*-Variante mit eindeutigen Vorhersagen auf. Patientinnen mit leicht unsicheren *SMCHD1*-Varianten, wie FSHD2-61, -130 und -R3 zeigen eine normale X-Inaktivierung. Bei den Patientinnen FSHD2-10_III.1, FSHD2-82, -R1 und -R2 findet sich ebenfalls eine normale X-Inaktivierung, obwohl deren *SMCHD1*-Varianten als pathogen eingeschätzt werden. Bei den Patientinnen FSHD2-82 und -R2 ergeben die D4Z4-Methylierung und die X-Inaktivierung gegensätzliche Ergebnisse. Für die Übrigen stimmen diese Werte miteinander überein und liegen jeweils beide oberhalb oder unterhalb der Normalgrenze.

4.2.2.3 Störung der X-Inaktivierung bei FSHD2 - Schlussfolgerung und Ausblick

Wie oben beschrieben wird die Funktion von SMCHD1 relativ spät im X-Inaktivierungsprozess benötigt, nämlich zur Aufrechterhaltung der Inaktivierung auf dem Wege der vollständigen Repression. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist SMCHD1 weder an der Abzählung der X-Chromosomen noch an der Initiation der Inaktivierung beteiligt. Störungen in einem dieser initialen Prozesse könnten aber vor allem dazu führen, dass selektiv nur jeweils eines der beiden X-Chromosomen der Inaktivierung zugeführt wird und damit eine einseitige X-Inaktivierung bewirken. SMCHD1 wird erst rekrutiert, wenn die selektiven Schritte des Inaktivierungsprozesses bereits abgeschlossen sind. Wie kann also ein Funktionsverlust von SMCHD1 eine einseitige X-Inaktivierung bewirken? Wie Blewitt *et al.* (2008) gezeigt haben, hat der vollständige Verlust von SMCHD1 die partielle Hypomethylierung und Reaktivierung von Genen auf Xi zur Folge, was sich embryonal letal auswirkt. Ein teilweiser Funktionsverlust von SMCHD1 durch Mutation oder Haploinsuffizienz könnte denselben Effekt in geringerem Ausmaß nach sich ziehen. Es ist denkbar, dass Zellen, in denen ein Teil der Gene auf Xi nicht vollständig inaktiviert worden ist, einen Selektionsnachteil haben und sich in adultem Gewebe nicht nachweisen lassen. Es wurden in dieser Arbeit Leukozyten untersucht, die als Endprodukt der Hämatopoese bekanntermaßen einer starken Selektion während ihrer Differenzierung unterliegen. Die überlebenden Zellen wären diejenigen, denen eine vollständige X-Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen gelungen ist. Als Ursachen eines Selektionsnachteils könnte die gestörte Dosis-Kompensation in Frage kommen, da die weitaus meisten Gene des X-Chromosoms dosis-sensitiv sind, d.h. dass eine Expression von beiden Allelen nicht toleriert wird.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Verschiebung des X-Inaktivierungsmusters auch in einer größeren Stichprobe von FSHD2-Patientinnen bestätigen lässt und das Ausmaß der Verschiebung evtl. sogar mit der Art und/oder Lage der Mutation in SMCHD1 korreliert werden könnte. Zur Frage der zellulären Selektion könnten andere Gewebe, z.B. Hautfibroblasten oder Zellen der Mundschleimhaut untersucht werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010): *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nature methods; 7: 248-249.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW (1992): *Methylation of Hpall and Hhal sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation*. Am J Hum Genet; 51: 1229-1239.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF (2006): *X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females*. Am J Hum Genet; 79: 493-499.
- Ashizawa T, Dunne PW, Ward PA, Seltzer WK, Richards CS (1994): *Effects of the sex of myotonic dystrophy patients on the unstable triplet repeat in their affected offspring*. Neurology; 44: 120-122.
- Bachinski LL, Baggerly KA, Neubauer VL, Nixon TJ, Raheem O, Siritto M, Unruh AK, Zhang J, Nagarajan L, Timchenko LT, Bassez G, Eymard B, Gamez J, Ashizawa T, Mendell JR, Udd B, Krahe R (2014): *Most expression and splicing changes in myotonic dystrophy type 1 and type 2 skeletal muscle are shared with other muscular dystrophies*. Neuromuscul Disord; 24: 227-240.
- Bachinski LL, Czernuszewicz T, Ramagli LS, Suominen T, Shriver MD, Udd B, Siciliano MJ, Krahe R (2009): *Pre-mutation allele pool in myotonic dystrophy type 2*. Neurology; 72: 490-497.
- Bachinski LL, Udd B, Meola G, Sansone V, Bassez G, Eymard B, Thornton CA, Moxley RT, Harper PS, Rogers MT, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Wieser T, Gamez J, Navarro C, Bottani A, Kohler A, Shriver MD, Sallinen R, Wessman M, Zhang S, Wright FA, Krahe R (2003): *Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)_n expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect*. Am J Hum Genet; 73: 835-848.
- Beckers M, Gabriels J, van der Maarel S, De Vriese A, Frants RR, Collen D, Belayew A (2001): *Active genes in junk DNA? Characterization of DUX genes embedded within 3.3 kb repeated elements*. Gene; 264: 51-57.
- Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D (1994): *Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface*. Science; 265: 2096-2098.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T (2014): *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*. Nucleic acids research; 42: W252-258.
- Blewitt ME, Gendrel AV, Pang Z, Sparrow DB, Whitelaw N, Craig JM, Apedaile A, Hilton DJ, Dunwoodie SL, Brockdorff N, Kay GF, Whitelaw E (2008): *SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation*. Nat Genet; 40: 663-669.

- Bonifazi E, Vallo L, Giardina E, Botta A, Novelli G (2004): *A long PCR-based molecular protocol for detecting normal and expanded ZNF9 alleles in myotonic dystrophy type 2*. *Diagn Mol Pathol*; 13: 164-166.
- Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppee F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M (2008): *An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies*. *EMBO J*; 27: 2766-2779.
- Braida C, Stefanatos RK, Adam B, Mahajan N, Smeets HJ, Niel F, Goizet C, Arveiler B, Koenig M, Lagier-Tourenne C, Mandel JL, Faber CG, de Die-Smulders CE, Spaans F, Monckton DG (2010): *Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients*. *Hum Mol Genet*; 19: 1399-1412.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al. (1992): *Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member*. *Cell*; 68: 799-808.
- Buj-Bello A, Furling D, Tronchere H, Laporte J, Lerouge T, Butler-Browne GS, Mandel JL (2002): *Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells*. *Hum Mol Genet*; 11: 2297-2307.
- Bush EW, Helmke SM, Birnbaum RA, Perryman MB (2000): *Myotonic dystrophy protein kinase domains mediate localization, oligomerization, novel catalytic activity, and autoinhibition*. *Biochemistry*; 39: 8480-8490.
- Cabianca DS, Gabellini D (2010): *The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy*. *J Cell Biol*; 191: 1049-1060.
- Carson NL (2009): *Analysis of repetitive regions in myotonic dystrophy type 1 and 2*. *Curr Protoc Hum Genet*; Chapter 9: Unit 9 6.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003): *ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers*. *Nucleic acids research*; 31: 3568-3571.
- Cass D, Hotchko R, Barber P, Jones K, Gates DP, Berglund JA (2011): *The four Zn fingers of MBNL1 provide a flexible platform for recognition of its RNA binding elements*. *BMC Mol Biol*; 12: 20.
- Chen W, Wang Y, Abe Y, Cheney L, Udd B, Li YP (2007): *Haploinsufficiency for Znf9 in Znf9^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy*. *J Mol Biol*; 368: 8-17.
- Clapp J, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Corcoran AE, Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE (2007): *Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. *Am J Hum Genet*; 81: 264-279.
- Coker H, Brockdorff N (2014): *SMCHD1 accumulates at DNA damage sites and facilitates the repair of DNA double-strand breaks*. *J Cell Sci*; 127: 1869-1874.
- Corpet F (1988): *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. *Nucleic acids research*; 16: 10881-10890.

- Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Giron CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, Juettemann T, Kahari AK, Keenan S, Martin FJ, Maurel T, McLaren W, Murphy DN, Nag R, Overduin B, Parker A, Patricio M, Perry E, Pignatelli M, Riat HS, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Wilder SP, Zadissa A, Aken BL, Birney E, Harrow J, Kinsella R, Muffato M, Ruffier M, Searle SM, Spudich G, Trevanion SJ, Yates A, Zerbino DR, Flicek P (2015): *Ensembl 2015*. Nucleic acids research; 43: D662-669.
- Davis BM, McCurrach ME, Taneja KL, Singer RH, Housman DE (1997): *Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 7388-7393.
- Day JW, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W, Schneider C, Koch MC, Beilman GJ, Harrison AR, Dalton JC, Ranum LP (2003): *Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum*. Neurology; 60: 657-664.
- de Greef JC, Lemmers RJ, Camano P, Day JW, Sacconi S, Dunand M, van Engelen BG, Kiuru-Enari S, Padberg GW, Rosa AL, Desnuelle C, Spuler S, Tarnopolsky M, Venance SL, Frants RR, van der Maarel SM, Tawil R (2010): *Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2*. Neurology; 75: 1548-1554.
- de Greef JC, Lemmers RJ, van Engelen BG, Sacconi S, Venance SL, Frants RR, Tawil R, van der Maarel SM (2009): *Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD*. Human mutation; 30: 1449-1459.
- Deidda G, Cacurri S, Grisanti P, Vigneti E, Piazzo N, Felicetti L (1995): *Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter*. Eur J Hum Genet; 3: 155-167.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C (2009): *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. Nucleic acids research; 37: e67.
- Dixit M, Anseu E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Matteotti C, van Acker AM, Leo O, Foglewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppee F, Chen YW (2007): *DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1*. Proc Natl Acad Sci U S A; 104: 18157-18162.
- Du H, Cline MS, Osborne RJ, Tuttle DL, Clark TA, Donohue JP, Hall MP, Shiue L, Swanson MS, Thornton CA, Ares M, Jr. (2010): *Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy*. Nat Struct Mol Biol; 17: 187-193.
- Edge C, Gooding C, Smith CW (2013): *Dissecting domains necessary for activation and repression of splicing by Muscleblind-like protein 1*. BMC Mol Biol; 14: 29.
- Eger K, Zierz S (2014a): *Dystrophinopathien*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zierz S (eds), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 109-118.
- Eger K, Zierz S (2014b): *Facioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD)*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zierz S (eds), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 118-122.

- Ehrlich M, Jackson K, Tsumagari K, Camano P, Lemmers RJ (2007): *Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD*. Chromosoma; 116: 107-116.
- Eklund A (2015): *The Bee Swarm Plot, an Alternative to Stripchart*. R package version 0.2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/~eklund/eeswarm/>
- ESP: *Exome Variant Server*, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, Accessed March, 2015
- ExAC: *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, <http://exac.broadinstitute.org>, Accessed March, 2015
- Fardaei M, Larkin K, Brook JD, Hamshere MG (2001): *In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts*. Nucleic acids research; 29: 2766-2771.
- Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, Brook JD (2002): *Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells*. Hum Mol Genet; 11: 805-814.
- Fokkema I, den Dunnen JT: *Leiden Open Variaten Database 3.0 (LOVD)*, Leiden University Medical Center, <http://www.lovd.nl/3.0/home>, Accessed May 2015
- Frederic MY, Lalande M, Boileau C, Hamroun D, Claustres M, Beroud C, Collod-Beroud G (2009): *UMD-predictor, a new prediction tool for nucleotide substitution pathogenicity -- application to four genes: FBN1, FBN2, TGFBR1, and TGFBR2*. Human mutation; 30: 952-959.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992): *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A; 89: 1827-1831.
- Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, Jr., King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, et al. (1992): *An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy*. Science; 255: 1256-1258.
- Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, Lopez de Munain A, Sergeant N, Laquerriere A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N (2011): *Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy*. Nat Med; 17: 720-725.
- Gabriels J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A (1999): *Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element*. Gene; 236: 25-32.
- Gehring WJ (1993): *Exploring the homeobox*. Gene; 135: 215-221.
- Gendrel AV, Apedaile A, Coker H, Termanis A, Zvetkova I, Godwin J, Tang YA, Huntley D, Montana G, Taylor S, Giannoulatou E, Heard E, Stancheva I, Brockdorff N (2012): *Smchd1-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome*. Dev Cell; 23: 265-279.

- Gendrel AV, Tang YA, Suzuki M, Godwin J, Nesterova TB, Grealley JM, Heard E, Brockdorff N (2013): *Epigenetic functions of smchd1 repress gene clusters on the inactive X chromosome and on autosomes*. Mol Cell Biol; 33: 3150-3165.
- Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ (2012): *DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy*. Dev Cell; 22: 38-51.
- Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA (2012): *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. Nature; 491: 56-65.
- Goto K, Nishino I, Hayashi YK (2006): *Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord; 16: 256-261.
- Hao M, Akrami K, Wei K, De Diego C, Che N, Ku JH, Tidball J, Graves MC, Shieh PB, Chen F (2008): *Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy*. Dev Dyn; 237: 403-410.
- Harmon EB, Harmon ML, Larsen TD, Yang J, Glasford JW, Perryman MB (2011): *Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity*. J Biol Chem; 286: 40296-40306.
- Harper PS (2001): *Major Problems in Neurology: Myotonic Dystrophy*. Saunders WB, London, UK.
- Hartweck LM, Anderson LJ, Lemmers RJ, Dandapat A, Toso EA, Dalton JC, Tawil R, Day JW, van der Maarel SM, Kyba M (2013): *A focal domain of extreme demethylation within D4Z4 in FSHD2*. Neurology; 80: 392-399.
- Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, et al. (1994): *Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Hum Mol Genet; 3: 1287-1295.
- Hirano T (2006): *At the heart of the chromosome: SMC proteins in action*. Nat Rev Mol Cell Biol; 7: 311-322.
- Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA (2005): *Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy*. Hum Mol Genet; 14: 1539-1547.
- Holinski-Feder E (2011a): *DNA-Untersuchung - Diagnostische Anwendung beim Menschen*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (eds), *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 8 edn, Thieme, Stuttgart, pp 103-135.
- Holinski-Feder E (2011b): *Mutationen beim Menschen und ihre Folgen*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (eds), *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 8 edn, Thieme, Stuttgart, pp 49-89.
- Holt I, Jacquemin V, Fardeai M, Sewry CA, Butler-Browne GS, Furling D, Brook JD, Morris GE (2009): *Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle*. Am J Pathol; 174: 216-227.
- Hunter A, Tsilfidis C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L, Korneluk R (1992): *The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy*. Journal of medical genetics; 29: 774-779.

- IDMC (2000): *New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC)*. *Neurology*; 54: 1218-1221.
- Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, Jap PH, Coerwinkel M, Oerlemans F, van den Broek W, Gohlsch B, Pette D, Plomp JJ, Molenaar PC, Nederhoff MG, van Echteld CJ, Dekker M, Berns A, Hameister H, Wieringa B (1996): *Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice*. *Nat Genet*; 13: 316-324.
- Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, Nillesen W, Smeets H, Vits L, Howeler C, Brunner H, Wieringa B (1994): *Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm*. *Am J Hum Genet*; 54: 575-585.
- Jog SP, Paul S, Dansithong W, Tring S, Comai L, Reddy S (2012): *RNA splicing is responsive to MBNL1 dose*. *PLoS One*; 7: e48825.
- Jorden B, Zierz S (2014): *Myasthenia gravis und myasthene Syndrome*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 311-339.
- Kaliman P, Catalucci D, Lam JT, Kondo R, Gutierrez JC, Reddy S, Palacin M, Zorzano A, Chien KR, Ruiz-Lozano P (2005): *Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*; 280: 8016-8021.
- Kalsotra A, Xiao X, Ward AJ, Castle JC, Johnson JM, Burge CB, Cooper TA (2008): *A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105: 20333-20338.
- Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, Timmers AM, Hauswirth WW, Swanson MS (2003): *A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy*. *Science*; 302: 1978-1980.
- Kaplan JC, Hamroun D: *Genetable of Neuromuscular Disorders*, World Muscle Society, <http://www.musclegenetable.fr/>, Accessed May 2015
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002): *The human genome browser at UCSC*. *Genome research*; 12: 996-1006.
- Kornhuber M, Zierz S (2014): *Myotonien und muskuläre Ionenkanalerkrankungen*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 191-208.
- Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, Arias C, Corona ED, Nunez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppee F, Rosa AL (2007): *The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein*. *Neuromuscul Disord*; 17: 611-623.
- Kraya T, Jordan B, Kornhuber M, Zierz S (2014): *Spezielle Diagnostik*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 91-107.
- Kraya T, Zierz S (2014): *Allgemeine klinische Symptomatik*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 66-90.

- Krumsiek J, Arnold R, Rattei T (2007): *Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale*. *Bioinformatics*; 23: 1026-1028.
- Kruse B, Wohrle D, Steinbach P, Gal A (2008): *Does proximal myotonic myopathy show anticipation?* *Human mutation*; 29: E100-102.
- Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA (2007): *Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation*. *Mol Cell*; 28: 68-78.
- Ladd AN, Charlet N, Cooper TA (2001): *The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing*. *Mol Cell Biol*; 21: 1285-1296.
- Laforet P, de Toma C, Eymard B, Becane HM, Jeanpierre M, Fardeau M, Duboc D (1998): *Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy*. *Neurology*; 51: 1454-1456.
- Larsen M (2011): *Diagnostik der Facioscapulohumeralen Muskeldystrophie (FSHD): Vergleich der Methoden Molecular Combing und Southern Blot*. Diploma thesis, University of Würzburg, Würzburg.
- Larsen M, Rost S, El Hajj N, Ferbert A, Deschauer M, Walter MC, Schoser B, Tacik P, Kress W, Muller CR (2015): *Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1*. *Eur J Hum Genet*; 23: 808-816.
- Lee JE, Lee JY, Wilusz J, Tian B, Wilusz CJ (2010): *Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells*. *PLoS One*; 5: e11201.
- Lee KY, Li M, Manchanda M, Batra R, Charizanis K, Mohan A, Warren SA, Chamberlain CM, Finn D, Hong H, Ashraf H, Kasahara H, Ranum LP, Swanson MS (2013): *Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy*. *EMBO Mol Med*; 5: 1887-1900.
- Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, Camano P, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, Miller DG, Upadhyaya M, Verschuuren JJ, Lopez de Munain Arregui A, van Engelen BG, Padberg GW, Sacconi S, Tawil R, Tapscott SJ, Bakker B, van der Maarel SM (2015): *Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2*. *Hum Mol Genet*; 24: 659-669.
- Lemmers RJ, O'Shea S, Padberg GW, Lunt PW, van der Maarel SM (2012a): *Best practice guidelines on genetic diagnostics of Facioscapulohumeral muscular dystrophy: workshop 9th June 2010, LUMC, Leiden, The Netherlands*. *Neuromuscul Disord*; 22: 463-470.
- Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Donlin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma-Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM (2012b): *Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2*. *Nat Genet*; 44: 1370-1374.

- Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM (2010a): *A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Science; 329: 1650-1653.
- Lemmers RJ, van der Vliet PJ, van der Gaag KJ, Zuniga S, Frants RR, de Knijff P, van der Maarel SM (2010b): *Worldwide population analysis of the 4q and 10q subtelomeres identifies only four discrete interchromosomal sequence transfers in human evolution*. Am J Hum Genet; 86: 364-377.
- Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2004a): *Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Am J Hum Genet; 75: 44-53.
- Lemmers RJ, Wohlgemuth M, Frants RR, Padberg GW, Morava E, van der Maarel SM (2004b): *Contractions of D4Z4 on 4qB subtelomeres do not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Am J Hum Genet; 75: 1124-1130.
- Lemmers RJ, Wohlgemuth M, van der Gaag KJ, van der Vliet PJ, van Teijlingen CM, de Knijff P, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2007): *Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Am J Hum Genet; 81: 884-894.
- Lemmers RJL, de Kievit P, van Geel M, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2001): *Complete allele information in the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by triple DNA analysis*. Ann Neurol; 50: 816-819.
- Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, Swanson MS, Thornton CA (2006): *Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy*. Hum Mol Genet; 15: 2087-2097.
- Liquori CL, Ikeda Y, Weatherspoon M, Ricker K, Schoser BG, Dalton JC, Day JW, Ranum LP (2003): *Myotonic dystrophy type 2: human founder haplotype and evolutionary conservation of the repeat tract*. Am J Hum Genet; 73: 849-862.
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP (2001): *Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9*. Science; 293: 864-867.
- Lunt PW (1998): *44th ENMC International Workshop: Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Molecular Studies 19-21 July 1996, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord; 8: 126-130.
- Lunt PW, Jardine PE, Koch MC, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M (1995): *Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or at wheelchair use, with a possible generational effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)*. Hum Mol Genet; 4: 951-958.
- Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcelo J, O'Hoy K, et al. (1992): *Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene*. Science; 255: 1253-1255.

- Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton CA (2000): *Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat*. Science; 289: 1769-1773.
- Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA (2002): *Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy*. Mol Cell; 10: 35-44.
- Meola G, Cardani R (2015): *Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms*. Biochim Biophys Acta; 1852: 594-606.
- Metzker ML (2010): *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet; 11: 31-46.
- Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A (1997): *Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies*. Science; 277: 1518-1523.
- Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS (2000): *Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy*. EMBO J; 19: 4439-4448.
- Mould AW, Pang Z, Pakusch M, Tonks ID, Stark M, Carrie D, Mukhopadhyay P, Seidel A, Ellis JJ, Deakin J, Wakefield MJ, Krause L, Blewitt ME, Kay GF (2013): *Smchd1 regulates a subset of autosomal genes subject to monoallelic expression in addition to being critical for X inactivation*. Epigenetics Chromatin; 6: 19.
- Moxley RT, 3rd (1998): *54th ENMC International Workshop: PROMM (proximal myotonic myopathies) and other proximal myotonic syndromes. 10-12th October 1997, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord; 8: 508-518.
- Müller T, Zierz S (2014a): *Normale Anatomie der Skelettmuskulatur*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 19-39.
- Müller T, Zierz S (2014b): *Pathologie der Skelettmuskulatur*, in: Zierz S (ed), *Muskelerkrankungen*. 4 edn, Thieme, Stuttgart, pp 40-65.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 51 Pt 1: 263-273.
- Muranyi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF, Hartshorne DJ (2001): *Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity*. FEBS Lett; 493: 80-84.
- Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (2011): *Taschenlehrbuch Humangenetik*, 8 edn. Thieme, Stuttgart.
- Murken J, Zerres K (2011): *Humangenetische Beratung*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (eds), *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 8 edn, Thieme, Stuttgart, pp 384-396.
- Nakamori M, Sobczak K, Moxley RT, 3rd, Thornton CA (2009): *Scaled-down genetic analysis of myotonic dystrophy type 1 and type 2*. Neuromuscul Disord; 19: 759-762.

- Nakamori M, Sobczak K, Puwanant A, Welle S, Eichinger K, Pandya S, Dekdebrun J, Heatwole CR, McDermott MP, Chen T, Cline M, Tawil R, Osborne RJ, Wheeler TM, Swanson MS, Moxley RT, 3rd, Thornton CA (2013): *Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy*. *Ann Neurol*; 74: 862-872.
- Napierala M, Krzyzosiak WJ (1997): *CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins*. *J Biol Chem*; 272: 31079-31085.
- Ng PC, Henikoff S (2001): *Predicting deleterious amino acid substitutions*. *Genome research*; 11: 863-874.
- Nguyen K, Walrafen P, Bernard R, Attarian S, Chaix C, Vovan C, Renard E, Dufrane N, Pouget J, Vannier A, Bensimon A, Levy N (2011): *Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy*. *Ann Neurol*; 70: 627-633.
- Orengo JP, Chambon P, Metzger D, Mosier DR, Snipes GJ, Cooper TA (2008): *Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105: 2646-2651.
- Orstavik KH (2006): *Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases*. *Acta Paediatr Suppl*; 95: 24-29.
- Osborne RJ, Lin X, Welle S, Sobczak K, O'Rourke JR, Swanson MS, Thornton CA (2009): *Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy*. *Hum Mol Genet*; 18: 1471-1481.
- Padberg GW, Brouwer OF, de Keizer RJ, Dijkman G, Wijmenga C, Grote JJ, Frants RR (1995): *On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. *Muscle Nerve Suppl*: S73-80.
- Padberg GW, Lunt P, Koch M, Fardeau M (1991): *Diagnostic Criteria for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophie*. *Neuromuscular Disorders*; 1: 231-234.
- Padberg GWAM (1982): *Facioscapulohumeral disease*. PhD thesis, Leiden University, Leiden.
- Pandya S, King WM, Tawil R (2008): *Facioscapulohumeral dystrophy*. *Phys Ther*; 88: 105-113.
- Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD (2005): *Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations*. *Nat Rev Genet*; 6: 729-742.
- Pertea M, Lin X, Salzberg SL (2001): *GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction*. *Nucleic acids research*; 29: 1185-1190.
- Poulos MG, Batra R, Li M, Yuan Y, Zhang C, Darnell RB, Swanson MS (2013): *Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice*. *Hum Mol Genet*; 22: 3547-3558.
- R Core Team (2015): *R: A language and environment for statistical computing*. R version 3.0.2, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org/>
- Radvansky J, Kadasi L (2010): *The expanding world of myotonic dystrophies: how can they be detected?* *Genet Test Mol Biomarkers*; 14: 733-741.

- Raheem O, Olufemi SE, Bachinski LL, Vihola A, Sirito M, Holmlund-Hampf J, Haapasalo H, Li YP, Udd B, Krahe R (2010): *Mutant (CCTG)_n expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 (ZNF9) in myotonic dystrophy type 2*. Am J Pathol; 177: 3025-3036.
- Rajavashisth TB, Taylor AK, Andalibi A, Svenson KL, Lusic AJ (1989): *Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element*. Science; 245: 640-643.
- Ranum LP, Cooper TA (2006): *RNA-mediated neuromuscular disorders*. Annu Rev Neurosci; 29: 259-277.
- Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD, Day JW (1998): *Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus*. Nat Genet; 19: 196-198.
- Rau F, Laine J, Ramanoudjame L, Ferry A, Arandel L, Delalande O, Jollet A, Dingli F, Lee KY, Peccate C, Lorain S, Kabashi E, Athanasopoulos T, Koo T, Loew D, Swanson MS, Le Rumeur E, Dickson G, Allamand V, Marie J, Furling D (2015): *Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy*. Nat Commun; 6: 7205.
- Reed PW, Corse AM, Porter NC, Flanigan KM, Bloch RJ (2007): *Abnormal expression of mu-crystallin in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Exp Neurol; 205: 583-586.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997): *Improved splice site detection in Genie*. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology; 4: 311-323.
- Richards M, Coppee F, Thomas N, Belayew A, Upadhyaya M (2012): *Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled?* Hum Genet; 131: 325-340.
- Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT, 3rd (1994): *Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts*. Neurology; 44: 1448-1452.
- Roberts R (2010): *The genetic landscape from single gene to polygenic disorders*. Curr Opin Cardiol; 25: 179-181.
- Rochette J, Le Gac G, Lassoued K, Ferec C, Robson KJ (2010): *Factors influencing disease phenotype and penetrance in HFE haemochromatosis*. Hum Genet; 128: 233-248.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998): *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science; 281: 363, 365.
- Sacconi S, Lemmers RJ, Balog J, van der Vliet PJ, Lahaut P, van Nieuwenhuizen MP, Straasheijm KR, Debipersad RD, Vos-Versteeg M, Salviati L, Casarin A, Pegoraro E, Tawil R, Bakker E, Tapscott SJ, Desnuelle C, van der Maarel SM (2013): *The FSHD2 gene SMCHD1 is a modifier of disease severity in families affected by FSHD1*. Am J Hum Genet; 93: 744-751.
- Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E (2000): *X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation*. Dev Biol; 225: 294-303.
- Salisbury E, Schoser B, Schneider-Gold C, Wang GL, Huichalaf C, Jin B, Sirito M, Sarkar P, Krahe R, Timchenko NA, Timchenko LT (2009): *Expression of RNA CCUG repeats dysregulates*

translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. Am J Pathol; 175: 748-762.

Sallinen R, Vihola A, Bachinski LL, Huoponen K, Haapasalo H, Hackman P, Zhang S, Sirito M, Kalimo H, Meola G, Horelli-Kuitunen N, Wessman M, Krahe R, Udd B (2004): *New methods for molecular diagnosis and demonstration of the (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2).* Neuromuscul Disord; 14: 274-283.

Sammons MA, Antons AK, Bendjennat M, Udd B, Krahe R, Link AJ (2010): *ZNF9 activation of IRES-mediated translation of the human ODC mRNA is decreased in myotonic dystrophy type 2.* PLoS One; 5: e9301.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A; 74: 5463-5467.

Savkur RS, Philips AV, Cooper TA (2001): *Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy.* Nat Genet; 29: 40-47.

Schneider C, Ziegler A, Ricker K, Grimm T, Kress W, Reimers CD, Meinck H, Reiners K, Toyka KV (2000): *Proximal myotonic myopathy: evidence for anticipation in families with linkage to chromosome 3q.* Neurology; 55: 383-388.

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D (2010): *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.* Nature methods; 7: 575-576.

Scionti I, Fabbri G, Fiorillo C, Ricci G, Greco F, D'Amico R, Termanini A, Vercelli L, Tomelleri G, Cao M, Santoro L, Percesepe A, Tupler R (2012): *Facioscapulohumeral muscular dystrophy: new insights from compound heterozygotes and implication for prenatal genetic counselling.* Journal of medical genetics; 49: 171-178.

Shelbourne P, Davies J, Buxton J, Anvret M, Blennow E, Bonduelle M, Schmedding E, Glass I, Lindenbaum R, Lane R, et al. (1993): *Direct diagnosis of myotonic dystrophy with a disease-specific DNA marker.* N Engl J Med; 328: 471-475.

Snider L, Asawachaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, Maves L, Miller DG, Lemmers RJ, Winokur ST, Tawil R, van der Maarel SM, Filippova GN, Tapscott SJ (2009): *RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy.* Hum Mol Genet; 18: 2414-2430.

Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Miller DG (2010): *Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene.* PLoS Genet; 6: e1001181.

Southern EM (1975): *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J Mol Biol; 98: 503-517.

Speicher M (2011): *Chromosomen des Menschen*, in: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (eds), *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 8 edn, Thieme, Stuttgart, pp 139-179.

Squillace RM, Chenault DM, Wang EH (2002): *Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR.* Dev Biol; 250: 218-230.

Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavare S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET

- (2007): *Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes*. Science; 315: 848-853.
- Taneja KL, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer RH (1995): *Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues*. J Cell Biol; 128: 995-1002.
- Tang M, Li Y, Zhang X, Deng T, Zhou Z, Ma W, Songyang Z (2014): *Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 (SMCHD1) promotes non-homologous end joining and inhibits homologous recombination repair upon DNA damage*. J Biol Chem; 289: 34024-34032.
- Tassin A, Laoudj-Chenivesse D, Vanderplanck C, Barro M, Charron S, Anseau E, Chen YW, Mercier J, Coppee F, Belayew A (2013): *DUX4 expression in FSHD muscle cells: how could such a rare protein cause a myopathy?* J Cell Mol Med; 17: 76-89.
- Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ (2014): *Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology*. Skelet Muscle; 4: 12.
- Teplova M, Patel DJ (2008): *Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1*. Nat Struct Mol Biol; 15: 1343-1351.
- Thornton CA, Johnson K, Moxley RT, 3rd (1994): *Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes*. Ann Neurol; 35: 104-107.
- Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Lin L, Roberts R, Caskey CT, Swanson MS (1996): *Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy*. Nucleic acids research; 24: 4407-4414.
- Timchenko NA, Patel R, Iakova P, Cai ZJ, Quan L, Timchenko LT (2004): *Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis*. J Biol Chem; 279: 13129-13139.
- Tost J, Dunker J, Gut IG (2003): *Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing*. Biotechniques; 35: 152-156.
- Tsumagari K, Chen D, Hackman JR, Bossler AD, Ehrlich M (2010): *FSH dystrophy and a subtelomeric 4q haplotype: a new assay and associations with disease*. Journal of medical genetics; 47: 745-751.
- Tupler R, Berardinelli A, Barbierato L, Frants R, Hewitt JE, Lanzi G, Maraschio P, Tiepolo L (1996): *Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy*. Journal of medical genetics; 33: 366-370.
- Udd B, Krahe R (2012): *The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges*. Lancet Neurol; 11: 891-905.
- Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum L, Day J, Bassez G, Ricker K (2003): *Report of the 115th ENMC workshop: DM2/PROMM and other myotonic dystrophies. 3rd Workshop, 14-16 February 2003, Naarden, The Netherlands*. Neuromuscul Disord; 13: 589-596.
- Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum LP, Bassez G, Kress W, Schoser B, Moxley R (2006): *140th ENMC International Workshop: Myotonic Dystrophy DM2/PROMM and other myotonic dystrophies with guidelines on management*. Neuromuscul Disord; 16: 403-413.

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012): *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic acids research; 40: e115.
- Upadhyaya M, Lunt PW, Sarfarazi M, Broadhead W, Daniels J, Owen M, Harper PS (1990): *DNA marker applicable to presymptomatic and prenatal diagnosis of facioscapulohumeral disease*. Lancet; 336: 1320-1321.
- Upadhyaya M, Maynard J, Rogers MT, Lunt PW, Jardine P, Ravine D, Harper PS (1997): *Improved molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): validation of the differential double digestion for FSHD*. Journal of medical genetics; 34: 476-479.
- Utermann G (2005): *Modifier Gene als Ursache phänotypischer Diversität*. Medizinische Genetik; 17: 139-141.
- van den Boogaard ML, Jfl Lemmers R, Camano P, van der Vliet PJ, Voermans N, van Engelen BG, Lopez de Munain A, Tapscott SJ, van der Stoep N, Tawil R, van der Maarel SM (2015): *Double SMCHD1 variants in FSHD2: the synergistic effect of two SMCHD1 variants on D4Z4 hypomethylation and disease penetrance in FSHD2*. Eur J Hum Genet.
- van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE (2002): *Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin*. Genomics; 79: 210-217.
- Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD (2010): *Next generation sequencing for clinical diagnostics--principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology*. J Mol Diagn; 12: 539-551.
- Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ (2011): *DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo*. Ann Neurol; 69: 540-552.
- Ward AJ, Rimer M, Killian JM, Dowling JJ, Cooper TA (2010): *CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1*. Hum Mol Genet; 19: 3614-3622.
- Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF, Moerer P, Weber JL, Padberg GW (1990): *Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4*. Lancet; 336: 651-653.
- Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM (2003): *Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation*. Hum Mol Genet; 12: 2895-2907.
- Wolf B, Kuonen P, Dandekar T, Atlan D (2015): *DNaseq Workflow in a Diagnostic Context and an Example of a User Friendly Implementation*. BioMed Research International; 2015: 11.
- Wright TJ, Wijmenga C, Clark LN, Frants RR, Williamson R, Hewitt JE (1993): *Fine mapping of the FSHD gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13E-11*. Hum Mol Genet; 2: 1673-1678.
- Wutz A (2011): *Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation*. Nat Rev Genet; 12: 542-553.

- Yeo G, Burge CB (2004): *Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals*. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology; 11: 377-394.
- Young JM, Whiddon JL, Yao Z, Kasinathan B, Snider L, Geng LN, Balog J, Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ (2013): *DUX4 binding to retroelements creates promoters that are active in FSHD muscle and testis*. PLoS Genet; 9: e1003947.
- Yuan Y, Compton SA, Sobczak K, Stenberg MG, Thornton CA, Griffith JD, Swanson MS (2007): *Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs*. Nucleic acids research; 35: 5474-5486.
- Zatz M, Marie SK, Cerqueira A, Vainzof M, Pavanello RC, Passos-Bueno MR (1998): *The facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1) gene affects males more severely and more frequently than females*. Am J Med Genet; 77: 155-161.
- Zatz M, Marie SK, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira A, Wijmenga C, Padberg G, Frants R (1995): *High proportion of new mutations and possible anticipation in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy families*. Am J Hum Genet; 56: 99-105.
- Zernant J, Schubert C, Im KM, Burke T, Brown CM, Fishman GA, Tsang SH, Gouras P, Dean M, Allikmets R (2011): *Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing*. Invest Ophthalmol Vis Sci; 52: 8479-8487.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AA	Standard-Arbeitsanweisung des Diagnostiklabors der Universität Würzburg
A.dest	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CK	Creatinkinase
CNV	Kopienzahl Veränderung (<i>copy number variation</i>)
CTP	Cytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DM	Myotone Dystrophie (<i>dystrophia myotonica</i>)
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoxynukleotid
D-ORF	zerstört das Leseraster (<i>disrupting ORF</i>)
DR1	Region extremer Demethylierung
dT	Deoxythymin
EBD	<i>exon-bordering domain</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EMD	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie
EMG	Elektromyographie
emPCR	Emulsions-PCR
ERV	endogenes retrovirales Element
ESE	<i>exonic splicing enhancers</i>
ESP	<i>Exome Sequencing Project</i>
EW	Erwartungswert
Ex	Exon
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
Exo	Exonuclease
expRNA	expandierte CUG/CCUG Repeat RNA
FAM	6-Carboxyfluorescein
FSHD	Facioscapulohumerale Muskeldystrophie
G	Guanin
H+E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
hetero	heterozygot
homo	homozygot
Int	Intron

K	Kontrolle
KF	Korrekturfaktor
Konz.	Konzentration
LGE	Lineare Gelelektrophorese
LGMD	Gliedergürtel Muskeldystrophie (<i>Limb-Girdle Muscular Dystropie</i>)
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	methyliert
MAF	geringe Allelfrequenz (<i>minor allele frequency</i>)
MaLR	<i>mammalian apparent LTR-Retrotransposons</i>
MG	Myasthenia gravis
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIM	Mendelian Inheritance in Man
MLPA	multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
Mut	Mutation
mutRNA	mutierte RNA
N	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NLS	Kernlokalisations-Signal (<i>nuclear localization signal</i>)
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKC	Proteinkinase C
PmE	Potenzial motorischer Einheiten
poly-A-Signal	Polyadenylierungs-Signal
P-ORF	erhält das Leseraster (<i>preventing ORF</i>)
PPi	Pyrophosphat
PROMM	Proximale Myotone Muskeldystrophie
Pyro	Pyrosequenzierung
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SB	Southern Blot
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SMC	<i>structural maintenance of chromosomes</i>
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>

SSC-Puffer	Standard Sodium Citrat Puffer
SSLP	Einfacher Sequenzlängen-Polymorphismus (<i>single sequence length polymorphism</i>)
SSPE	Standard Sodium Phosphat EDTA Puffer
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Temp.	Temperatur
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TMD	Tibiale Muskeldystrophie
TP-PCR	<i>triplet/tetraplet repeat primed PCR</i>
U	Uracil
UM	unmethyliert
UTR	untranslatierten Region
UV	unklassifizierte Variante (<i>unclassified variants</i>)
WT	Wildtyp
wtRNA	wildtypische RNA
XI	X-Inaktivierung
Xi	inaktives X-Chromosom
XIC	X-Inaktivierungszentrum
XIST	<i>X inaktive specific transcript</i>
ZnF	Zinkfinger
ZNS	Zentralnervensystem

7 ANLAGE

7.1 Primerlisten

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Die Primer sind nach Methoden sortiert aufgelistet. Je nach Methode sind neben Name und Sequenz Angaben zu dem Gen, Transkript, Exon und Primer-Version angeführt. Der spezifische Primer ist durch Großbuchstaben angegeben, Tags mit Kleinbuchstaben.

Nr	Methode	Name	Version	Forward-Primer	Reverse-Primer
1	Molecular	DM1_1	V1	CTCTACGAAAGCAGGGTCTCC	AAGACCCCAAGTCACACATC
2	Combing	DM1_2	V2	TCAAAATGCCACATCACCCT	TCTGGGAAATGGGAAGTCAG
3	DM1-Sonden	DM1_3	V1	CCACACACGCTTCTTTGAAC	TTGAAATGCTGCCACTGAAAG
4		DM1_4a	V2	GGACTACAGGCAGGAGCAAC	GGAAAATGGGGTTCATTCCT
5		DM1_4b	V1	GCAGTCCAGACCTTGAGTC	GAGAGCACTGGGAGGAATGG
6		DM1_4c	V1	CAATCCAAAAGCTCCACTCC	AGAATGTACAGGGCTCAAG
7		dDM1_1a	V1	ACAGATGTAGACAGCAGTGG	GACTGAGAGATGGGCTGGAC
8		dDM1_1b	V3	CAATCAGCCCTCTCAGAAGTCAA	CTGGCTCCATTACTTACCGCTTT
9		dDM1_1c	V1	GCCAAAGCGGTAAGTAATGG	GGTATCCCAGAAAATGATGG
10		dDM1_1d	FII RIV	GTAGTCCCTAAACCGCCACA	GAAATGGGGTGGACAGAAA
11		dDM1_2a	V1	CAGAGGGGAGAAATGCTGAAG	GCATTGCACAAATCCAGTCCAC
12		dDM1_2b	V3	TTCGTGTTCTCCGCCATCTTGTA	CTTCATCAGCATGGATGACGACT
13		dDM1_2c	V1	AGATCATCTGGGGATAGGG	GTGAGGGAACACTCAGCCTTG
14		dDM1_2d	V1	GTCCCAACACAGACTCCAC	TCAAGGAGGGGACTTGTACG
15	Molecular	DM2_1a	V2	CGGCCATACATTTGTTAGGTT	CTGCACTCCAGGTCACACAGA
16	Combing	DM2_1b	V1	ATGGCTCCCTGCAGTGTAAAG	AGCTTTGTTGGCCAAATCC
17	DM2-Sonden	DM2_2b	V1	GAGGGAACAATGCCCTAATG	GAAAGGCACCTCCCATTTCTG
18		DM2_2c	V1	TTTTTCAGCACCTTTGTGTGC	AAGGACAGGGCACATAGACC
19		DM2_3a	V2	TGTTCCCTGGATCAGACCTC	TTGTAGTCGGACGAGGAAGG
20		DM2_3b	V2	CCACACCCTGAACACACAATGA	CGGACAAAATGGGTCCAAFTA
21		dDM2_1b-a	V3	TCCCAATGAAGAAACAGGTC	AAGCCCTTATGAGATGTGG
22		dDM2_1b-b	FIII RIII	AAGGGCTTAAATGGCTGATT	TGAGATTTTGCACGACAGGA
23		dDM2_1c	V1	ACTCAGCATATTCAGCACCAG	AAAAACAGAAAAGCGTGTGG
24		dDM2_1d	V1	GAAAGCCAGAGAAATGCCAAG	TCCAGGCAGAGTATGTGCAG
25		dDM2_2a	V1	TTGATAGGGGAGTCTCAC	GGATGCTGGAAGGACACTAC
26		dDM2_2b	V1	AGTCCTGAATAGCCGCAGAC	ACACTTTGTCCACTGCATCC
27		dDM2_2c	V1	GGACTGAAGGAGGAATGCTG	AGAGAGCAGGTGCCAGTTTC

Nr	Methode	Gen_Transkript	Name	Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer
28	NGS_DM3	MBNL1-004	MBNL1_1	Ex02	acactgacgacatggttctacaGGGTTGGGTTTGTGGTTTC	tacggtagcagagacttgggtctagCCAAACAATCAACACACT
29		MBNL1-004	MBNL1_2	Ex03	acactgacgacatggttctacaCATTCAGTGGGTTGGTTTC	tacggtagcagagacttgggtctGGCAACTGAAATGTTGCCGTGTG
30		MBNL1-004	MBNL1_3	Ex04	acactgacgacatggttctacaTGGATAGATGGATGGAGGACAAA	tacggtagcagagacttgggtctGGCCATGGAACAACACAAAACAAA
31		MBNL1-004	MBNL1_4	Ex05	acactgacgacatggttctacaTCTGTCCAGAGCTTGGACITTTA	tacggtagcagagacttgggtctGTAAACAAGAGAGAGACTGATA
32		MBNL1-201	MBNL1_5	Ex06	acactgacgacatggttctacaCACCTCTGCTTGGTGTATTATGT	tacggtagcagagacttgggtctGTTAAACTGAATGTGGGCTGCTGT
33		MBNL1-004	MBNL1_6	Ex06	acactgacgacatggttctacaTTCCTGGCTGCTGCTTCCCTAAC	tacggtagcagagacttgggtctTACAAACAACCTGGGTTGGTGTG
34		MBNL1-004	MBNL1_7	Ex07	acactgacgacatggttctacaAAACAAGTGTACAGCACACAG	tacggtagcagagacttgggtctGGGAAATGGACTTCCCAATAAGA
35		MBNL1-004	MBNL1_8	Ex08	acactgacgacatggttctacaCTGTCACATGGCTTATTGCTGTG	tacggtagcagagacttgggtctCCCCATGCTTATAAAGCACCCCT
36		MBNL1-011	MBNL1_9	Ex06	acactgacgacatggttctacaTTTTGCAATGCTGTGACCAT	tacggtagcagagacttgggtctCAAATGGCACGAAATGTGCTCC
37		MBNL1-004	MBNL1_10	Ex09	acactgacgacatggttctacaACAGATAGGACTATCACCTACACA	tacggtagcagagacttgggtctCTGATATAAATTCCTCACACCCA
38	NGS_DM3	CELF1-001	CELF1_1	Ex15	acactgacgacatggttctacaTCAGGGCTTCGAATCATTAAGGG	tacggtagcagagacttgggtctCCAGATTTCTTGTCCTGCTGAA
39		CELF1-001	CELF1_2	Ex14	acactgacgacatggttctacaGTGAGCTCTCTTTCTCAGTGG	tacggtagcagagacttgggtctTTTGCCTTTGGTTCCTTGGCTTTG
40		CELF1-001	CELF1_3	Ex13	acactgacgacatggttctacaCAATGGTCTGACGACCTTAAGT	tacggtagcagagacttgggtctTCCCTCTCTAGATGTCACCAAG
41		CELF1-001	CELF1_4	Ex12	acactgacgacatggttctacaacacctggccctCATGATTAAT	tacggtagcagagacttgggtctTCCGCAAGGACAGTGTGTAGAAT
42		CELF1-001	CELF1_5	Ex11	acactgacgacatggttctacaGGCCACAGCACATGAAAATCAG	tacggtagcagagacttgggtctGTGAAATGGATAAAGAACCCCT
43		CELF1-001	CELF1_6	Ex10	acactgacgacatggttctacaCTAAAGGTTAGGAGCACCAG	tacggtagcagagacttgggtctAGTTATCCAGATGCCAGAACCCAG
44		CELF1-001	CELF1_7	Ex09	acactgacgacatggttctacaTAAATGCCACTGTGTTGTTGGC	tacggtagcagagacttgggtctACCTGCATGCTCCAAAAGGAA
45		CELF1-001	CELF1_8	Ex08	acactgacgacatggttctacaCTTTAATGGCCAACTGTCCCA	tacggtagcagagacttgggtctCCTCCCTTCTCCTGTCAAGCAAT
46		CELF1-001	CELF1_9	Ex07	acactgacgacatggttctacaCCCAACCAACCAACCAACAA	tacggtagcagagacttgggtctCAAAATGTGTCTTTGAACTGTAA
47		CELF1-001	CELF1_10	Ex06	acactgacgacatggttctacaGAGCCCTCAAGCAATCCATCTGT	tacggtagcagagacttgggtctACTCACATCTGTTTTCTGGGGAA
48		CELF1-001	CELF1_11	Ex05	acactgacgacatggttctacaTCCCTGACAGTTACCTTTTCC	tacggtagcagagacttgggtctCGTTCCTTTTCCACTACCCTCC
49		CELF1-001	CELF1_12	Ex04	acactgacgacatggttctacaGTTTAAACCCCAAGCCCTTACC	tacggtagcagagacttgggtctGAAAATTTCTCTGGAAAGCAACA
50		CELF1-001	CELF1_13	Ex03	acactgacgacatggttctacaCAGGTTGTTTGGCTCTCTTCCC	tacggtagcagagacttgggtctCTGTGGCACTTATTTGCTGTTTTC
51		CELF1001_ex2_1	CELF1001_ex2_1	Ex02	acactgacgacatggttctacaCTGAAGGCTCCCAATTTCAACA	tacggtagcagagacttgggtctTTTTGGATGATGACGCTGTGGACA
52		DMPK-001	DMPK_1	Ex15	acactgacgacatggttctacaCTCGGAGGGTTGTGAAC	tacggtagcagagacttgggtctAGTCCAGGAGGCAATCAG
53		DMPK-001	DMPK_2	Ex14	acactgacgacatggttctacaAACTCGTCAATGGCTGCTCCTA	tacggtagcagagacttgggtctGGGATCTCCTAGATAACCTCCC
54		DMPK-001	DMPK_3	Ex13	acactgacgacatggttctacaTCTGCCCTTAAAGTCGCAAG	tacggtagcagagacttgggtctCAGGTGAGTCCCTCAIGTGTCT
55		DMPK-001	DMPK_4	Ex12	acactgacgacatggttctacaCTGGAAGGAGAGAAAAGGGCAT	tacggtagcagagacttgggtctAACTCCGACAGTCCGGAT
56		DMPK-001	DMPK_5	Ex11	acactgacgacatggttctacaCTGAGTTGACTGGGAGGTTAA	tacggtagcagagacttgggtctTGAGTCTTCCAGGAGCCACAG
57		DMPK-001	DMPK_6	Ex10	acactgacgacatggttctacaTGGTTTCTGTCTCTTCTGTTCA	tacggtagcagagacttgggtctCAAAATCAGGAGGTTTGGAAAGC
58		DMPK-001	DMPK_7	Ex09	acactgacgacatggttctacaCCAGTCTGTGACTCTGAGGTTT	tacggtagcagagacttgggtctGCTGCTCAATCTGTGTGCTTTG
59		DMPK-004	DMPK_8	Ex08	acactgacgacatggttctacaAGGACGTCTTCTTCACTCAACT	tacggtagcagagacttgggtctTAGCGCTCCAGGCTAT
60		DMPK-001	DMPK_9	Ex07	acactgacgacatggttctacaCACAGCAACCCGCTGAATGAAG	tacggtagcagagacttgggtctGCCTGCTCTGCTCTCTTTT
61		DMPK-001	DMPK_10	Ex06	acactgacgacatggttctacaCTCTTTTCCCTCCAAATCCAGT	tacggtagcagagacttgggtctCTGGAGGAGACCTTCTTTGGTTG
62		DMPK-001	DMPK_11	Ex05	acactgacgacatggttctacaTCTACAGTCTGACCCCTACTCC	tacggtagcagagacttgggtctTACCAACCCCATGACGAAAC
63		DMPK-001	DMPK_12	Ex03 u. Ex04	acactgacgacatggttctacaGACAGCAGGGCTCTTGT	tacggtagcagagacttgggtctTTTTGTTTTCCCGCCGCTC
64		DMPK-001	DMPK_14	Ex01	acactgacgacatggttctacaGATAGGACAGAAAATGTTGCC	tacggtagcagagacttgggtctGAGGGCCATGGTGTG
65		DMPK-001	DMPK_t12_1_1	3'-UTR	acactgacgacatggttctacaCTCCGGCCCAACAG	tacggtagcagagacttgggtctCATACGCGCTCCTCTCTGG
66		DMPK-001	DMPK_t12_1_2	3'-UTR	acactgacgacatggttctacaTGGCAAAAGCAAAATTTCCCGAG	tacggtagcagagacttgggtctGAACGGGCTCCGAAGG
67		DMPK-001	DMPK_t12_1_3	3'-UTR	acactgacgacatggttctacaGGCCGAAAAGAAAATGGTCTG	tacggtagcagagacttgggtctCCTGAACCTAGAATGCTCTTCG
68		DMPK-001	DMPK_t12_2_1	Ex02	acactgacgacatggttctacaGCCCAACCCCTATGCC	tacggtagcagagacttgggtctTCTCAGGATCTCACCTCTATGG
69		DMPK-002	DMPK_t12_2_2	Ex02	acactgacgacatggttctacaGGCTTCCCACATAAACACC	tacggtagcagagacttgggtctTCCCACAGCCCAAAATC
70		DMPK-002	DMPK_t12_2_3	Ex02	acactgacgacatggttctacaCAGGTACAGTTGAGGTGACAG	tacggtagcagagacttgggtctGCCTCCCTGCTCCACACA
71		DMPK-001	DMPK_t12_3_2	Ex01 u. 5'-UTR	acactgacgacatggttctacaAGGAGAGGTCGAGCAGGG	tacggtagcagagacttgggtctTAGCACTGAAGGGTCTGAAGG

Nr	Methode	Gen, Transkript	Name	Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer
72	NGS_DM3	CNP-001 u. -008	CNP_2	Ex04	acactgacgacacatgggttctacaGGCCCTTCCATTTATAGCTAATTC	tacggtagcagagagacttggctctAGCAFTTCCACCCTTGAGGTTTTG
73	SpIeiß-	CNP-001	CNP_3	Ex02 u. Ex03	acactgacgacacatgggttctacaAGAGGGGTATGAAAAGGAAGTGT	tacggtagcagagagacttggctctCTTTCAGTGGTTTAAATGCTGTTACTTT
74	Targetgene	CNP-001	CNP_t3_1_1	Ex05	acactgacgacacatgggttctacaTTTAAACAAGCATATACATAACACCTCT	tacggtagcagagagacttggctctCTGAGGCCCATTTGTGAAAAC
75	MBNL1	CNP-001	CNP001_ex1_1	5'-UTR u. Ex01	acactgacgacacatgggttctacaCGAGCTTCCCCTGAC	tacggtagcagagagacttggctctGCTCTGATTGGACTGCCGGAAC
76	SpIeiß-	GAPDH	GAPDH		TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG	GGAGGGCAATGGGCCATGAG
77	Targetgene	IR (INSR)	IR (INSR)	Ex11	CCAAAGACAGACTCTCAGATCC	ACATTCCTCCATCGCCCAAGGG
78	Targetgene	CAPN3	CAPN3	Ex16	TCATCTCCGGGCTTCTCTG	GTTCCAGACTGTGTTAAGGACCTTC
79	Targetgene	CAPZB	CAPZB	Ex08	TCAGAAGTACGCTGAACGAGA	TGATGGAGCTGTTATGTGACC
80	Targetgene	FN1	FN1	EBD	CATGTTGATCAGAGCTCCTGAC	AGGTGAGTAAACGCACCCAGGAAG
81	Targetgene	MBNL1	MBNL1	Ex07	CCAAATCCGGACACAAAATGG	TGTGGCTAGTCAGATGTTCCG
82	Targetgene	MBNL2	MBNL2	Ex07	ACAAGTGACAACACCCTAAACCG	TTTGGTAAAGGATGAAAGCACC
83	Targetgene	MTDH	MTDH	Ex07	ATCACAGTTACCACCGAGCA	TACCCAAATGCCCACTCTT
84	Targetgene	MTMR1	MTMR1	Ex2-3	CATGTTGAATGGTAAACAG	AAATGTCCTCATGGCTCTGT
85	Targetgene	NRAP	NRAP	Ex12	CTCGCTTCCAGCTCAAGACAA	CGTGAGAGTGGCTGGTAGTTG
86	Targetgene	PPP2R5C	PPP2R5C	Ex12	GGGAAGAAGCATGGGTTAAA	CTTCCAAGGCTTCTTTGGTG
87	Targetgene	SERCA1 (ATP2A1)	SERCA1 (ATP2A1)	Ex22	GCTCATGGTCTCAAGATCTCAC	AGCTCTGCCCTGAAAGATGTCAC
88	Targetgene	SERCA2 (ATP2A2)	SERCA2 (ATP2A2)	Ex19	GAACCAATTGATCAGCGGGTG	CATGAGAATCACGGGCAAGG
89	Targetgene	SPAG9	SPAG9	Ex26a	TCTCCATCCCATTGACAGAA	CTGGGACTGCCACAAAAGAA
90	Targetgene	TNNT2 (cTNT)	TNNT2 (cTNT)	Ex05	ATAGAAGAGGTGGTGGAAAGATAC	GTCTCAGCCCTCTGCTTCAGCATCC
91	Targetgene	ZASP (LDB3)	ZASP (LDB3)	Ex11	GCAAGACCCCTGATGAAAGAAGCTC	GACAGAAGAGGCGGATGCTG
92	FSHD-Haplotyp		FSHD-SSLP-re		CTGTGGTCACTCTCTGCTCCA	TTTGCCTGTGAGTTCGAAATG
93	FSHD Methylierung		FSHD2-Pyro-2		GGGTTGAGGGTTGGGTTTATA	Biot in-ACAAAACTCAACCTAAAAATATAC
94			FSHD2-Pyro-2.1-Seq		GGGTTGGGTTTATAGT	-
95	SMCHD1	SMCHD1-001	SMCHD1-intron11_M13		tgtaaaaacgacg9ccagTAGAGATGGTGTAGTGGAAAGG	caggaaacagcctatgaccatgacagctgacagctcttcagccaca
96	Intron	SMCHD1-001	SMCHD1-intron14_M13		tgtaaaaacgacg9ccagTTGTGGCTGAAGGACTGTCA	caggaaacagcctatgaccctTTTGACCCCTCCATGGCTT
97	X-inaktivierung	Androgenrezeptor	AR		TCCAGAACTGTTCAGAGCGGTGC - 6-Fam	GCTGTGAAAGGCTGTTCCTCAT

Nr	Methode	Gen	Transkript Name	Exon	Forward-Primer	Reverse-Primer
98	NGS_FSHD2	SMCHD1-001	SMCHD1 Ex01	Ex01 5'-UTR	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t t t g a a t c g g t c c c g g g t g a t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t c h a t a g c a c a t g c a g c c a g g t t t c
99		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex02	Ex02	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t a t g t c t t t g c t g g t g g g t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c h a t a g c a c a t g c a g c c a g g t t t c
100		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex03	Ex03	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c a t t a g g t t c t g a i g c t g a c c t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g t a t a c a g g c g a t g g a a a g c t g
101		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex04	Ex04	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g t c t t a c t t t t g a a c t t g t g c t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a c a c t c t c t c t a a a a a a a a a t t a a t t g c t
102		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex05	Ex05	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t t t c a t g t t a g t a t t a t t g a c t t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g a a a a a a a a a a g c t c t c a g g t
103		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex06-07	Ex06 u. Ex07	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t t t g c a g g c t g a t c a t t t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t c a t a c t t t c a a g t t t c a a g t t t a a g t t c t g t c c
104		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex08	Ex08	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t a g g g t a a g t c c c t c a a t t t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g t t a a g t a a g c a a c a t t t c t c a a g c c
105		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex09	Ex09	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t c c t c t t g g a a g t g g t g t a t g t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c t g a g t c a t t t t g g a a c t g g a a
106		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex10	Ex10	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t c c a g c t c a g c t c a t t a t t g t g t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a c a a a c a c t g t c t c a a t t a c a c t t t c
107		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex11-12	Ex11 u. Ex12	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t g t t t g t t t c a t a t t t t c a c a t t t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t g c a a a a t a c a a t a a a a c c t a c a c t t g c
108		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex13	Ex13	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c a a a a a g t t a g t t a t a t t t t g t t g c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g c a l t a t t t g t t g t t a c t t g t t a a t
109		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex14	Ex14	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g a c t g a a t t g a a g g a a t c t g g a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t c a c a c a a a a a c t a c a c c a c t t t
110		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex15	Ex15	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t t t g g a a g a a a a a a t g g t g t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a c a t g t t a a t c a t a g t c t a t a a a a g t g a
111		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex16	Ex16	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c a g t a g c c a c a g a a a t g g t t a g g	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c t t g t t c t t g a a g c t t t g c a t
112		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex17	Ex17	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a g c t g g a a c c c c t a t t g t a t g t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g c c a g a t t a c c c a c a t g a a a a a c
113		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex18-19	Ex18 u. Ex19	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a t a g g t a t t t g g t c c c a a t g t a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c g a g a t g g t t a c c c a a t t g t t c
114		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex20	Ex20	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t t c c a a g t g g a t t g t c t g g a t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t g a c a c t a g t c a c a g a g a t a g c
115		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex21	Ex21	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a a g c a a a a a c a c a t t t g c a g c t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g t g g a c a g a a a c a g a g a t a g c
116		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex22	Ex22	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t c a g a g g t t a g c c t t t g a g a a t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a a c t g g t c a t t t t c t g c a g t g c t
117		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex23	Ex23	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g g a t t t t g g a a g a a a c t g a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g g c a a c t t t t g g c a i c t t t a t t g g
118		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex24	Ex24	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c c g c a g a a a a a a g a a a t c c a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g c t t t g c t t g g a a a c c a c a a a
119		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex25	Ex25	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a g a g g g g a a t c c t t t a g t c a c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c c c a t a a a a a a c g c t t t g t c a g t c
120		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex26	Ex26	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a t g g c c a c a g a t a c t t t t g t g	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t g t c a a t g g a g a c a g a t a t t t t
121		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex27	Ex27	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g t c a t a t c t a c t a t c t t t g c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c a a a c t g a t t t t a a a a g t a t g t c a g c
122		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex28	Ex28	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a g a c a t c g t g t a a a t g a t t g t g a a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a c t g t t g a a a g a t a g t g g a a c a c
123		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex29	Ex29	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c c a t a t t t g c a t g g g t g c t a t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g c t c a c a t t a c c t t g c t t g c t t t t t t g
124		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex30	Ex30	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a g g g t c a c a c a a t t a g t t g g t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a a c t g t a c a a t g t t g g c c c c t t t
125		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex31	Ex31	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c g t t t t c c a g t g a t c c c c c t a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c g g c a a g c a g t a a g a a a a c g a a
126		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex32	Ex32	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c g t t t c t t a c t g c t t g c c g a a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c a t t t g c t t c c c t g c t c t a c a
127		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex33	Ex33	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c c c a a t a g a a t g t t a c a g g t g t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a a c t t c a a a a a a t g c t t c c c a t g a
128		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex34	Ex34	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t a t g g g t g t c t t c c a c t g t c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g t g c c t g a c a c a a t a a a a a g a
129		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex35	Ex35	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a g a a c t t g g g a g t a a g c a a g a a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g a g a a a t g g a a a t g t g a c t c c t g
130		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex36	Ex36	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g t g c a t t g t t a t t g t c t c c c t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g a t t c t g a t t t g a g t a g t f c t
131		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex37	Ex37	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g g a a c t a t t t c t g c t g t g g a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g t g a c t t c c c a a t t t a g t g c t
132		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex38	Ex38	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a g t g t g g t g a t a a t a t g g t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g c c a t t t g t t g c t g c t t c t t a
133		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex39	Ex39	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g g c a g a a a g t a g t c t c t g g a a g	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g a a a g t g g a a g t t g t t t g t g
134		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex40	Ex40	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t t g a a c a g a c a c t t g t g c a a t t a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t g c a c g t c t t t g a c c c t a a a a c
135		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex41	Ex41	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g c c t g g t t c a a g a g t a a t t g g t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t c c a a a a a a a a a a a a c a g a c t g a c
136		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex42	Ex42	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t t g t a c t a a t g t t a c t a g g c t t t t	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t t g g c a a a a t a a a a a a t a g c c a g c a
137		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex43	Ex43	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c t t g t g g t g a t t t g g a a t t g a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g c c g c a t c c a g a t t a t t c c a a a
138		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex44	Ex44	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t g t a g a a c a t t g g a a c a g g t a a a g	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a a a a g c t g a a a g t a g t a c a a a a c a
139		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex45	Ex45	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a t c t g c c t g c a t a t t t t c c c c t a	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g g a a c t a t a c t g t a a a a a a c
140		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex46	Ex46	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a g t g t g c t a t a t t t t c c c c t c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t g g g a c t a c a c t g t g a a t g g
141		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex47	Ex47	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a c g g a t a t g a g a a a a a a a a g c a a g	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a c a a c a a a a a a a a a a t t c a g g t a a
142		SMCHD1-001	SMCHD1 Ex48	Ex48	aca ctg ac g ac at g g t t c t a c a a g g g a a t t c a g g g a a a a g g a a a c c	t a c g g t a g c a g a g a c t t g g t c t a g c c t t a g a a c c t c c c t t a c a c

7.2 Gene des Muskelpanels

Im Folgenden sind die Gene des Muskelpanels aufgeführt.

Gen-Name	Abkürzung	MIM	Transkript GRCh37, hg19
Dystrophia myotonica-protein kinase	<i>DMPK</i>	605377	NM_001081560.1
CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein	<i>CNBP</i>	116955	NM_001127192.1
Muscleblind-like splicing regulator 1	<i>MBNL1</i>	606516	NM_021038.3
CUGBP, Elav-like family member 1	<i>CELF1</i>	601074	NM_006560.3
Dystrophin	<i>DMD</i>	300377	NM_004006.2
Emerin	<i>EMD</i>	300384	NM_000117.2
Lamin A/C	<i>LMNA</i>	150330	NM_170707.3
Selenoprotein N, 1	<i>SEPN1</i>	606210	NM_020451.2
Myotubularin 1	<i>MTM1</i>	300415	NM_000252.2
Dynamin 2	<i>DNM2</i>	602378	NM_001005360.2
Bridging integrator 1	<i>BIN1</i>	601248	NM_139343.1
Desmin	<i>DES</i>	125660	NM_001927.3
LIM domain binding 3	<i>LDB3</i>	605906	NM_001080116.1
Myotilin	<i>MYOT</i>	604103	NM_006790.2
Crystallin, alpha B	<i>CRYAB</i>	123590	NM_001885.2
Filamin C, gamma	<i>FLNC</i>	102565	NM_001458.4
Four and a half LIM domains 1	<i>FHL1</i>	300163	NM_001159702.2
BCL2-associated athanogene 3	<i>BAG3</i>	603883	NM_004281.3
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	<i>DNAJB6</i>	611332	NM_005494.2
Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	<i>MYH7</i>	160760	NM_000257.2
Ryanodine receptor 1	<i>RYR1</i>	180901	NM_000540.2
Actin, alpha 1, skeletal muscle	<i>ACTA1</i>	102610	NM_001100.3
Caveolin 3	<i>CAV3</i>	601253	NM_033337.2
Calpain 3 (p94)	<i>CAPN3</i>	114240	NM_000070.2
Dysferlin	<i>DYSF</i>	603009	NM_003494.3
sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	<i>SGCA</i>	600119	NM_000023.2
Titin-cap	<i>TCAP</i>	604488	NM_003673.3
Fuculin related protein	<i>FKRP</i>	606596	NM_024301.4
Titin	<i>TTN</i>	188840	NM_001267550.2
Anoctamin 5	<i>ANO5</i>	608662	NM_213599.2
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	<i>TIA1</i>	603518	NM_022173.2
Kelch-like family member 9	<i>KLHL9</i>	611201	NM_018847.2
Collagen, type VI, alpha 1	<i>COL6A1</i>	120220	NM_001848.2
Collagen, type VI, alpha 2	<i>COL6A2</i>	120240	NM_001849.3
Collagen, type VI, alpha 3	<i>COL6A3</i>	120250	NM_004369.3
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	<i>SMCHD1</i>	614982	NM_015295.2
Sarcoglycan, beta (43kDa dystrophin-associated glycoprotein)	<i>SGCB</i>	600900	NM_000232.4
Sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	<i>SGCD</i>	601411	NM_000337.5
Sarcoglycan, epsilon	<i>SGCE</i>	604149	NM_003919.2
Sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	<i>SGCG</i>	608896	NM_000231.2
Sarcoglycan, zeta	<i>SGCZ</i>	608113	NM_139167.2

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Larsen M, Rost S, El Hajj N, Ferbert A, Deschauer M, Walter MC, Schoser B, Tacik P, Kress W, Muller CR (2015): *Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1*. Eur J Hum Genet; 23: 808-816.

Larsen M, Kress W, Schoser B, Hehr U, Muller CR, Rost S (2015): *Can mutations in MBNL1 cause myotonic dystrophy?*. Eur J Hum Genet; Submitted 12th Jun 2015.

9 FACHKONFERENZEN

06/2015 Jahrestagung der European Society of Human Genetics (ESHG) 2015 in Glasgow

Posterpräsentation: Genetic Diagnosis of the Myotonic Dystrophies by Molecular Combing

10/2014 Jahrestagung der World Muscle Society (WMS) 2014 in Berlin

Posterpräsentation: *SMCHD1* mutations cause FSHD type2 and act as a modifier of disease severity

03/2014 Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH) 2014 in Essen

Posterpräsentation: *SMCHD1* mutations cause FSHD type2 and act as a modifier of disease severity

03/2013 Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH) 2013 in Dresden

06/2012 Jahrestagung der European Society of Human Genetics (ESHG) 2012 in Nürnberg

Posterpräsentation: Molecular Combing for the Diagnosis of FSHD

09/2011 Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik (GfG) 2011 in Würzburg

Posterpräsentation: Molecular Combing for the Diagnosis of FSHD

03/2011 Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH) 2011 in Regensburg

LEBENS LAUF

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei dem Entstehen und Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Clemens Müller-Reible für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit zu diesem spannenden Thema in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich möchte mich herzlich für die Unterstützung, die Motivation, das Verständnis und das Lob bedanken, dass mir entgegengebracht wurde und die jederzeit offene Tür.

Mein ganz großer Dank geht an Frau PD Dr. Simone Rost, für die hervorragende Betreuung und unermüdliche und motivierende Unterstützung bei dieser Arbeit, für die vielen Besprechungen, fachlichen Gespräche, theoretische und praktische Hilfe zu jeder Zeit und ihr immer offenes Ohr.

Herrn Dr. Wolfram Kress danke ich ebenfalls sehr für die gute Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit mit fachlicher Kompetenz, anregenden und kritischen Gesprächen und wertvollen Tipps.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente für die sofortige bereitwillige Übernahme der Zweitkorrektur und das Interesse an meiner Arbeit.

Der Firma Genomic Vision danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der Geräte für das Molecular Combing. Besonders danke ich dabei Jun Komatsu für seine Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung.

Auch den Fachärzten möchte ich danken, die mir bereitwillig Materialien und Informationen zur Verfügung gestellt haben. Ganz besonders möchte Herrn Prof. Dr. Benedikt Schoser hervorheben.

Der gesamten AG Müller-Reible in der aktuellen Besetzung und auch allen Ehemaligen, möchte ich meinen Dank aussprechen, für die wirklich gute Zeit, die wir miteinander hatten. Danke für die lebenswürdige Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre. Besonders möchte ich mich bei Elisa Kuhn bedanken, die in guten und in schlechten Zeiten immer die beste Kollegin war, die ich mir hätte wünschen können.

An letzter Stelle möchte ich meinen Freunden, meiner Familie und besonders meinen Eltern ganz herzlich danken für die unermüdliche Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit, die Motivation und Anerkennung, das Vertrauen und Verständnis, die Gedankenpausen und die Kraft, die sie mir gegeben haben und so viel mehr.
