

Aus der Abteilung Muskelkrankheiten des Experimental and Clinical  
Research Centers (ECRC)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Korrelation von Genotyp und Phänotyp sowie Beteiligung des  
Immunsystems bei Patienten mit Dysferlin-defizienter  
Muskeldystrophie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Carl

aus Trier

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Spuler

2. Prof. Dr. M. Wehnert

3. Prof. Dr. M. Schülke-Gerstenfeld

Datum der Promotion: 19.09.2008

# 1. INHALTSVERZEICHNIS

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Zusammenfassung der Publikationspromotion	
2.1. Titel	4
2.2. Autor	4
2.3. Abstract	4
2.4. Einleitung	4
2.5. Zielstellung	6
2.6. Methodik	7
2.7. Ergebnisse	9
2.8. Diskussion	11
2.9. Referenzen	13
3. Erklärung über Art und Umfang der Mitwirkung des Promovenden bei der Bearbeitung des Forschungsthemas und bei der Erstellung der Publikationen	15
4. Vier Publikationen als Promotionsleistung	
4.1. <i>Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding</i>	18
4.2. <i>Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy.</i>	29
4.3. <i>Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF.</i>	37
4.4. <i>Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis.</i>	44
5. Tabellarischer Lebenslauf	64
6. Selbständigkeitserklärung	65
7. Danksagung	66

## **2. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION**

### **2.1 TITEL**

Korrelation von Genotyp und Phänotyp, sowie Beteiligung des Immunsystems bei Patienten mit Dysferlin-defizienter Muskeldystrophie

### **2.2 AUTOR**

Miriam Carl

### **2.3 ABSTRACT**

Mutationen im Gen für Dysferlin (*DYSF*) verursachen die beiden autosomal rezessiv vererbten Muskeldystrophien Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2B (LGMD2B; OMIM #253601) und Miyoshi Myopathie (MM; OMIM #254130). Außerdem spielen die Beteiligung des Komplementsystems einerseits und die Bildung von Amyloid-Fibrillen andererseits eine Rolle in der Pathogenese der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophien. Wir beschreiben insgesamt acht neue Mutationen in *DYSF* bei sieben Indexpatienten der LGMD2B und in allen Familienmitgliedern, die ebenfalls untersucht werden konnten. Dabei wurde die bisher einzige bekannte Mutation im extrazellulären Bereich des Dysferlins gefunden. Homozygote, heterozygote Individuen und solche, die heterozygot auf beiden Allelen sind, wurden klinisch, immunohistochemisch und durch genomische Sequenzierung charakterisiert. So konnten die Konsequenzen der Mutationen auf der Transkriptionsebene und der Proteinebene gezeigt werden und letztendlich eine Korrelationen zwischen dem klinischen Phänotyp und dem Genotyp hergestellt werden. Beim Vergleich der Expression des Komplement-Inhibitors DAF/CD55 in Skelettmuskeln und Herzmuskeln von Mäusen stellte sich heraus, dass dieser nur im Skelettmuskel runterreguliert wurde, jedoch nicht im Herzmuskel, bei dem die Komplement-vermittelte Schädigung keine Rolle zu spielen scheint.

### **2.4 EINLEITUNG**

Mutationen im Gen für Dysferlin (*DYSF*) verursachen die autosomal-rezessiv vererbte Gliedergürtelmuskeldystrophie vom Typ 2B (LGMD2B; OMIM #253601) und die Miyoshi Myopathie (MM; OMIM #254130) (1). Die Beteiligung der proximalen Muskeln ist typisch für Gliedergürtelmuskeldystrophien, wohingegen in der Miyoshi Myopathie hauptsächlich die distalen Muskelpartien der unteren Glieder betroffen sind. Beide Phänotypen können in derselben Familie auftreten (2). Das Gen *DYSF* liegt auf dem menschlichen Chromosom an

der Stelle 2p13 (3), besteht aus 55 Exonen und umspannt eine genomische Region von 237 kB (4). Aus der Aminosäuresequenz lassen sich für das Dysferlin Protein sieben intrazelluläre C2 Domänen vorhersagen (*PFAM database*, <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/swisspfamget.pl?name=O75923>) sowie eine Transmembranregion. Der größte Anteil des Proteins liegt im intrazellulären Raum und ein kleiner Anteil von 21 Aminosäuren liegt extrazellulär. Dysferlin ist dem Spermatogenesis Faktor *fer-1* in *C.elegans* sehr ähnlich und seine C2 Domänen zeigen eine Homologie zu der C2A Domäne von Synaptotagmin (5). Dysferlin scheint eine Funktion zu haben bei Mechanismen der Membranreparatur, wobei die Annexine I und II an diesem Vorgang beteiligt sind (6). Dysferlin bringt vermutlich seine Bindungspartner an die Stellen der Membran, welche zu reparieren sind und an denen die Bindungspartner letztendlich die Reparatur durchführen (7). In der Datenbank der Leidener Muskeldystrophie Webseite sind mehrere "missense" und "nonsense" Mutationen und eine kleine Anzahl von Duplikationen, Insertionen und Deletionen im Gen *DYSF* registriert (<http://dmd.nl>), die sich über das ganze Gen erstrecken, ohne erkennbare „hot-spots“.

Die SJL/J Maus ist eine von derzeit drei verfügbaren Mausmodellen der Dysferlin-Defizienz. Bei ihr besteht eine splice-site Mutation in *DYSF*, die zu einer Deletion des Exons 45 führt (8). Die SJL/J Mäuse haben lange als ein Modell für Autoimmunerkrankungen gedient und entwickeln in höherem Alter Lymphome, weshalb inzwischen andere Mausmodelle für die Dysferlin-Defizienz genommen werden (9).

Auf einigen Muskelzellmembranen von LGMD2B Patienten können Ablagerungen des „Membrane attack complex“ (MAC) nachgewiesen werden. Der „Membrane attack complex“ ist Bestandteil des Komplementsystems der Immunantwort und dient normalerweise zur Durchlöcherung von Bakterienzellmembranen (10). Die fehlgeleitete Durchlöcherung der Muskelzellmembran in LGMD2B Patienten führt hierbei zum Untergang der Zelle. Normalerweise wirken die membranständigen Inhibitoren DAF/CD55 ("death acceleration factor"), CD46 und CD59 der Bildung des MACs entgegen (11).

Eine weitere Rolle in der Pathogenese der LGMD2B spielen Aggregate des Dysferlin Proteins im Inneren der Muskelzelle. Ganz bestimmte Mutationen können zu einer Fehlfaltung führen, wodurch das Dysferlin Protein im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und abgebaut werden kann (12). Erst kürzlich konnten wir zeigen, dass Mutationen im Bereich der

zweiten und der dritten C2 Domäne des Dysferlin Proteins zur Bildung von Amyloid-Fibrillen im Skelettmuskel und in den Blutgefäßen führen (13).

## **2.5 ZIELSTELLUNG**

Um die Zusammenhänge erkennen zu können, die zur Abwesenheit oder Aggregation des Dysferlin Proteins führen, müssen die Mutationen im Gen für Dysferlin genau aufgeklärt werden. Im Falle einer „missense“ Mutation kann ein Bezug zur Strukturveränderung des Proteins hergestellt werden. Im Falle einer „nonsense“ oder „splice-site“ Mutation kommt es meistens zur Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons, es kann aber auch eine Strukturveränderung vorkommen. Eine Strukturveränderung besonderer Natur ist die Bildung von Amyloid-Fibrillen bei bestimmten Mutationen in der zweiten und dritten C2 Domäne des Dysferlin Proteins. Diese Vorgänge zu charakterisieren ist ein wichtiger Schritt in unserer Arbeit.

Von sehr hohem Interesse war ebenso die Aufklärung der Ursachen für die Beteiligung des Komplementsystems in der Pathogenese der LGMD2B. Hier sollten regulative Mechanismen untersucht werden, die im Skelettmuskel den Angriff durch den MAC zulassen, den Herzmuskel jedoch davor schützen. Denn bei der LGMD2B und der MM ist in den meisten Fällen der Herzmuskel nicht von der Muskeldystrophie betroffen. Dadurch, dass es möglich ist, das Komplementsystem zu hemmen, liegt hier Potential für eine ursächliche Therapie. Dazu muss gesagt werden, dass Muskeldystrophien eine Gruppe von Krankheiten sind, die progredient verlaufen und bis dato nicht medikamentös behandelt werden können. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre in diesem Fall also ein enormer Fortschritt.

Das Ziel aller unserer Arbeiten war und ist es, die Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp aufzuklären anhand der Mutationen im Gen für Dysferlin bei Patienten mit LGMD2B oder MM. Außerdem galt es, die Ereignisse aufzuklären, die zu einer Beteiligung des Immunsystems in einigen Patienten führen. Es handelt sich hier um Grundlagenforschung mit einer strengen Ausrichtung auf eine mögliche Therapie zur Linderung der Symptome und somit der Verbesserung der Lebensqualität der Patienten.

## 2.6 METHODIK

### *Genomische Sequenzierung des Gens für DYSF*

Die genomische DNA wurde aus Lymphozyten gewonnen mit Hilfe des folgenden Kits: Invisorb Spin Blood Midi Kit, Invitex, Berlin, Deutschland (<http://www.invitex.eu>). Die 55 Exone von DYSF wurden vervielfältigt durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion mit intronischen Primern, welche alle eine zusätzliche M13 Sequenz enthielten. Für die Fluoreszenz-Markierung der PCR-Produkte wurden 4 µl von BigDye™ Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Lincoln, USA, <http://www.appliedbiosystems.com>) benutzt und die M13 Primer ( M13 F 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3', M13 R 5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'). Die Reinigung erfolgte durch SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-Up Säulen (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, <http://www.sigmaaldrich.com>). Die Sequenzierung wurde mit einem ABI 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lincoln, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm Sequencher™ 4.1.2 (Gene Codes Corporation, Michigan, USA, <http://www.genecodes.com>) ausgewertet. Die Referenzsequenz hat die GenBank ID NM\_003494.2. Das erste „A“ im ersten „ATG“-Codon wird mit der Nummer eins belegt und dementsprechend verlief die numerische Benennung der Mutationen. In der Schreibweise bezeichnet das Präfix „c.“ die cDNA Sequenz und das Präfix „p.“ die Proteinsequenz.

### *Restriktionsansanalyse*

Alle gefundenen Mutationen wurden durch eine erneute Sequenzierung mit einem zweiten PCR-Produkt und durch eine Analyse mit spezifischen Restriktionsenzymen mit der Patienten DNA und 400 gesunden Normal-Allelen bestätigt. Dabei wurden die folgenden Enzyme benutzt: *Mae* II (Exon 8) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland, <http://www.roche-appliedscience.com>), *Bsa*I (Exon 9), *Taq*<sup>α</sup> I (Exon 16), *Bst*U I (Exon 38), and *Bst*X I (Exon 55) (New England Biolabs, Beverly, USA, <http://www.neb.com>).

### *RNA Präparation und cDNA Synthese*

Die gesamte RNA wurde aus gefrorenen Muskelschnitten mit dem TRIzol Reagens (Invitrogen, Carlsbad, USA, <http://www.invitrogen.com>) präpariert und mit Isopropanol gefällt. Die so gewonnene RNA wurde mit Deoxyribonuclease I (Invitrogen) behandelt und mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, <http://www.qiagen.com>) aufgereinigt. cDNA wurde aus 1 – 5 µg der gesamten RNA mit Hilfe der Power Script™

Reverse Transcriptase (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA, <http://www.bdbiosciences.com>) synthetisiert.

### *Proteinstruktur Modell*

In der PFAM Datenbank (PFAM database, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) für Proteinsequenzen und –strukturdaten werden bei Dysferlin sieben verschiedene C2 Domänen angegeben. Es sind einige 3D Strukturen für C2 Domänen erhältlich, die vom Synaptotagmin abgeleitet wurden. Gemäß den Definitionen der ASTRAL Datenbank (<http://astral.berkeley.edu/>) wurden die C2 Domänen des Dysferlin mit bereits bekannten Strukturen von C2 Domänen verglichen. Dabei wurden Programme des HMMER Software Pakets (<http://hmmer.wustl.edu>) benutzt. Letztendlich erwies sich die erste C2 Domäne des Synaptotagmin I als am ähnlichsten zu den Dysferlin C2 Domänen und deren Strukturmodell wurde zur Verdeutlichung der Struktur der Dysferlin C2 Domänen benutzt.

### *Immunohistochemie*

Die Immunfärbungen wurden auf 6µm dünnen, gefrorenen Schnitten aus Skelettmuskel, der von LGMD2B Patienten biopsiert wurde, durchgeführt sowie mit Schnitten aus Normalkontrollen. Zur Erkennung des Dysferlins wurde der Antikörper Hamlet-2 mab (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK, <http://www.novocastra.co.uk>) benutzt. Es wurde entweder eine Färbereaktion mit einem Peroxidase markierten zweiten Antikörper oder bei der Doppelfärbung mit FITC markiertem zweiten Antikörper. Der Antikörper Hamlet-2 mab erkennt ein Epitop, welches von Aminosäure 349 zu Aminosäure 366 reicht. Dies entspricht den Exonen 11 und 12. Um eine Kolo-kalisation von Dysferlin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nachzuweisen, wurde ein anti-Calnexin Antikörper verwendet (ab 10286, Acris, Hiddenhausen, Deutschland). Die Schnitte wurden mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany, <http://www.leica-microsystems.com>) untersucht. Zur Beschreibung und Aufklärung der Immunreaktion des Komplementsystems via Immunhistochemie wurden Antikörper gegen die Komponente C5b9 des „Membrane attack complex“ (MAC), gegen das murine DAF, das humane CD55, gegen phosphoryliertes SMAD und das Zell-Nukleus Protein LaminA/C verwendet.

### *Mikroarray Experimente*

Die nicht-gepoolten Mikroarray Experimente wurden mit cRNA von 5 SJL/J und 5 C57BL/6 Mäusen durchgeführt, die aus dem Quadrizeps Muskel und dem linken Herzventrikel



präpariert wurde. Es wurde der GeneChip „Murine Genome U74av2 (Affymetrix, Santa Clara, USA, <http://www.affymetrix.com>) verwendet. Acht µg RNA wurden durch oben beschriebene cDNA Synthese in doppel-strängige cDNA umgeschrieben. cRNA wurde mit Hilfe des MEGAscript™ High Yield Transcription Kits (Ambion, Austin, USA, <http://www.ambion.com>) hergestellt und markiert mit Biotin-11-CTP und Biotin-16-UTP Nukleotiden (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA, <http://las.perkinelmer.de>). Die Mikrochip Arrays wurden bei 45°C und 60 rpm für 16 h in einem „GeneChip Hybridisation Oven 640“ (Affymetrix) hybridisiert mit 16 µg fragmentierter, biotinylierter cRNA, daraufhin gewaschen und gefärbt auf der „GeneChip Fluidics Station 400“ und gescannt in einem „GeneArray scanner“ 2500 (Affymetrix).

#### *Quantitative “real-time reverse transcriptase PCR” (TaqMan)*

Die “Real-time” PCR Versuche wurden mit TaqMan Reagentien in einem ABI PRISM 7700 Sequenz-Detektions-System (Applied Biosystems, Foster City, USA, <http://www.appliedbiosystems.com>) durchgeführt. Jede Reaktion enthielt TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM vorwärts und rückwärts Primer und 200 nM einer TaqMan Probe (Biotex GmbH, Berlin, Deutschland, <http://www.biotex.de>). Die Proben wurden entworfen mit der Primer Express 1.5 Software (Applied Biosystems).

## **2.7 ERGEBNISSE**

### *Genotyp und Phänotyp in sieben Patienten mit einer Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie*

Es wurden genomische Sequenzierungen und Restriktionsanalysen durchgeführt, um den Genotyp der Patienten zu charakterisieren sowie immunhistochemische und klinische Untersuchungen, um den Phänotyp zu charakterisieren. Alle sieben Indexpatienten hatten eine LGMD2B, wobei ein Patient eine Mischform mit Anteilen der MM aufwies und eine andere Patientin einen ungewöhnlichen Phänotyp mit Vergrößerung der Wadenmuskulatur.

Es konnten folgende neue Mutationen gefunden werden: die vier „missense“ Mutationen [Gly299Arg] heterozygot, [Gly299Trp] homozygot, [Leu1341Pro] homozygot, [Met2073Val] heterozygot; und die “nonsense” Mutation [Ser483X] heterozygot sowie die splice-site Mutationen [c.855+1delG] heterozygot und [c.1285-2 A>G] homozygot. Außerdem wurde eine Mutation [c.\*107T>A] heterozygot im 3'-UTR-Bereich von *DYSF* gefunden. Alle Mutationen bis auf [c.1285-2 A>G] und [c.\*107T>A] wurden einer Restriktionsanalyse

unterworfen und konnten in 400 gesunden Allelen nicht nachgewiesen werden. Die homozygote Mutation [Leu1341Pro] liegt im Bereich der fünften C2-Domäne, führt zu einer Fehlfaltung und somit zu Aggregaten des Dysferlins im Endoplasmatischen Retikulum und zu dessen Abbau (12). Die heterozygote Mutation [c.855+1delG] konnte auf RNA- Ebene nicht mehr nachgewiesen werden, so dass die zweite heterozygote Mutation [Gly299Arg] auf RNA-Ebene “quasi-homozygot” wurde. [Gly299Arg] liegt im Bereich der zweiten C2-Domäne, führt ebenfalls zu einer Fehlfaltung und zur kompletten Abwesenheit des intakten Dysferlins in der Skelettmuskelzelle. Hier allerdings wurden in Skelettmuskeln und Blutgefäßen der beiden Geschwister mit den heterozygoten Mutationen [c.855+1delG] und [Gly299Arg] Amyloid-Ablagerungen gefunden, die mit einem anti-Dysferlin Antikörper detektiert werden konnten.

Es konnten in zwei weiteren Patienten Amyloid-Ablagerungen im Skelettmuskel gefunden werden. Das waren die Patienten mit der homozygoten Mutation [Gly299Trp] einerseits und der homozygoten splice-site Mutation [c.1285-2 A>G] andererseits. Letztere liegt im Bereich der dritten C2-Domäne.

Die heterozygote “nonsense” Mutation [Ser483X] hat die Einführung eines verfrühten Stopp-Codons in Exon 16 von *DYSF* zur Folge und führt somit zum Kettenabbruch bei der Proteinbiosynthese an dieser Stelle. In Kombination mit der zweiten heterozygoten Mutation im 3' UTR-Bereich [c.\*107T>A] ist das Dysferlin Protein in der Muskelzelle nicht nachzuweisen. Die Mutation [Met2073Val] liegt im extrazellulären Bereich des Proteins und wurde in Verbindung mit der bereits vorher beschriebenen (1; 4), heterozygoten “nonsense” Mutation [Gln605X] gefunden. Die Sequenzierung der cDNA dieser Patientin zeigte, dass das Allel mit der “nonsense” Mutation auf mRNA-Ebene fast nicht mehr nachweisbar war.

#### *Untersuchungen über die Beteiligung des Komplementsystems*

Mit einem GeneChip, wurden 291 differentiell exprimierte Gene im Skelettmuskel und im linken Ventrikel des Herzens von SJL/J Mäusen im Vergleich mit C57BL/6 Mäusen ermittelt. Hierbei waren das DAF1 und das DAF2 im Skelettmuskel der SJL/J Mäuse stark runterreguliert, wohingegen beide im Herzmuskel eine leichte Hochregulierung erfuhren. Diese beiden Faktoren entsprechen dem humanen CD55. Immunfluoreszenzfärbung von DAF1 und DAF2 im murinen Skelettmuskel zeigten auch hier deren Abwesenheit bei Mäusen aller untersuchten Altersgruppen (12 bis 32 Wochen), wohingegen im Herzmuskel beide Proteine vorhanden waren. Bei den beiden alternativen Mausmodellen A/J und *Dysf*<sup>-/-</sup> konnte

im Alter von 16 Wochen ebenfalls kein DAF1 oder DAF2 immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Die Immunhistochemie der Skelettmuskeln von vier LGMD2B Patienten zeigte eine erniedrigte sarkolemmale Expression von CD55. Eine Analyse der Expression auf der RNA-Ebene mit Hilfe der TaqMan-Methode zeigte, dass DAF/CD55 in den Skelettmuskeln der vier LGMD2B Patienten im Vergleich zu gesunden Normalkontrollen zweifach reduziert war. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Myotuben/Myoblasten der vier Patienten sehr empfindlich gegenüber den „Membrane attack Komplexen“ des Komplementsystems waren und dass der C5b9-MAC auf der Oberfläche von nicht-nekrotischen Muskelfasern gefunden werden konnte.

Per Taq-Man-Analyse wurden die möglichen Regulatoren identifiziert, die auf die DAF/CD55-Expression wirken: Myostatin, SMAD3 und SMAD4 waren sowohl in den Skelettmuskeln der Mäuse als auch der Menschen runterreguliert. Diese Tatsache konnte für das phosphorylierte SMAD2 auch immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Phosphoryliertes SMAD2 bildet mit SMAD4 einen stabilen Komplex (14). Myostatin und SMAD waren jedoch im Herzmuskel der SJL/J Mäuse im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen nicht differenziell exprimiert. Außerdem konnte im Promotor von DAF/CD55 eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle für den SMAD-Komplex gefunden werden.

## **2.8 DISKUSSION**

Aufgrund der genauen immunhistochemischen und molekulargenetischen Diagnose konnten die Mutationen unserer Patienten im Gen für Dyferlin in Beziehung gesetzt werden zum Verbleib des Dysferlin Proteins in den Muskelzellen. Hierbei erzeugten fast alle Mutationen im Bereich einer C2-Domäne Probleme bei der Faltung und führten zur Protein-Ablagerung entweder als Amyloid oder als unspezifische Aggregate im Endoplasmatischen Retikulum. Im Grunde genommen stehen alle „missense“ Mutationen im Bereich einer C2 Domäne des Dysferlins unter dem Verdacht, zu einer verminderten Funktionalität zu führen, zum Beispiel bei der Bindung an andere Proteine.

Nimmt man die „nonsense“ Mutationen, so führen diese meist zur kompletten Abwesenheit des Dysferlin Proteins. Durch die Einführung eines verfrühten Stopp-Codons kommt es zum frühzeitigen Abbruch der Aminosäurekette in der Proteinbiosynthese. Was die „splice-site“ Mutationen angeht, so haben wir zwei unterschiedliche Effekte gefunden: im Falle von

[c.855+1delG] wird durch den Abbau der fehlerhaften mRNA (nonsense-mediated mRNA decay) eine komplette Abwesenheit dieses Allels von Dysferlin beobachtet, wohingegen [c.1285-2 A>G] zur Fehlfaltung und Ablagerung von Amyloid-Fibrillen im Skelettmuskel führt. Beide dieser splice-site Mutationen liegen im Bereich der zweiten und dritten C2 Domäne. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Phänotypen könnte sein, dass der nonsense-mediated mRNA decay nur verfrühte Stopp-Codons nahe am 5'-Ende der unterschiedlichen Gene erkennt (15) und dass die Mutation [c.1285-2 A>G] davon unberührt bleibt. Eine andere mögliche Erklärung wären unterschiedliche Folgen für eine donor-splice-site Mutation im Unterschied zu einer acceptor-splice-site Mutation.

Die erste publizierte Mutation im extrazellulären Bereich des Dysferlin Proteins verursacht bei einer jungen LGMD2B Patientin einen ungewöhnlichen Phänotyp mit schmerzhafter Vergrößerung der Wadenmuskulatur. Da ihre zweite heterozygote Mutation eine bereits bekannte „nonsense“ Mutation ist und da die RNA Experimente gezeigt haben, dass dieses Allel abgebaut wird, ist der Verdacht sehr erhärtet, dass die Mutation im extrazellulären Teil des Dysferlins diesen ungewöhnlichen Phänotyp hervorruft. Über Bindungspartner des Dysferlin Proteins im extrazellulären Bereich ist noch nichts bekannt.

Alle diese Beispiele zeigen, wie die Art der Mutation im Dysferlin Gen den tatsächlichen Phänotyp beeinflusst. Und die Empfindlichkeit der Muskelzellen von LGMD2B Patienten gegenüber den MACs zeigt einen weiteren Mechanismus der Pathogenese auf. DAF/CD55 ist ein membranständiger Faktor, der normalerweise Angriffe des Komplementsystems inhibiert. Seine verminderte Expression konnte auf der mRNA Ebene in den Skelettmuskeln der SJL/J Mäuse und von vier LGMD2B Patienten nachgewiesen werden. Wie aber nun der genaue Signaltransduktionsweg zur Reduzierung von DAF/CD55 in LGMD2B Muskeln verläuft, ist im Detail noch genauer aufzuklären. Unsere Ergebnisse weisen sehr stark auf eine Beteiligung der SMAD Proteine SMAD3 und 4 sowie des endogenen Myostatins hin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass man, nur wenn die Diagnose bis in diese Details geklärt ist, in Zukunft individuell therapeutisch eingreifen kann. Findet man auf der Oberfläche der Muskelzellmembranen eines Patienten den MAC, so kann durch therapeutische Immunglobuline das Komplementsystem gehemmt werden und die Symptomatik der LGMD2B gelindert werden. Bei Amyloid-Ablagerungen gibt es inzwischen auch Substanzen, die die Amyloid-Fibrillen destabilisieren und auflösen können. Auch im

Falle einer „nonsense“ Mutation wird eventuell in Zukunft eine Behandlung mit einer Substanz wie PTC124 möglich sein, die aus „nonsense“ Codons „missense“ Codons generiert. Daher ist es für die Patienten enorm wichtig eine komplette immunhistochemische sowie auch molekulargenetische Diagnose zu erhalten.

## 2.9 REFERENZEN

1. Liu J, Aoki M et al. 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20:31-36; Bashir R et al. (1998) A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 20:37-42.
2. Argov Z et al. 2000. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain* 123 ( Pt 6):1229-1237.
3. Bejaoui K et al. 1995. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* 45:768-772.
4. Aoki M, Liu J et al. 2001 Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 57:271-278.
5. Britton S et al. 2000. The third human FER-1-like protein is highly similar to dysferlin. *Genomics* 68:313-321.
6. Lennon NJ et al. 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 278:50466-50473; Bansal D et al. (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168-172.
7. Huang Y et al. 2007. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* Mar;21(3):732-42.
8. Vafiadaki E, Reis A, Keers S, Harrison R, Anderson LV, Raffelsberger T, Ivanova S,

Hoger H, Bittner RE, Bushby K, and Bashir R. 2001. Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation. *Neuroreport* 12:625-629.

9. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, Goolsby H, Watkins SC, Cox GA, and Brown Jr RH. 2004. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet.* 13:1999-2010.

10. Spuler S and Engel AG. 1998. Unexpected sarcolemmal complement membrane attack complex deposits on nonnecrotic muscle fibers in muscular dystrophies. *Neurology* 50:41-46.

11. Morgan BP. 1999. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.* 19:173-198.

12. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T. 2007. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet.* Mar 15;16(6):618-29.

13. Spuler S, Carl M, Straub V, Bushby K, Moore SA, Bähring S, Wenzel K, Vinkemeier U and Röcken C. 2007. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol.* accepted 2007.

14. Wu JW, Fairman R, Penry J, and Shi Y. 2001. Formation of a Stable Heterodimer between Smad2 and Smad4. *J. Biol. Chem.* 276:20688–20694.

15. Frischmeyer PA, Dietz HC. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet.* 8:1893-1900.

### **3. ERKLÄRUNG ÜBER ART UND UMFANG DER MITWIRKUNG DES PROMOVENDEN BEI DER BEARBEITUNG DES FORSCHUNGSTHEMAS UND BEI DER ERSTELLUNG DER PUBLIKATIONEN**

**Publikation 1:** Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. Hum Mutat. 27:599-600, 2006.

Beitrag in Prozent: 35

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Sequenzierung des Dysferlin Gens und Analyse der Daten, weiterhin Durchführung der Restriktionsanalysen der Patienten sowie von jeweils 200 Normalkontrollen, der RNA-Präparation, der cDNA-Synthese und der cDNA-Sequenzierung. Erstellen wesentlicher Teile des Manuskripts (alle Tabellen und Abbildungen, Resultate, Diskussion). Frau Dr. Wenzel hat einige Experimente zu Ende geführt, nachdem die Durchführung mir wegen meiner fortschreitenden Muskelkrankheit nicht mehr möglich war. Daher die geteilte Erstautorenschaft.

**Publikation 2:** Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. J Immunol. 175:6219-6225, 2005.

Beitrag in Prozent: 15

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Sequenzierung des Dysferlin Gens und Analyse der Daten, weiterhin Durchführung der Restriktionsanalysen und der cDNA-Experimente zur Charakterisierung der LGMD2B. Mitarbeit bei der Analyse der Microarray Daten. Durchführung der Taqman PCR für SMAD und Myostatin. Mitarbeit am Manuskript.

**Publikation 3:** Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF. Neuromuscul Disord. 17:157-162, 2007.

Beitrag in Prozent: 35

Beitrag im Einzelnen: Diagnosestellung der beschriebenen Patienten durch Durchführung der Sequenzierung des Dysferlin Gens und Analyse der Daten, weiterhin Durchführung der

Restriktionsanalysen der Patientin und ihrer Eltern sowie der 200 Normalkontrollen, der RNA Präparation, der cDNA Synthese, der Sequenzierung der cDNA.

Erstellung der Abbildung 5 sowie die Beschreibung der verwendeten Methoden im Material und Methoden-Teil. Mitarbeit bei der Diskussion.

**Publikation 4:** Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. Ann Neurol. accepted 2007.

Beitrag in Prozent: 10

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Sequenzierung des Dysferlin Gens und Analyse der Daten. Erstellung der Teile C und D von Abbildung 1. Auswahl der Primer für die RNA Analyse und Durchführung der mRNA Analyse. Mitarbeit beim Manuskript.

Berlin, den

Berlin, den

---

Dipl. Biochem. Miriam Carl

---

Univ. Prof. Dr. med. Simone Spuler



#### 4. VIER PUBLIKATIONEN ALS PROMOTIONSLEISTUNG

Wenzel K, **Carl M**, Perrot A, Zabojszcza J, Assadi M, Ebeling M, Geier C, Robinson PN, Kress W, Osterziel KJ, Spuler S. 2006. Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum Mutat.* 27:599-600.

Wenzel K, Zabojszcza J, **Carl M**, Taubert S, Lass A, Harris CL, Ho M, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Osterziel KJ, Spuler S. 2005. Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *J Immunol.* 175:6219-6225.

Diers A, **Carl M**, Stoltenburg-Didinger G, Vorgerd M, Spuler S. 2007. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in DYSF. *Neuromuscul Disord.* 17:157-162.

Spuler S, **Carl M**, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, Moore SA, Bähring S, Wenzel K, Vinkemeier U, Rocken C. 2008. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol.* 63:323-328.

#### 4.1 PUBLIKATION 1

Wenzel K, **Carl M**, Perrot A, Zabojszcza J, Assadi M, Ebeling M, Geier C, Robinson PN, Kress W, Osterziel KJ, Spuler S. 2006. Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum Mutat.* 27:599-600.

## 4.2 PUBLIKATION 2

Wenzel K, Zabojszcza J, **Carl M**, Taubert S, Lass A, Harris CL, Ho M, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Osterziel KJ, Spuler S. 2005. Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *J Immunol.* 175:6219-6225.

### 4.3 PUBLIKATION 3

Diers A, **Carl M**, Stoltenburg-Didinger G, Vorgerd M, Spuler S. 2007. Painful enlargement of the calf muscles in limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) with a novel compound heterozygous mutation in *DYSF*. *Neuromuscul Disord.* 17:157-162.

#### 4.4 PUBLIKATION 4

Spuler S, **Carl M**, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, Moore SA, Bähring S, Wenzel K, Vinkemeier U, Rocken C. 2008. Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol.* 63:323-328.

## **5. TABELLARISCHER LEBENSLAUF**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

## **6. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

„Ich, Miriam Carl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: ‚Korrelation von Genotyp und Phänotyp sowie Beteiligung des Immunsystems bei Patienten mit Dysferlin-defizienter Muskeldystrophie‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **7. DANKSAGUNG**

Mein Dank gebührt meiner Chefin Frau Prof. Dr. Spuler, allen Kolleginnen und Kollegen ihrer Arbeitsgruppe sowie all unseren Kooperationspartnern. Ich danke besonders Frau Prof. Dr. Spuler für die umfassende Betreuung und Unterstützung sowie Frau Antje Dräger und Frau Dr. Katrin Wenzel für ihre tatkräftige Hilfe.

Außerdem möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mir ein Studium ermöglicht haben und allen meinen Freunden und meinem Partner für ihre mentale Unterstützung und fürs Gegenlesen.