

Molekulargenetische Untersuchungen zur Okulopharyngealen Muskeldystrophie

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Zahnmedizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Thomas Klossok
aus
Koblenz

Berichter: Herr Universitätsprofessor
 Dr. med. J. Michael Schröder

 Herr Universitätsprofessor
 Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Hubertus Spiekermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Einleitung	3
Historische Entwicklung	3
Prävalenz und Verbreitung	4
Diagnose	5
Klinisches Bild	5
Therapie	7
Morphologische Veränderungen	9
Molekulargenetische Veränderungen	10
Struktur und Funktion des PABPN1	11
Vergleich mit anderen Erbkrankheiten mit verlängerter Polyalaninsequenz	13
Pathogenetischer Mechanismus	14
Patienten	17
Molekularbiologische Methoden	24
DNA-Isolierung	24
PCR	24
Aufreinigung und Sequenzierung	25
Allelische Sequenzierung	25
mRNA-Isolierung	26
RT-PCR	26
Denaturierung und Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte	26
PCR mit RT-PCR Primerpaar, Denaturierung und Fragmentanalyse	27

Ergebnisse	28
1. Versuchsteil: Sequenzanalyse	28
2. Versuchsteil: Transkriptionsanalyse	31
Diskussion	36
Der Mechanismus der (GCG)-Triplet Expansion bei der OPMD	36
Korrelation Genotyp - Phänotyp	40
Einfluss allelischer Transkription auf das klinische Krankheitsbild	42
Zusammenfassung	45
Literatur	46
Anhang	54
Danksagung	54
Lebenslauf	55

Einleitung

Das Thema dieser Dissertation sind molekularbiologische Untersuchungen zur Okulopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD). Als Einführung in diese Thematik erfolgt in diesem Abschnitt zunächst eine einleitende Beschreibung der Krankheit. Dabei wird neben dem klinischen Bild, der Diagnostik und der Therapie der OPMD auch deren historische Entwicklung behandelt. Weitere Gesichtspunkte, auf die eingegangen wird, sind Prävalenz und Verbreitung sowie morphologische Veränderungen im Zusammenhang mit der Krankheit. Es erfolgt auch eine Beschreibung der Mutation der OPMD, des davon betroffenen Proteins und des pathogenetischen Mechanismus. Außerdem wird die OPMD mit anderen Erbkrankheiten verglichen, die ebenfalls durch eine Verlängerung einer Polyalaninsequenz im entsprechenden Protein verursacht werden.

Historische Entwicklung

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts war die OPMD immer wieder Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen und Abhandlungen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde über Patienten mit erblicher Ptosis berichtet [41, 37], die erste Beschreibung einer erblichen Ptosis im Zusammenhang mit Schluckbeschwerden erfolgte jedoch erst im Jahr 1915 [82]. In diesem Artikel berichtet Taylor über 4 Mitglieder einer frankokanadischen Familie, die alle unter im mittleren Lebensalter beginnender und progressiv verlaufender Ptosis und Dysphagie litten. Aufgrund der Konstanz des klinischen Bildes sah der Autor den beschriebenen Symptomkomplex als eigenständiges Krankheitsbild an, gab diesem jedoch keinen speziellen Namen.

In den nächsten rund 50 Jahren wurden nur sporadisch Berichte über die OPMD veröffentlicht [71, 5]. Im Jahr 1962 wurde in einem Artikel von Victor et al. der Name „Okulopharyngeale Muskeldystrophie“ eingeführt und das Krankheitsbild klar beschrieben [91]. Die Autoren definierten die OPMD als autosomal dominante Erbkrankheit, die durch im mittleren Lebensalter beginnende und progressiv verlaufende Dysphagie und Ptosis charakterisiert ist. In Folge dieser Veröffentlichung befassten sich Mitte der 60er Jahre einige Wissenschaftler mit der Krankheit. In diesem Zusammenhang sei auf André Barbeau

hingewiesen, der sehr aktiv an der Erforschung der OPMD beteiligt war. Neben seinen Veröffentlichungen, seinen klinischen Studien und seiner Ahnenforschung erkrankter Familien waren es in erster Linie Vorträge bei diversen Kongressen, mit denen er die Forschung auf diesem Gebiet intensiviert [15].

Im Jahr 1980 veröffentlichten Tomé und Fardeau einen wegweisenden Artikel [85], in dem sie über elektronenmikroskopisch sichtbare, intranukleäre Einschlüsse in Muskelfasern von OPMD-Patienten berichteten. Diese tubulofilamentösen Einschlüsse mit einem äußeren Durchmesser von 8,5 nm wurden bei keiner anderen Krankheit entdeckt und gelten seither als charakteristisches Merkmal der OPMD [14].

In der Zeit vom 22. bis 23. September 1995 fand im kanadischen Québec City das „First International Symposium on Oculopharyngeal Muscular Dystrophy“ statt, bei dem sich viele Experten trafen, um wichtige Fragen im Zusammenhang mit der Krankheit zu diskutieren [16]. Ein Thema war unter anderem die bis dahin nicht abgeschlossene Suche nach dem Gen, welches für die OPMD verantwortlich ist. Wusste man zum Zeitpunkt des Symposiums lediglich, dass sich das Gen auf Chromosom 14 im Bereich 14q11.2-q13 befinden muss [22], so kam der Durchbruch schließlich im Jahr 1998. Brais et al. identifizierten eine kurze Verlängerung eines (GCG)₆-Traktes am Beginn des *PABPN1*-Gens als die für die Krankheit verantwortliche Mutation [20].

Mit Hilfe der stetig zunehmenden Möglichkeiten der modernen Molekularbiologie ist man nun auf der Suche nach den Mechanismen, welche, ausgehend von der Mutation über die intranukleären Einschlüsse, zur Ausprägung der für die Krankheit charakteristischen Symptome führen [39].

Prävalenz und Verbreitung

Die OPMD ist eine seltene Krankheit, deren geschätzte Prävalenz in weiten Teilen Europas ungefähr 1:100.000 beträgt [39]. Es gibt jedoch auch ethnische Gruppen, in denen die Krankheit häufiger vorkommt. Unter der frankokanadischen Bevölkerung liegt die Prävalenz beispielsweise bei ungefähr 1:1000, bei Juden, die aus der usbekischen Stadt Bukhara stammen und nun in Israel leben, beträgt die Prävalenz sogar ungefähr 1:600 [39]. Die ersten Publikationen über die OPMD stammen dementsprechend hauptsächlich aus Kanada, so dass nicht klar war, ob die Krankheit nur dort oder weltweit zu finden ist [82, 91, 5]. Da inzwischen in Veröffentlichungen aus vielen Ländern, wie z.B. aus Deutschland [56],

Frankreich [24], Finnland [47], Australien [11], Brasilien [60], Uruguay [63], China [44] und Japan [70] über die Krankheit berichtet wurde, kann man von einer weltweiten Verbreitung ausgehen.

Diagnose

Die Diagnose der OPMD kann bei Patienten auf drei verschiedene Arten gestellt werden. Die erste Möglichkeit stellen klinische Tests dar, die zweite elektronenmikroskopische Untersuchungen und die dritte Methode sind molekularbiologische Untersuchungen, wobei die beiden letzten Nachweisverfahren die zuverlässigsten Methoden sind.

Aufgrund klinischer Kriterien wird die Diagnose als gesichert angesehen, wenn die drei folgenden Kriterien erfüllt sind [59, 18, 21]:

1. Zumindest an einem Auge beträgt die Lidspaltenweite in Ruhe weniger als 9 mm oder es liegt ein Zustand nach chirurgischer Korrektur vor.
2. Es wird mehr Zeit als 7 Sekunden benötigt, um 80 ml eiskaltes Wasser zu trinken.
3. Es liegt eine histopathologisch bestätigte positive Familienanamnese vor.

Für die elektronenmikroskopische Diagnose der OPMD ist die Entnahme einer Biopsie eines von der Krankheit betroffenen Muskels notwendig. Findet man im elektronenmikroskopischen Bild die charakteristischen tubulofilamentösen Einschlüsse, so gilt dies als ultrastruktureller Nachweis der OPMD [59].

Das modernste diagnostische Verfahren ist die molekulargenetische Untersuchung, für die lediglich eine Blutentnahme erforderlich ist. Bei Vorliegen einer für die Krankheit verantwortlichen Mutation zu Beginn des *PABPN1*-Gens kann die Diagnose ebenfalls als gesichert angesehen werden [59, 21].

Klinisches Bild

Der Krankheitsverlauf der OPMD beginnt typischerweise in der 5. oder 6. Lebensdekade durch die klinische Manifestation der beiden Hauptsymptome, nämlich Ptosis und Dysphagie [19]. Bezüglich des Alters, in dem die ersten Krankheitsmerkmale auftreten, existieren jedoch große interindividuelle Unterschiede. Beispielsweise wurden in einer Studie mit 79 OPMD-

Patienten die ersten Symptome im Alter zwischen 21 und 78 Lebensjahren beobachtet, folglich lagen diesbezüglich interindividuelle Differenzen von bis zu 57 Jahren vor [13].

Die Ptosis (Herabhängen der oberen Augenlider) tritt in den meisten Fällen als erstes Symptom auf [19]. Sie wird hervorgerufen durch eine Schwäche des M. levator palpebrae. Sie tritt häufig symmetrisch auf, es ist jedoch auch möglich, dass ein Auge stärker betroffen ist als das andere [76]. Im Gegensatz zu anderen Muskelerkrankungen ist bei der OPMD der M. orbicularis oculi in der Regel nicht involviert [52]. Der progrediente Verlauf der Ptosis bedingt eine zunehmende Einschränkung des Blickfeldes [86]. Durch den Versuch, dies zu kompensieren, entsteht die für die OPMD typische Haltung mit in den Nacken gelegtem Kopf und chronisch kontrahiertem M. frontalis [52]. Durch den ständig nach hinten geneigten Kopf kann es zu Verspannungen und Schmerzen im Bereich der Nackenmuskulatur kommen [76]. Im weiteren Verlauf der Krankheit können neben dem M. levator palpebrae unter Umständen auch noch andere extraokuläre Muskeln betroffen sein, wodurch Einschränkungen der Augenmotilität hervorgerufen werden können. In manchen Fällen kommt es zur Diplopie, sehr selten auch zu einer totalen externen Ophthalmoplegie [19].

Neben der Ptosis ist die Dysphagie (Schluckbeschwerden) das zweite Hauptsymptom der OPMD. Sie wird hervorgerufen durch Schwächung der ösophagealen Muskulatur, welche unter physiologischen Umständen am Transport des Bolus durch den Ösophagus beteiligt ist [29]. Mit manometrischen und radiologischen Untersuchungen wurde die pharyngeale Muskulatur von OPMD-Patienten mit der einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Dabei stellte man bei den OPMD-Patienten geringeren Druck, längere Dauer und geringere Frequenz der peristaltischen Bewegungen während des Schluckaktes fest [35]. Die Dysphagie weist einen progredienten Verlauf auf [29]. Zunächst sind die Schluckbeschwerden auf feste Nahrung beschränkt, im weiteren Verlauf bereitet auch das Schlucken von Flüssigkeiten Probleme [86]. Für die Patienten sind die Schluckbeschwerden sehr unangenehm. So kommt es während der Nahrungsaufnahme häufig zur Aspiration und Regurgitation von Speisen und während des Schlafes zur Aspiration von Speichel [86, 35]. In einem fortgeschrittenen Stadium können die Schluckbeschwerden ernsthafte Folgen nach sich ziehen, wie z.B. ungewollten Gewichtsverlust und Aspirationspneumonien [40]. In Extremfällen sterben OPMD-Patienten sogar an den Folgen der Schluckbeschwerden. Dazu kann es z.B. durch Ersticken, wenn ein Speisebolus im Oropharynx stecken bleibt, durch Unternährung oder durch Komplikationen im Rahmen einer Aspirationspneumonie kommen [40].

Ein weiteres Symptom, welches häufig im Zusammenhang mit der OPMD auftritt, ist die Schwäche der proximalen Extremitäten, wobei die oberen Extremitäten nicht so häufig und so

stark betroffen sind wie die unteren [13]. Sie wird hervorgerufen durch eine Schwächung der Oberschenkel- und Beckengürtelmuskulatur, bzw. Oberarm- und Schultergürtelmuskulatur. Normalerweise tritt dieses Krankheitsmerkmal erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf, es gibt jedoch auch Fälle, in denen es als Erstsymptom beobachtet wird [59, 89]. Je nach Schweregrad der Extremitätenschwäche kann es dadurch zu Einschränkungen im täglichen Leben kommen, unter Umständen sind das Treppensteigen und das Aufstehen aus dem Sitzen erschwert oder nicht mehr ohne fremde Hilfe möglich. Bei schwereren Fällen wird zur Fortbewegung eine Gehhilfe benötigt und in Extremfällen kann es so weit kommen, dass der Patient nicht mehr in der Lage ist, seinen körperlichen Bedürfnissen ohne fremde Hilfe nachzugehen [89]. Es existieren Berichte über Patienten, bei denen die Extremitätenschwäche mit belastungsabhängigen Schmerzen assoziiert ist [59].

Neben den bereits beschriebenen Symptomen gibt es eine Reihe weiterer klinischer Befunde, die im Rahmen einer fortgeschrittenen OPMD auftreten können. In der großen Mehrheit der Fälle kommt es zur Atrophie und zu Schwächeerscheinungen der Zunge [17]. Die meisten Patienten entwickeln aufgrund der Mitbeteiligung der palatinalen Muskeln eine nasale Sprache [19]. Unter Umständen kann es zur Schwächung der mimischen Muskulatur, des M. masseter, des M. temporalis, der Nackenmuskulatur und der Muskulatur des Körperstammes kommen.

Auch wenn vor allen Dingen im Zusammenhang mit der Dysphagie einige Todesfälle beschrieben wurden, kommt es in der Regel durch die OPMD nicht zu einer Verminderung der Lebenserwartung [72, 9, 77]. Die Lebensqualität der Betroffenen wird jedoch zum Teil erheblich eingeschränkt.

Therapie

Zur Therapie der Ptosis stehen chirurgische Maßnahmen im Vordergrund, es gibt jedoch auch die Möglichkeit, die Augenlider durch eine Bügelbrille offen zu halten [59]. Als operative Maßnahmen kommen vor allem eine Teilresektion des M. levator palpebrae oder eine Raffung des M. frontalis in Frage [29]. Zur Abwägung, welche operative Maßnahme gewählt werden sollte, stellte Beard Richtlinien auf (Tab.1; zitiert nach [76]). Auch wenn diese durch eine Langzeitstudie mit 91 Patienten bestätigt werden konnten [76], wird in einer aktuelleren Veröffentlichung eine stärkere Berücksichtigung des Lebensalters bei der Auswahl der Operationsmethode gefordert [29]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei stärkerer

Ptosis und jüngerem Lebensalter eher eine Raffung des M. frontalis indiziert ist. Die Ergebnisse der chirurgischen Korrekturmaßnahmen der Ptosis sind im Allgemeinen zufrieden stellend, auch wenn in der Regel nach einiger Zeit das Symptom erneut auftritt [19]. Dies ist in erster Linie auf den progredienten Charakter der Erkrankung zurückzuführen.

Schweregrad der Ptosis	Funktion des LP	Chirurgisches Vorgehen
schwach (1-2mm)	gut (> 7mm)	späteres Stadium abwarten
mittelmäßig (3mm)	gut (> 7mm)	mittelmäßig große Resektion des LP (14-17mm)
	mittelmäßig (5-7mm)	große Resektion des LP (18-22mm)
	schlecht (< 4mm)	maximal große Resektion des LP (23-25mm) oder Straffung des M. frontalis
stark (> 3mm)	mittelmäßig (5-7mm)	große bis maximal große Resektion des LP (18-25mm)
	schlecht (< 4mm)	Straffung des M. frontalis

Tabelle 1: Beards Richtlinien zur chirurgischen Korrektur der Ptosis (zitiert nach [76]). Schweregrad der Ptosis wird gemessen zwischen normaler und herabhängender Position des Oberlids. Funktion des LP (M. levator palpebrae) ist die Differenz zwischen maximal nach oben und nach unten bewegtem Oberlid.

Zur Therapie der Schluckbeschwerden ist die krikopharyngeale Myotomie die Methode der Wahl [40]. Der M. cricopharyngeus ist zwar in den meisten Fällen nicht sehr stark von der Krankheit betroffen [29], da er aber den oberen ösophagealen Sphinkter bildet, stellt er für den Speisebolus eine Barriere dar, die durch Kontraktion der pharyngealen Muskulatur überwunden werden muss [34]. Durch das standardisierte operative Verfahren wird der Widerstand, den der obere ösophageale Sphinkter dem Speisebolus entgensetzt, signifikant verringert [34, 36]. Bei den meisten Patienten tritt postoperativ eine deutliche Verbesserung auf, jedoch können die Schluckbeschwerden nach einigen Jahren erneut auftreten [34, 72, 43]. Neben der krikopharyngealen Myotomie gibt es noch weitere Methoden zur Therapie der Schluckbeschwerden. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, den oberen ösophagealen Sphinkter aufzudehnen, jedoch kommt es bei diesem Verfahren bereits nach kurzer Zeit zu Rezidiven [62]. In einem Fallbericht wird die erfolgreiche Therapie der Schluckbeschwerden durch die Anwendung von Botulinumtoxin beschrieben [75]. Aufgrund unzureichender

Erfolgsaussicht bzw. mangelnder klinischer Tests ist der Indikationsbereich dieser alternativen Verfahren jedoch sehr stark begrenzt, z.B. auf Patienten, bei denen der allgemeine Gesundheitszustand ein invasives Verfahren kontraindiziert [75].

Morphologische Veränderungen

Im Rahmen der OPMD kommt es zu einigen morphologischen Veränderungen in den betroffenen Muskelfasern. Charakteristisch für die OPMD sind tubulofilamentöse Einschlüsse mit einem äußeren Durchmesser von ca. 8,5 nm in den Kernen von Muskelfasern [85]. In der Regel sind diese in ungefähr 2-5% der Kerne der untersuchten Muskelbiopsien zu finden, wobei dieser Wert großen Schwankungen unterliegt [87]. Diese Einschlüsse bestehen aus tubulären Filamenten, die häufig palisadenförmig oder irregulär angeordnet sind [14]. Die von den Einschlüssen eingenommene Fläche variiert von Nukleus zu Nukleus stark [83]. Verfügt ein Muskelfaserkern über eine große Anzahl von tubulofilamentösen Einschlüssen, so ist die entsprechende Zone bereits im lichtmikroskopischen Bild zu erkennen, da sie heller ist als das sie umgebende Kerngebiet [83]. Wie bereits erwähnt, haben die tubulären Filamente einen äußeren Durchmesser von ungefähr 8,5 nm, der innere Durchmesser beträgt ca. 3 nm [85]. Sie erreichen eine Länge von 0,25 µm, überschreiten diese aber in der Regel nicht und weisen keine Verzweigungen oder Verästelungen auf. Gelegentlich ist eine Streifung der Einschlüsse in einem Intervall von 7-7,5 nm vorhanden [85]. Da bei keiner anderen pathologischen Veränderung tubuläre Filamente dieser Struktur beobachtet wurden, gelten diese als spezifisches ultrastrukturelles Merkmal der OPMD [83, 84]. Im Zusammenhang mit der Erforschung des pathogenetischen Mechanismus der Krankheit wurde unter anderem auch die Zusammensetzung dieser intranukleären Einschlüsse untersucht. Man stellte fest, dass die Einschlüsse PABPN1, mRNA, Hitze-Schock-Proteine und Ubiquitin enthalten [26, 1].

Neben den intranukleären Einschlüssen sind in Muskelbiopsien noch weitere morphologische Veränderungen zu beobachten, die jedoch nicht spezifisch für die Krankheit sind. Häufig nachweisbar sind sog. „rimmed vacuoles“, irregulär geformte Vakuolen, die im Sarkoplasma der Muskelfasern lokalisiert sind [83]. Neben der OPMD findet man sie auch häufig bei der Einschlußkörpermyositis und anderen Muskelerkrankungen [92]. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erscheinen die sog. „rimmed vacuoles“ als polygonale oder unregelmäßig runde, helle Fläche, begrenzt von einem aus basophilem Material bestehenden

Rand [19]. Die Vakuolen sind autophagischer Natur, in vielen Vakuolen sind saure Phosphatasen nachweisbar [83].

Des Weiteren finden sich in den Muskelpräparaten oftmals kleine, anguliert konfigurierte Fasern, die im gesamten Muskel verteilt sind und eine starke Reaktionsfähigkeit gegenüber oxidativen Enzymen aufweisen [19]. Im Rahmen der myofibrillären ATPase-Reaktionen ist in der Regel eine zahlenmäßige Dominanz der Typ 1- gegenüber den Typ 2-Muskelfasern nachzuweisen [19].

Außerdem sind im Zusammenhang mit der OPMD oftmals tubuläre Filamente vorhanden, die den tubulofilamentösen Einschlüssen der Einschlusskörpermyositis sehr ähnlich sind [31]. Aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften sind sie jedoch streng abzugrenzen von den für die OPMD spezifischen oben beschriebenen nukleären Einschlüssen. So haben sie einen äußeren Durchmesser von 16 bis 18 nm und sind in Bündeln angeordnet [31]. Die Lokalisation ist vorwiegend im Sarkoplasma der Muskelfasern, nur selten befinden sie sich im Kern [31].

Gelegentlich findet man in Muskelpräparaten von OPMD-Patienten, die mit der Trichrom-Färbung behandelt wurden, sog. „ragged-red fibers“ [33]. Normalerweise sind solche Fasern ein Hinweis auf mitochondriale Erkrankungen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass einige Autoren über mitochondriale Anomalien bei der OPMD berichten und somit ein mitochondrialer Einfluss auf die Pathogenese denkbar ist [6, 33, 42, 65, 80].

Weitere pathologische Veränderungen, die in Muskelpräparaten beobachtet wurden, sind Variabilität der Muskelfasergröße, Verminderung der Muskelfaseranzahl, mittelständige Kerne, erhöhte Kernzahl und verfettete Fasern [86].

Molekulargenetische Veränderungen

Die genetische Grundlage der OPMD ist eine Mutation des *PABPN1*-Gens, welches sich auf Chromosom 14 im Bereich 14q11 befindet. Beim Wildtyp des Gens beginnt das erste Exon folgendermaßen (5´-3´): (ATG)(GCG)₆(GCA)₃(GCG). Aus dieser Kodonabfolge resultiert im PABPN1 ein zehnstelliger Polyalanintrakt direkt nach dem Start-Methionin. Aufgrund einer Mutation kommt es zu einer Expansion der (GCG)₆-Wiederholung auf (GCG)₈₋₁₃, was im Protein eine Verlängerung des zehnstelligen Polyalanintraktes auf 12 bis 17 Stellen zur Folge hat [20]. Diese Mutation ist meiotisch sehr stabil, woraus der autosomal dominante Typ der OPMD resultiert [20]. Es ist noch nicht klar, inwiefern die Anzahl der überzähligen (GCG)-

Triplets einen Einfluss auf Manifestationsalter oder Schweregrad der Symptome hat. Manche Autoren konnten keine Korrelation zwischen der Länge der Mutation und der Schwere der Symptome finden [19], andere hingegen berichten über schwerere Verlaufsformen bei längeren (GCG)-Einschüben [48]. Auch gibt es Hinweise, dass der (GCG)₉-Genotyp zu der schwersten Ausprägungsform der Krankheit führt [73]. Zweifelsohne besteht ein Unterschied in der Verlaufsform der Krankheit zwischen homozygoten und heterozygoten Trägern der Mutation, wobei die homozygoten Individuen eine stärkere Ausprägung und ein früheres Manifestationsalter der Symptome zeigen [20]. In einer Studie wurden homozygote und heterozygote Individuen in Bezug auf das Auftreten der ersten Krankheitssymptome und auf intranukleäre Einschlüsse untersucht [12]. Dabei fand man im Vergleich zu den heterozygoten Patienten bei den homozygoten Trägern des mutierten Allels einen im Durchschnitt 18 Jahre früheren Beginn der Krankheit und 4,5% mehr Muskelfaserkerne mit tubulofilamentösen Einschlüssen.

Neben der (GCG)₈₋₁₃-Mutation kann auch die (GCG)₇-Mutation zur OPMD führen, jedoch nur bei homozygoten Trägern. Ist das andere Allel nicht mutiert, so kommt es nicht zur Manifestation der Krankheitssymptomatik. Liegt neben der (GCG)₇-Mutation innerhalb des einen Allels zusätzlich eine (GCG)₈₋₁₃-Mutation des anderen Allels vor, so kommt es zu einer schwereren Verlaufsform der Krankheit als bei homozygoten Trägern der (GCG)₈₋₁₃-Mutation [20]. Somit fungiert die (GCG)₇-Mutation sowohl als autosomal rezessive Mutation als auch als modifizierender Faktor der autosomal dominanten Mutation [20].

Zwei mechanistische Modelle werden diskutiert, welche die zur OPMD führenden Mutationen verursachen könnten. Zum einen wird der „unequal crossing over“-Mechanismus, zum anderen das „polymerase slippage“-Modell für die Entstehung einer derartigen Mutation herangezogen [19].

Struktur und Funktion des PABPN1

Das „poly(A) binding protein nuclear1“ (PABPN1) ist auch unter dem Namen „poly(A) binding protein2“ (PABP2) bekannt und besteht aus 306 Aminosäuren. Im Bereich des N-Terminus gibt es eine prolinreiche Region, das C-Ende des Proteins ist argininreich und in der Mitte befindet sich eine mutmaßliche RNA-Bindungsstelle vom RNP-Typ [39]. Der bei der OPMD verlängerte Polyalaninabschnitt befindet sich direkt am N-terminalen Ende des PABPN1, unmittelbar hinter dem Start-Methionin.

Das hauptsächlich im Zellkern lokalisierte PABPN1 ist an mehreren Prozessen beteiligt [57]. Das Protein katalysiert die Darstellung von Poly-A-Schwänzen am 3'-Ende der mRNA [93] und kontrolliert den Abbruch dieser Reaktion nach ungefähr 250 Adenylresten [94]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass PABPN1 zwischen Zellkern und Cytoplasma hin und her pendelt, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass es auch am Prozess des mRNA-Transportes beteiligt ist [2, 25, 28].

Die posttranskriptionale Verlängerung der mRNA mit Poly-A ist ein komplexer, zweigeteilter Vorgang, bei dem auf die endonukleolytische Spaltung der mRNA das eigentliche Anfügen des Poly-A-Schwanzes folgt. Neben PABPN1 sind noch mehrere andere Komponenten für den Prozess der Poly-A-Verlängerung notwendig, unter anderem die „poly(A) polymerase“ (PAP), der „cleavage and polyadenylation specific factor“ (CPSF), der „cleavage factor I“ (CF I), der „cleavage factor II“ (CF II), der „cleavage stimulation factor“ (CstF) und die „AAUAAA“ Signalsequenz der mRNA [30, 64, 96, 100].

Zu Beginn der Reaktion bildet sich ein Komplex, bestehend aus PAP, CPSF, PAP, CF I, CF II, CstF und der mRNA. Es folgt die Abspaltung des sich an die Signalsequenz anschließenden 3'-Endes der mRNA, woraufhin der Komplex zerfällt. Die einzigen Proteine, die noch an der mRNA gebunden bleiben, sind PAP und CPSF [54]. Dabei bindet der CPSF an die Signal-Sequenz der mRNA, während die PAP die Anheftung der ersten Adenylreste katalysiert [30]. In Abwesenheit von PABPN1 ist dieser Prozess relativ langsam und uneffektiv [69]. PABPN1 hat eine hohe Affinität zu entstehenden Poly-A-Schwänzen [95]. Nachdem mindestens 10 Adenylreste angefügt wurden, bindet PABPN1 an den Poly-A-Schwanz der mRNA [54]. Dadurch steigt die Geschwindigkeit der Verlängerungsreaktion von 5 Adenylresten pro Minute ohne PABPN1 auf 1500 Adenylreste pro Minute [69]. Zusätzlich wird der Komplex durch PABPN1 stabilisiert [10]. Je länger der Poly-A-Schwanz wird, desto mehr PABPN1 Moleküle binden an ihn, wobei auf ungefähr 15 Adenylreste ein PABPN1 Molekül kommt [95, 69]. Nachdem der Poly-A-Schwanz eine Länge von ca. 250 Adenylresten erreicht hat, tritt ein rapider Abfall der Geschwindigkeit der Verlängerungsreaktion ein, es werden praktisch keine neuen Adenylreste mehr angehängt [94]. Dieser Abbruch der Verlängerung hängt wahrscheinlich mit dem stöchiometrischen Verhältnis von PABPN1-Molekülen zu Adenylresten zusammen [94].

Vergleich mit anderen Erbkrankheiten mit verlängerter Polyalaninsequenz

Neben der OPMD gibt es eine Reihe anderer Erbkrankheiten, die ebenfalls auf Mutationen zurückzuführen sind, welche die Verlängerung eines Polyalanintraktes im entsprechenden Protein hervorrufen. Zu dieser Gruppe von Krankheiten gehören die Polysyndaktylie, die Dysostosis cleidocranialis, das Hand-Fuß-Genital-Syndrom und die Holoprosenzephalie.

Die Polysyndaktylie ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit mit unvollständiger Penetranz, bei der es typischerweise zur Syndaktylie des 3. und 4. Fingers und der 4. und 5. Zehe kommt. Genetische Grundlage ist eine Mutation im *HOXD13* Gen, welche zu einer Verlängerung eines 15stelligen Polyalaninabschnittes um 7 bis 14 weitere Stellen führt [46].

Eine Mutation des *CBFA1* Gens, bei der ein Polyalanintrakt von 17 auf 27 Stellen erweitert wird, führt zur autosomal dominanten Dysostosis cleidocranialis [66]. Symptome dieser Krankheit sind unter anderem eine Hypoplasie der Schlüsselbeine, eine Hyperodontie und Verknöcherungsstörungen im Bereich der Kalotte. Zusätzlich kommt es zu einer Unterentwicklung des Mittelgesichtes bei gleichzeitiger Hyperplasie des Unterkieferkörpers und daraus resultierender Tendenz zur Angle-Klasse III [50].

Die Hand-Fuß-Mund-Krankheit ist ein sehr seltenes, autosomal dominant oder rezessiv vererbtes Fehlbildungssyndrom. Es treten unter anderem Dysplasie von Daumen und großem Zeh und Missbildungen der Geschlechtsorgane auf. Auch diese Krankheit kann durch eine Verlängerung einer Polyalaninfolge von 18 auf 26 Stellen im *HOXA13* Protein verursacht werden, es gibt jedoch auch andere Mutationen, die diese Krankheit auslösen [45].

Schwere Fehlbildungen des Gehirns und des Gesichts sind in der Regel die Symptome einer Holoprosenzephalie. Die Ursachen der Krankheit sind sehr heterogen, meist tritt sie sporadisch auf, es gibt jedoch auch erblich bedingte Formen der Krankheit. Eine mögliche Ursache ist eine Mutation des *ZIC2* Gens, welche zu einer Verlängerung eines Polyalanintraktes von 15 auf 25 Stellen führt [23].

Wie die OPMD werden alle hier aufgeführten Krankheiten von Mutationen verursacht, die einen verlängerten Polyalanintrakt im entsprechenden Protein kodieren. Dennoch unterscheiden sie sich in einigen Punkten von der OPMD. Bei den oben beschriebenen Erbkrankheiten kommt es hauptsächlich zu Fehlbildungen des skelettalen Systems, bei der OPMD handelt es sich um eine Muskeldystrophie. Des Weiteren entwickeln sich die Missbildungen der hier beschriebenen Krankheiten während der Embryogenese, wohingegen die Symptome der OPMD erst im Laufe des Lebens auftreten. *HOXD13*, *CBFA1*, *HOXA13* und *ZIC2* sind alles Transkriptionsfaktoren, im Gegensatz dazu ist *PABPN1* ein mRNA

bindendes Protein, welches am Prozess der Verlängerung von mRNA mit Poly-A beteiligt ist. Die Polyalaninsequenz des nicht veränderten PABPN1 ist mit 10 Stellen kürzer als die der anderen Proteine (15 bis 18 Stellen) und auch die expandierte Polyalaninfolge ist mit 12 bis 17 Stellen nicht so lang wie die der anderen (22 bis 27 Stellen). In Experimenten mit COS-7 Zelllinien führten Polyalaninsequenzen, welche 19 bis 37 Stellen umfassten, zur Protein-Aggregation, kürzere jedoch nicht [74]. Demnach wäre eigentlich zu erwarten, dass die Proteine mit den 22 bis 27 Stellen umfassenden Polyalaninstrecken aggregieren, nicht jedoch das mutierte PABPN1 der OPMD, dessen Polyalanintrakt maximal 17-stellig ist. Jedoch wurden in keiner der anderen Krankheiten Einschlüsse beschrieben, obwohl diesen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der OPMD zugeschrieben wird. Der pathogenetische Mechanismus der OPMD scheint sich demnach grundsätzlich von dem der anderen Krankheiten zu unterscheiden.

Pathogenetischer Mechanismus

Wie bereits erwähnt, kodiert die (GCG)₆-Basenfolge zu Beginn des ersten Exons des *PABPN1*-Gens den Anfang eines 10-stelligen Polyalanintraktes im Protein, und die Expansion dieser Basenfolge auf (GCG)₈₋₁₃ führt zu einer Verlängerung der Polyalaninsequenz auf 12 bis 17 Stellen. Mehrere Experimente zeigen, dass das PABPN1 mit diesem expandierten Polyalanintrakt ursächlich mit den für die OPMD charakteristischen tubulofilamentösen Einschlüssen in Zellkernen in Zusammenhang steht.

So konnten in Muskelbiopsien von an OPMD erkrankten Patienten mittels immunhistologischer Untersuchungen Anhäufungen des PABPN1 mit verlängertem Polyalanintrakt in Zellkernen ausgemacht werden. Der Anteil der Kerne mit Proteinanhäufungen (2%) war dabei dem Anteil der Kerne mit elektronenmikroskopisch nachweisbaren, für die OPMD typischen intranukleären Einschlüssen (2,5%) annähernd gleich [88].

Andere Experimente dienten der Erforschung der Zusammensetzung der für die OPMD charakteristischen intranukleären Einschlüsse. Muskelbiopsien von OPMD-Patienten wurden sowohl immunhistologisch als auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die intranukleären Einschlüsse PABPN1 enthalten [26, 8]. In Experimenten an Zellen mit mutiertem *PABPN1*-Gen wurde die Zusammensetzung der entstandenen

intranukleären Aggregate untersucht. Dabei fand man neben PABPN1 auch noch andere Bestandteile, nämlich SKIP, Ubiquitin, Proteasom, HSPs und mRNA [26, 1, 55].

In einem Experiment mit COS-7 Zellen wurden einige Zellen mit dem mutierten *PABPN1*-Gen und andere mit dem Wildtyp des Gens transfiziert. Im Gegensatz zu den Zellen mit dem nicht mutierten Gen kam es in Zellen mit der Mutation zur Bildung intranukleärer Protein-Aggregate und zum früheren Zelltod [81]. Dieses Transfektionsexperiment wurde inzwischen mehrmals wiederholt, wobei in allen Experimenten die Bildung intranukleärer Einschlüsse und der im Vergleich zur Kontrollzellgruppe frühere Zelltod beobachtet wurde [7, 1]. Somit scheint bewiesen, dass das veränderte Protein die intranukleären Einschlüsse induziert, jedoch ist unklar, wie es zu der Aggregation kommt.

So wurde in einem Experiment mit COS-7 Zellen nachgewiesen, dass Polyalanintrakte mit 19 und mehr Stellen spontan zur intrazellulären Protein-Aggregation und damit zum früheren Zelltod führen [74]. Jedoch wurde in diesem Experiment keine pathologische Aggregation von kleineren Polyalanintraktverlängerungen beobachtet. Der verlängerte Polyalaninabschnitt bei der OPMD umfasst jedoch maximal 17 Stellen.

Eine weitere Beobachtung trägt zur Erklärung der Bildung intranukleärer Einschlüsse bei: Wenn das PABPN1 Poly-A-Sequenzen bindet, bildet es lineare Filamente und kleine, kompakte Oligomer-Partikel aus [53]. Diese linearen Filamente haben einen maximalen Durchmesser von 7 nm, während die Oligomer-Partikel über einen maximalen Durchmesser von 21(+/-2) nm verfügen [53]. Diese Werte werden erreicht, wenn die Länge der gebundenen Poly-A-Sequenz 200-300 Adenylmoleküle beträgt [53]. Auch in Abwesenheit von mRNA ist das PABPN1 in der Lage, Oligomer-Partikel zu bilden [69]. Zwei Domänen innerhalb des Proteins sind für die Bildung der Oligomere verantwortlich. Werden sie inaktiviert, so kommt es nicht zur Bildung der Partikel. Dies hat zur Folge, dass es auch nicht zur Entstehung der intranukleären Protein-Aggregate kommt [38]. Es scheint also, dass die Oligomer-Partikel, obwohl sie selbst nicht pathologisch sind, der Bildung der intranukleären Einschlüsse Vorschub leisten.

Ein weiterer Fokus der Untersuchungen des Pathomechanismus der OPMD stellt die Interaktion von PABPN1 mit SKIP dar. SKIP ist die Abkürzung für „Ski-interacting protein“. Wie der Name schon vermittelt, reagiert das Protein mit dem Onkoprotein Ski. Außerdem scheint SKIP als Co-Faktor der Transkription zu agieren [39, 32]. In Zellexperimenten wurde festgestellt, dass PABPN1 mit SKIP interagiert und Einfluss auf die Transkription muskelspezifischer Gene hat [55]. Demzufolge könnte die Pathogenese der OPMD mit Störungen der normalen Transkriptionsvorgänge in Muskelfasern zusammenhängen.

Der so genannte „ubiquitin-proteasome pathway“ (UPP) ist ein Mechanismus mit der Funktion, Proteine, unter anderem auch falsch gefaltete, abzubauen. Dazu muss zunächst das abzubauende Protein mit Ubiquitin markiert werden, bevor es von der multikatalytischen Protease des Proteasoms abgebaut werden kann [61]. In COS-7 Zellen mit mutiertem *PABPN1*-Gen führt die Inhibition des UPP-Mechanismus zu einer vermehrten Anzahl von intranukleären Einschlüssen und zu einer erhöhten Zell-Toxizität [1]. Daraus lässt sich ein möglicher Einfluss des fehlerhaften UPP-Mechanismus auf die Pathogenese der OPMD ableiten.

Hitze-Schock-Proteine (HSPs) sind molekulare Chaperone, multimere Proteinkomplexe, denen unter anderem die Aufgabe zukommt, während der Proteinfaltung die Protein-Aggregation zu verhindern [61]. Wurden in Zellexperimenten neben dem veränderten PABPN1 auch HSPs exprimiert, führte dies zu weniger intranukleären Einschlüssen und einer längeren Lebensdauer der Zellen [7]. Folglich könnten auch die HSPs an der Entstehung der OPMD beteiligt sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Mutation des *PABPN1*-Gens zu einem verlängerten Polyalanintrakt im PABPN1 führt und dieses veränderte Protein die Entstehung intranukleärer Einschlüsse induziert, welche einen früheren Tod der betroffenen Zellen verursachen. Wie genau dieser Mechanismus funktioniert und welche weiteren Komponenten in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind, ist nach wie vor nicht klar. Allerdings geben die oben beschriebenen Untersuchungen Hinweise auf mögliche Faktoren, die einen Einfluss auf den pathogenetischen Mechanismus der OPMD haben könnten.

Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekularbiologische Untersuchungen zur Okulopharyngealen Muskeldystrophie durchgeführt. Die untersuchte DNA und RNA wurde aus Muskelbiopsien von 6 OPMD-Patienten isoliert, die aufgrund der durch die Krankheit hervorgerufenen Symptome in stationärer Behandlung waren. Die Muskelbiopsien sind in der Zeit vom 29.06.1999 bis zum 18.02.2003 im Institut für Neuropathologie der RWTH Aachen zur histopathologischen Untersuchung eingegangen. Im Folgenden werden Anamnese (einschl. Familien-Anamnese), klinischer Befund und neurohistopathologisches Untersuchungsergebnis der einzelnen Patienten beschrieben. Die klinischen und anamnestischen Daten wurden uns von den behandelnden Fachärzten der jeweiligen Kliniken zur Verfügung gestellt. Da die Patienten in unterschiedlichen Krankenhäusern behandelt wurden, sind die durchgeführten Untersuchungen nicht einheitlich und die klinischen Befunde deshalb nicht in jeder Hinsicht korrelierbar.

Patient 1

Anamnese:

Der Patient ist zum Zeitpunkt des Klinikaufenthalts 72 Jahre alt. Seit dem 62. Lj. ist eine zunehmende Schwäche der Arme und Beine zu beobachten. Bereits vor dem 62. Lj. bemerkt der Patient eine beidseitige Ptosis. Ungefähr seit dem 70. Lj. klagt der Patient über Schluckbeschwerden. Dem Patienten ist kein ähnlicher Fall in seiner Familie bekannt.

Klinischer Befund:

Der allgemeine klinische Befund ist unauffällig, der Patient befindet sich in einem guten Allgemein- und Ernährungszustand. Vorhanden sind eine ausgeprägte beidseitige Ptosis, eine leichte Schwäche der mimischen Muskulatur und eine nasale Phonation. Es liegt eine leichtgradige oropharyngeale Dysphagie vor. Neben manifesten Paresen der Arm- und proximalen Beinmuskulatur ist eine Atrophie der Beckenringmuskulatur vorhanden, die distale Beinmuskulatur ist vollkräftig. Beim Beinhalteversuch kommt es zum Absinken.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

Zur Untersuchung gelangt eine Biopsie aus dem M. deltoideus links. Lichtmikroskopisch sind angulär konfigurierte teiltrophische und atrophische Fasern, zentralständige Kerne und vereinzelt Vakuolen mit fuchsinophilem Inhalt zu sehen. Nach den ATPase-Reaktionen sind beide Hauptfasertypen betroffen, wobei keine eindeutige Fasertypengruppierung vorhanden ist. Im elektronenmikroskopischen Bild sind neben intranukleären tubulofilamentösen Einschlüssen mit einem Durchmesser von ca. 8,5 nm auch Filamente mit einem Durchmesser von ungefähr 15 nm (mit erheblichen Variationen) im Sarkoplasma vorhanden.

Patient 2

Anamnese:

Zum Zeitpunkt des Klinikaufenthaltes ist der Patient 87 Jahre alt. Seit dem 86. Lj. klagt er über zunehmende Schluckbeschwerden und Probleme beim Abhusten von Bronchialsekret. Aufgrund dessen hat er seit dem Beginn der Beschwerden 7 kg Gewicht verloren. Des Weiteren hat er zunehmend Sprachprobleme. Seit Ende des 86. Lebensjahres bemerkt der Patient eine Schwäche im Schulter-Oberarm-Bereich. Angaben über das Vorliegen vergleichbarer Erkrankungen in der Familie des Patienten wurden nicht gemacht.

Klinischer Befund:

Der Patient befindet sich in einem altersbedingt deutlich reduzierten Allgemeinzustand, der Ernährungszustand ist schlank. Bei intakter Pupillo- und Okulomotorik liegt eine beidseitige Ptosis vor. Die Sprachproduktion erfolgt angestrengt und ist leise. Es sind proximale Schulter-Armparesen Kraftgrad 4+/5 vorhanden, im Beinhalteversuch kommt es nach 2 Sekunden beidseitig zum Absinken.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

In der untersuchten Muskelbiopsie aus dem linken M. deltoideus sind wiederholt deutlich abgeflachte teiltrophische und atrophische Muskelfasern zu finden. Nach den ATPase-Reaktionen stellen sich beide Haupttypen dar, ohne dass eine zahlenmäßige Prädominanz eines Fasertyps zu erkennen wäre. In einzelnen Muskelfasern ist die Anzahl der mittelständigen Kerne leicht erhöht. Im elektronenmikroskopischen Bild sind an mehreren Stellen scharf begrenzte, intranukleäre Einschlüsse mit einem Durchmesser von ca. 8 nm zu erkennen. Andere Fasern weisen eine Vielzahl von Mitochondrien mit parakristallinen Einschlüssen auf.

Patient 3

Anamnese:

Zum Zeitpunkt der stationären Behandlung ist der Patient 56 Jahre alt. Seit dem 53. Lj. leidet er unter Muskelschmerzen im Bereich der Oberschenkel und der Lendenwirbelsäule. Seit dem 54. Lj. klagt er zusätzlich über eine beidseitige Ptosis, Dysarthrie und Dysphagie. Ein Bruder des Patienten weist eine ähnliche Symptomatik auf.

Klinischer Befund:

Die durchgeführten Untersuchungen geben keinen Hinweis auf das Vorliegen einer internistischen Erkrankung. Es sind leichte, proximal betonte Paresen von Armen und Beinen vorhanden, das Aufstehen aus der Hocke ist nur mit Hilfe möglich. Muskelatrophien sind im Bereich der Oberschenkel, im Beckenbereich und im Oberarmbereich zu beobachten. Es besteht eine beidseitige Ptosis, die Sprache des Patienten ist näseltend. Der Schluckakt ist bei Nahrung mit fester Konsistenz deutlich gestört.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

Zur Untersuchung gelangt eine Biopsie aus dem rechten M. gluteus maximus. Lichtmikroskopisch kommen neben normalen Fasern viele teiltröpfische Fasern zur Ansicht, die abgeflacht oder angulär konfiguriert sein können. Neben einer erhöhten Anzahl mittelständiger Kerne sind auch sog. „ragged-red fibers“ vorhanden. Nach den ATPase-Reaktionen ist zu erkennen, dass beide Hauptfasertypen vom atrophischen Prozess betroffen sind. Im elektronenmikroskopischen Bild sind tubulofilamentöse Kerneinschlüsse vorhanden, deren Filamente einen Durchmesser von 8,5 nm haben. Des Weiteren erkennt man im Sarkoplasma tubulofilamentöse Strukturen, deren Durchmesser rund 15 nm beträgt.

Patient 4

Anamnese:

Der Patient ist während seiner stationären Behandlung 58 Jahre alt. Er berichtet, schon seit mehreren Jahren unter einer rechtsbetonten Ptosis zu leiden, welche bereits durch Raffung des rechten Oberlides korrigiert worden sei. Im Alter von 58 Jahren kommt es erneut zu einer deutlichen Progredienz der Ptosis, des Weiteren treten Schluckbeschwerden und Sprachprobleme auf. Auch berichtet der Patient, er habe proximal betonte, atrophische Veränderungen der oberen und unteren Extremitäten bemerkt. Weiterhin leidet er unter teils

spontanen, teils belastungsabhängigen Schmerzen der oberen und unteren Extremitäten. Es sind keine Angaben zur Familien-Anamnese vorhanden.

Klinischer Befund:

Abgesehen von einer Sinusbradykardie im Ruhe-EKG weist der klinisch-internistische Befund keine Besonderheiten auf. Bei normaler Pupillo- und Okulomotorik liegt eine mäßige, rechtsbetonte Ptosis bei Zustand nach Levatorstraffung rechts vor. Die Stimme ist leise, eine Dysphonie ist vorhanden. Es zeigt sich eine leichte, proximal betonte Parese der unteren Extremitäten.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

Zur Untersuchung gelangt eine Biopsie aus dem rechten M. orbicularis oculi. Im lichtmikroskopischen Bild erkennt man neben normal konfigurierten auch teiltrophische Fasern, die abgeflacht oder angulär konfiguriert sind. Autophagische Vakuolen und mittelständige Kerne sind gelegentlich zu beobachten. Es finden sich zahlreiche sog. „ragged-red fibers“. Elektronenmikroskopisch erkennt man in einem Kern massenhaft tubulofilamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von 8,5 nm.

Patient 5

Anamnese:

Das Alter des Patienten beträgt zum Zeitpunkt der stationären Behandlung 64 Jahre. Seit seinem 59. Lj. leidet er unter zunehmender beidseitiger Lidheberschwäche und einer undeutlichen Sprache. Seit wenigen Jahren hat er zusätzlich Schluckstörungen. Sein Vater weist ab ungefähr dem 70. Lj. eine ähnliche Symptomatik auf, seine Schwester ist ebenfalls von ähnlichen Symptomen betroffen.

Klinischer Befund:

Der Patient weist einen altersentsprechend guten Allgemeinzustand und einen adipösen Ernährungszustand auf. Es liegt eine linksbetonte Ptosis vor, Pupillo- und Okulomotorik sind intakt. Der Würgregreflex ist abgeschwächt, es zeigt sich eine Gaumensegelparese rechts und eine Dysphonie. Abgesehen von einer Großzehenheberparese rechts bei Zustand nach Bandscheiben-Operation in Höhe von LWK 4/5 liegen keine weiteren Paresen vor.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

Zur Untersuchung gelangt eine Biopsie aus dem M. deltoideus. Im Lichtmikroskop erkennt man neben normal konfigurierten auch teiltrophische Muskelfasern, die abgeflacht oder abgerundet sein können. Des Weiteren sind einige mittelständige Kerne und eine sog. „ragged-red fiber“ zu beobachten. Elektronenmikroskopisch sind intranukleäre tubulofilamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von 8,5 nm zu sehen (Abb. 1). Im Sarkoplasma kommen demgegenüber fokal Einschlüsse mit einem Durchmesser von ungefähr 17 nm vor.

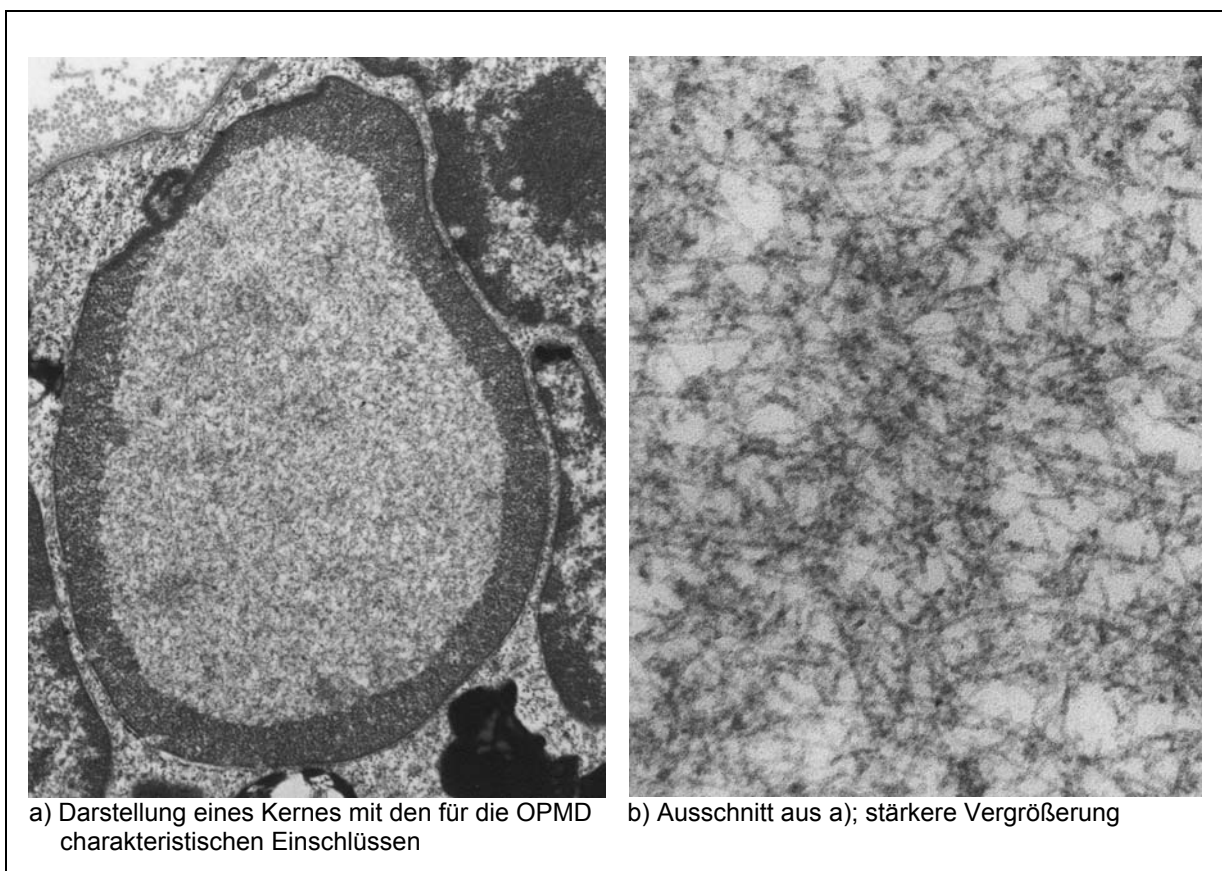


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Muskelbiopsie von Patient 5.

a) zeigt in einer hochgradig atrophischen querschnittenen Muskelfaser den Anschnitt eines Kernes, welcher die für die OPMD charakteristischen Einschlüsse enthält. Zentral ist ein homogener Bezirk zu erkennen, der scharf abgegrenzt ist gegen das marginal an der Kernwand kondensierte Heterochromatin. In diesem inneren Bereich sind zahlreiche tubulofilamentöse Einschlüsse vorhanden. In der Umgebung dieses Kernes sind auf der Aufnahme außerdem noch weitere Anschnitte pyknotischer Kerne zu sehen.

b) zeigt einen Ausschnitt aus a) in einer stärkeren Vergrößerung. In dieser Darstellung ist die Struktur der Einschlüsse erkennbar. Es handelt sich um irregulär angeordnete, tubulofilamentöse Strukturen, deren Durchmesser ca. 8,5 nm beträgt.

Patient 6

Anamnese:

Die Patientin ist zum Zeitpunkt des Klinikaufenthaltes 70 Jahre alt. Seit dem 67. Lebensjahr leidet sie unter einem zunehmenden Herabhängen der Augenlider. Die Patientin hat keine Schwäche der übrigen Muskulatur festgestellt, jedoch treten Schluckbeschwerden auf. Es liegen keine familienanamnestischen Angaben vor.

Klinischer Befund:

Die Patientin ist in einem guten Allgemein- und adipösen Ernährungszustand. Es liegt eine starke Ptosis vor, beim Blick nach links und nach oben ist eine Blickparese festzustellen. Es ist eine diskrete Parese der Armabduktion vorhanden. Beim Ösophagus-Breischluckversuch wurde eine „neurogene“ Schluckstörung mit sekundärer Aspiration im Hypopharynx bei unauffälligem primären Schluckakt beobachtet.

Histopathologisches und elektronenmikroskopisches Untersuchungsergebnis:

Zur Untersuchung gelangt eine Muskelbiopsie aus dem M. deltoideus. Neben normal konfigurierten Fasern sind wiederholt atrophische oder teilatrophische Muskelfasern vorhanden, die meist abgeflacht sind und in Gruppen zusammen liegen. Nach den ATPase-Reaktionen ist eine zahlenmäßige Dominanz der Typ 1-Fasern vorhanden. Im elektronenmikroskopischen Bild sind in einzelnen Sarkolemmkernen reichlich tubulofilamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 8 nm vorhanden. Des Weiteren finden sich in einigen Mitochondrien parakristalline Einschlüsse.

Patient Nr.	Geschlecht	FA [#]	Beginn d. Symptome	Alter bei KA ⁺	Erstes Symptom	Klinische Symptome [°]		
						Ptosis	Dysphagie	Muskelschwäche
1	m.	neg.	60 Lj.*	72 Lj.	Ptosis	+	+	+
2	m.	k.A.	86 Lj.	87 Lj.	Dysphagie	+	+	+
3	m.	pos.	53 Lj.	56 Lj.	Muskelschmerzen	+	+	+
4	m.	k.A.	56 Lj.*	58 Lj.	Ptosis	+	-	+
5	m.	pos.	59 Lj.	64 Lj.	Ptosis	+	+	-
6	w.	k.A.	67 Lj.	70 Lj.	Ptosis	+	+	-

Tabelle 2: Zusammenfassung der anamnestischen und klinischen Daten der molekularbiologisch untersuchten Patienten.

[#]: FA: Familienanamnese; pos.: positiv; neg.: negativ; k.A.: Es liegen keine Angaben vor.

⁺: KA: Krankenhausaufenthalt

* Aufgrund des schleichenden Verlaufes der Symptome ist die Angabe über das Lebensalter der Patienten beim Beginn der Symptome geschätzt worden.

[°]: Die hier aufgeführten klinischen Symptome beziehen sich auf den Zeitpunkt des stationären Klinikaufenthaltes; +: Symptom vorhanden; -: Symptom nicht vorhanden.

Patient Nr.	Muskel*	Lichtmikroskop				Elektronenmikroskop	
		Vakuolen	anguläre Fasern	zentrale Kerne	"ragged-red fibers"	intranukleäre Einschlüsse	Einschlüsse in Mitochondrien
1	M. deltoideus	+	+	+	-	+	-
2	M. deltoideus	-	-	+	-	+	+
3	M. gluteus maximus	-	+	+	+	+	-
4	M. orbicularis oculi	+	+	+	+	+	-
5	M. deltoideus	-	-	+	+	+	-
6	M. deltoideus	-	-	-	-	+	+

Tabelle 3: Zusammenstellung einiger histopathologischer Strukturen, die bei der Untersuchung der Muskelbiopsien der 6 Patienten gefunden wurden. Die einzelnen Veränderungen wurden je nachdem, ob man sie im lichtmikroskopischen oder elektronenmikroskopischen Bild erkennen kann, in die entsprechende Kategorie eingeteilt. Eine genauere Beschreibung der hier aufgeführten histopathologischen Anomalien findet in der Einleitung im Abschnitt „Morphologische Veränderungen“ statt.

*: Muskel, aus dem die Biopsie entnommen wurde.

Molekularbiologische Methoden

Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen zur OPMD lassen sich in zwei Versuchsteile gliedern. Im ersten Versuchsabschnitt wurde durch PCR und Sequenzanalyse die zuvor isolierte DNA auf das Vorliegen der für die Muskelkrankheit charakteristischen Mutation untersucht. Ziel des zweiten Versuchsteils war es, das Vorliegen einer eventuellen allelischen Transkription des PABPN1-Gens zu klären. Dazu wurde zunächst mRNA isoliert und anschließend durch RT-PCR und Fragmentanalyse untersucht. Im Folgenden werden die im Rahmen der durchgeführten Versuche angewandten Methoden beschrieben.

DNA-Isolierung

Die DNA wurde aus den im Abschnitt „Patienten“ näher beschriebenen Muskelbiopsien der 6 untersuchten OPMD-Patienten extrahiert. Im Rahmen der im Institut für Neuropathologie der RWTH Aachen standardisierten Vorgehensweise wurde ein Teil der jeweiligen Muskelbiopsie als Nativpräparat bei -80°C eingefroren, ein anderer Teil in Parafin eingebettet. Die DNA wurde aus dem in Parafin eingebetteten Gewebe isoliert. Dazu wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet.

PCR

Mit der isolierten DNA wurde eine PCR durchgeführt, gemäß dem von Brais beschriebenen Protokoll [20]. Als Vorwärtsprimer wurde 5'-TGGCGCAGTGCCCGCCTTAGA-3', als Rückwärtsprimer 5'-ACAAGATGGCGCCGCCCGCCCGGC-3' verwendet, beide Primer wurden von der Sigma-Ark GmbH (Sigma-Ark GmbH, Steinheim, Deutschland) synthetisiert. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 25 μl , folgende Reagenzien wurden eingesetzt: 14,6 μl H_2O ; 2,5 μl 10x PCR Puffer (Qiagen); 2,5 μl dNTPs, jedes dNTP in einer Konzentration von 2,5 mM (TaKaRa Bio Europe, Gennevilliers, Frankreich); 1,9 μl DMSO; 0,5 μl HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen); je 1 μl Vorwärts- und Rückwärtsprimer, jeweils in

einer Konzentration von 10 μMol ; 1 μl DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Amplifikationsreaktion wurde gestartet durch eine initiale Aktivierungsphase (95° C/ 15 min), es folgten 35 Zyklen Denaturierung (95° C/ 1 min), „Annealing“ (62,9° C/ 1 min) und Extension (72° C/ 1 min), gefolgt von einer abschließenden Extension (72° C/ 7 min).

Aufreinigung und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Mit den aufgereinigten PCR-Produkten wurde anschließend eine Sequenzierungsreaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 μl durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden verwendet: 6,5 μl H₂O; 2 μl BigDye Terminator Mix 3 (ABI, Weiterstadt, Deutschland); 1 μl Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (vgl. „PCR“); 0,5 μl aufgereinigtes PCR-Produkt. Die Sequenzierungsreaktion startete mit einer initialen Aktivierungsphase (96° C/ 1 min), es folgten 25 Zyklen Denaturierung (96° C/ 10 s), „Annealing“ (58° C/ 5 s) und Extension (60° C/ 4 min). Abgeschlossen wurde die Reaktion durch eine finale Extensionphase (60° C/ 7 min). Nach Abschluss der Reaktion wurde der Reaktionslösung 10 μl H₂O zugefügt. Diese verdünnte Reaktionslösung wurde mit Centrisep Columns (Princeton Separations, Adelphia, USA) aufgereinigt. Abschließend wurde die verdünnte und aufgereinigte Reaktionslösung mit einem ABI Prism 310 (ABI) elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet.

Allelische Sequenzierung

Mit der DNA von Patient 5 wurde neben der oben beschriebenen Sequenzanalyse zusätzlich noch eine allelische Sequenzierung durchgeführt. Um genügend PCR-Produkt zu erhalten, erfolgten 4 PCR-Reaktionen nach dem oben beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 3%-Agarosegel aufgetragen, um die unterschiedlich langen Allele voneinander zu trennen. Die Banden mit den beiden Allelen wurden einzeln ausgeschnitten und die PCR-Produkte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert. Anschließend erfolgte wiederum die Durchführung der im Abschnitt „Aufreinigung und Sequenzierung“ beschriebenen Sequenzierungsreaktion, allerdings wurde 1 μl PCR-Produkt und

dementsprechend nur 6 µl H₂O eingesetzt. Ansonsten waren Sequenzierungsreaktion und weiteres Vorgehen identisch mit dem oben beschriebenen.

mRNA-Isolierung

Die mRNA wurde aus den bei -80°C eingefrorenen Muskelbiopsien der 6 OPMD-Patienten isoliert. Dazu wurde das RNeasy Kit (Qiagen) verwendet.

RT-PCR

Für die Untersuchung der mRNA wurde ein Primerpaar entworfen, mit dem es möglich war, DNA und mRNA gleichermaßen zu amplifizieren. Als Vorwärtsprimer wurde 5'-CAGTCTGAGCGGCGATGG-3', als Rückwärtsprimer 5'-CCAGGCCGTTCCCGTAGT-3' verwendet. Der Vorwärtsprimer wurde am 5'-Ende mit einer „fam“-Markierung versehen, beide Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland) synthetisiert. Die RT-PCR wurde mit einem Gesamt-Volumen von 25 µl durchgeführt und war folgendermaßen zusammengesetzt: 10 µl H₂O (RNase-frei); 5 µl Q-Solution; 5 µl 5x Puffer; 1 µl dNTPs; 1 µl Enzym Mix; je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer, jeweils in einer Konzentration von 10 µMol; 1 µl RNA. Dabei stammten H₂O, Q-Solution, 5x Puffer, dNTPs und Enzym-Mix aus dem One Step RT-PCR Kit (Qiagen). Die RT-PCR startete mit einem RT-Schritt (50° C/ 30 min), wurde fortgesetzt mit einer Aktivierungsphase (95° C/ 15 min), es folgten 35 Zyklen Denaturierung (95° C/ 1 min), „Annealing“ (62,9° C/ 1 min) und Extension (72° C/ 1 min). Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer Extensionsphase (72° C/ 7 min).

Denaturierung und Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte

Als Vorbereitung für die Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte wurde eine Lösung, bestehend aus 13,5 µl Formamid, 0,5 µl GeneScan 500 – [TAMRA] Size Standard (PE Biosystems, Warrington, England) und 0,5 µl RT-PCR-Produkt, hergestellt. Zur Denaturierung wurde dieses Gemisch in einem Thermocycler 1 min auf 95° C erhitzt und

dann für 10 min bei 10°C abgekühlt. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe eines ABI Prism 310 (ABI) elektrophoretisch separiert und ausgewertet.

PCR mit RT-PCR Primerpaar, Denaturierung und Fragmentanalyse

Mit dem für die RT-PCR entworfenen Primerpaar wurde eine PCR der Patienten-DNA und anschließend mit den PCR-Produkten eine Fragmentanalyse durchgeführt. Jede PCR hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl und war folgendermaßen zusammengesetzt: 11,5 µl H₂O; 5 µl Q-Solution (Qiagen); 2,5 µl 10x PCR Puffer (Qiagen); 2,5 µl dNTPs, jedes dNTP in einer Konzentration von 2,5 mM (TaKaRa Bio Europe); 0,5 µl HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen); je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer, jeweils in einer Konzentration von 10 µMol; 1 µl DNA, 40 µg/ml. Die PCR wurde durch eine Aktivierungsphase (95° C/ 15 min) gestartet, es folgten 35 Zyklen Denaturierung (95° C/ 1 min), „Annealing“ (62,9° C/ 1 min) und Extension (72° C / 1min), eine Extensionsphase (72° C / 7min) beendete die Reaktion. Das weitere Vorgehen mit den PCR-Produkten war identisch mit den oben beschriebenen Arbeitsschritten der Denaturierung und Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte.

Ergebnisse

Man kann die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen in zwei Abschnitte unterteilen. Ziel des ersten Versuchsteils war es, die DNA der sechs OPMD-Patienten auf die für die Krankheit charakteristische Mutation zu untersuchen. Der zweite Abschnitt fokussierte die Frage, ob die Transkription des mutierten und nicht mutierten Allels bei den Patienten gleich stark ist, oder ob eventuell ein Allel stärker transkribiert wird als das andere.

1. Versuchsteil: Sequenzanalyse

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, liegt der OPMD eine Mutation zu Beginn des *PABPN1*-Gens zu Grunde. Deshalb wurde der Abschnitt des *PABPN1*-Gens der isolierten Patienten-DNA, der die mutmaßliche Mutation enthielt, mittels PCR amplifiziert. Diese Reaktion wurde mit jeder Probe zweimal durchgeführt. Darauf folgte eine Sequenzanalyse der PCR-Produkte. Die Analyse der Produkte der ersten Reaktion erfolgte sowohl mit dem Vorwärts- wie auch mit dem Rückwärtsprimer, die Produkte der zweiten Reaktion wurden nur einmal mit dem Vorwärtsprimer sequenziert. Als exemplarisches Beispiel sind in Abbildung 2 die Sequenzanalysen der PCR-Produkte der ersten PCR aller 6 Patienten nach der Sequenzierungsreaktion mit dem Vorwärtsprimer dargestellt. Durch die Sequenzanalysen konnte die bereits klinisch und ultrastrukturell gestellte Diagnose der OPMD in allen 6 Fällen genetisch bestätigt werden. Alle 6 Patienten besitzen neben einem normalen ein mutiertes *PABPN1*-Allel.

Patient Nr.	nicht mutiertes Allel	mutiertes Allel
1	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₈ (GCA) ₃ (GCG)
2	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₈ (GCA) ₃ (GCG)
3	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₉ (GCA) ₃ (GCG)
4	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₉ (GCA) ₃ (GCG)
5	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₆ (GCA) ₂ (GCG)(GCA) ₃ (GCG)
6	(GCG) ₆ (GCA) ₃ (GCG)	(GCG) ₉ (GCA) ₃ (GCG)

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der durchgeführten Sequenzanalysen

In fünf der sechs Fälle wurden die für die OPMD charakteristischen, von Brais beschriebenen Expansionen des (GCG)₆-Traktes zu Beginn des *PABPN1*-Gens gefunden [20]. In drei Fällen war die Sequenz auf (GCG)₉ und zweimal auf (GCG)₈ expandiert. Bei einem Patienten jedoch wurde eine ungewöhnliche, in der Literatur noch nicht beschriebene Mutation gefunden. Neben dem normalen Allel wurde bei Patient 5 neben einem unmutierten Allel folgende Sequenz entdeckt: (GCG)₆(GCA)₂(GCG)(GCA)₃(GCG). Da die Wildtyp-Basenfolge (GCG)₆(GCA)₃(GCG) lautet, liegt offensichtlich ein (GCA)₂(GCG)-Einschub vor.

Aufgrund dieses ungewöhnlichen Befundes wurde mit der aus der Muskelbiopsie von Patient 5 isolierten DNA ein zusätzlicher Versuch durchgeführt. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, wurden bei den bisher durchgeführten Sequenzanalysen mutiertes und normales Allel gleichzeitig sequenziert. Ziel des zusätzlichen Versuches war es, die beiden Allele getrennt zu analysieren, um so das Vorliegen der bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Mutation zu bestätigen. Der erste Schritt war erneut eine PCR, anschließend wurde das längere, mutierte Allel mittels Gelelektrophorese von dem nicht mutierten getrennt. Daraufhin wurde von beiden Allelen separat eine Sequenzanalyse mit dem Vorwärtsprimer durchgeführt. Auch in diesem Versuch konnte die oben bereits beschriebene Basensequenz eindeutig nachgewiesen und somit das Ergebnis der vorangegangenen Sequenzanalyse bestätigt werden.

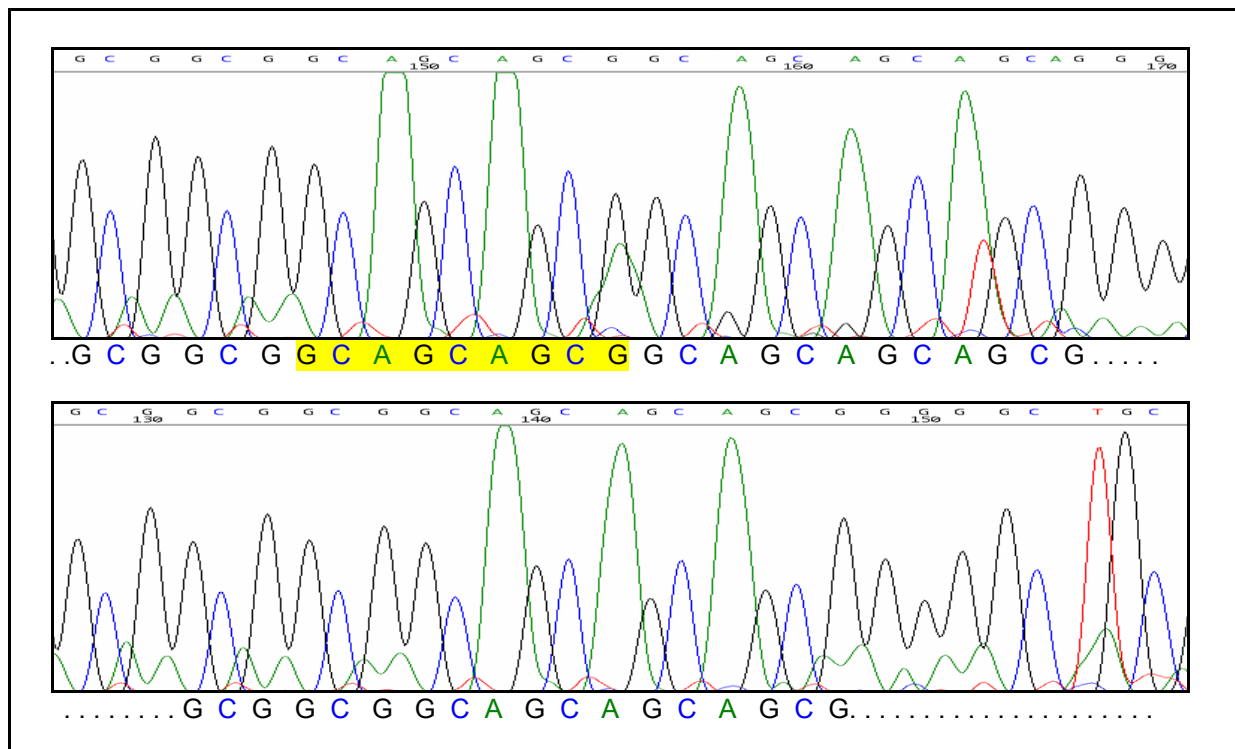


Abbildung 3: Getrennte Sequenzanalyse des mutierten (oben) und nicht mutierten (unten) Allels von Patient 5. Unter der Computer-Auswertung der Sequenzanalyse sind die Basensequenzen der beiden Allele dargestellt. Der Einschub im mutierten Allel ist gelb unterlegt.

2. Versuchsteil: Transkriptionsanalyse

Um Unterschiede in der Transkription zwischen mutiertem und nicht mutiertem *PABPN1*-Allel feststellen zu können, wurde von den 6 Patienten mRNA isoliert. Durch eine RT-PCR wurde der Abschnitt der *PABPN1*-mRNA amplifiziert, der die Mutation beinhaltet. Anschließend wurde eine Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte durchgeführt. In der Fragmentanalyse können neben der Länge anhand der Fluoreszenzintegrale der Produkt-Peaks auch die Menge der Fragmente bestimmt werden. Auf diese Weise wurde das Verhältnis [Fluoreszenzsignal PCR-Produkt des mutierten Allels/Fluoreszenzsignal PCR-Produkt des Wildtyp-Allels] bestimmt. Bei der Betrachtung dieses Verhältnisses muss jedoch zwei Umständen Beachtung geschenkt werden. Zum einen ist die fluoreszenz-basierte Fragmentanalyse eher für die qualitative Analyse ausgelegt, so dass nur ein normierter, semiquantitativer Vergleich für die Bestimmung unterschiedlicher Fragmentmengen sinnvoll erscheint. Zum anderen ist in der RT-PCR gleichermaßen wie in der PCR die Produktausbeute von zwei unterschiedlich langen Fragmenten bei identischen Primern längenabhängig, was in Mikrosatellitenanalysen exemplarisch zu sehen ist. Ähnlich wie in der Mikrosatellitenanalyse zur Bestimmung eines LOHs, in der die Analyse von Wildtyp-DNA mit der von der Tumor-DNA verglichen wird [27], musste zur Ermittlung der Verhältnisse der Transkription von mutiertem zu Wildtyp-Allel ein Referenzbereich bestimmt werden. Um diesen zu ermitteln, wurden die DNA-Proben der Patienten benutzt. Da alle Patienten in Bezug auf die Mutation im *PABPN1*-Gen heterozygot sind, ist das Verhältnis von mutierter zu Wildtyp-DNA 1. Es wurden jeweils 5 PCR-Reaktionen mit der DNA eines jeden Patienten und anschließend eine Fragmentanalyse der PCR-Produkte durchgeführt. Um die Variation der Ergebnisse und den systematischen Fehler, der durch die semiquantitative Analyse von unterschiedlich langen PCR-Produkten entsteht, zu bestimmen, wurde für Patienten mit Insertionen gleicher Länge ein Referenzwert ermittelt. Bestimmt wurde dieser Wert aus den Mittelwerten und den Student-t-Tests (t 0,05) der Fluoreszenzintegrale der PCR-Produkt-Peaks. Der so ermittelte Referenzbereich wurde als Bereich gleicher Transkription zur Grundlage der folgenden Transkriptionsanalysen eingesetzt.

Um wie oben geschildert verfahren zu können, ist es jedoch zunächst notwendig, ein Primerpaar zu entwerfen, mit dem es möglich ist, in einer bis auf den RT-Schritt identischen Reaktion DNA und mRNA gleichermaßen zu vermehren. Weitere Voraussetzungen an die Primer sind, dass sie entsprechend identische Bereiche von DNA und mRNA amplifizieren und dass die zu untersuchende Mutation komplett in diesem Bereich enthalten sein muss.

Nachdem ein diesen Anforderungen entsprechendes Primerpaar gefunden war, wurde mit der DNA-Probe jedes Patienten 5mal eine PCR durchgeführt. Anschließend erfolgte die Fragmentanalyse der PCR-Produkte.

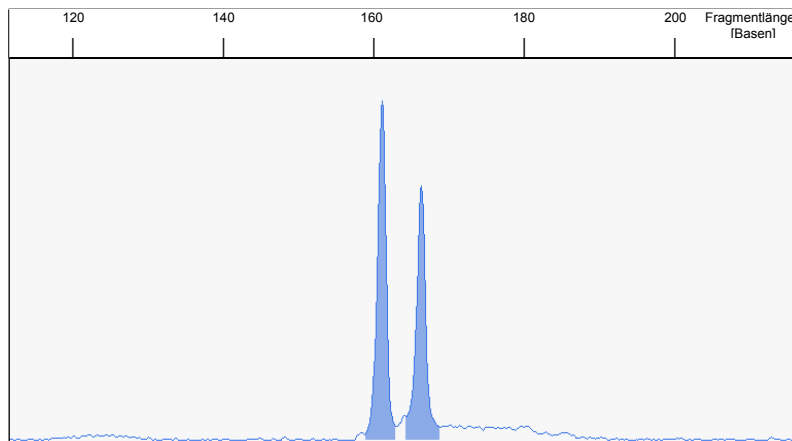


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der Fragmentanalyse der PCR-Produkte von Patient 2. Es ist deutlich zu erkennen, dass zwei Produkt-Peaks vorhanden sind, wobei der rechte dem PCR-Produkt des mutierten und der linke dem des Wildtyp-Allels entspricht. Die Fluoreszenzintegrale der Produkt-Peaks sind als blaue Fläche dargestellt. Das Fluoreszenzintegral des Wildtyp-Allels ist größer als das des mutierten.

In den DNA-Proben von allen sechs Patienten wurden zwei Fragmente verschiedener Länge nachgewiesen. Dabei entsprach jeweils das kürzere Fragment dem PCR-Produkt des normalen Allels und das längere dem PCR-Produkt des mutierten Allels. Bei den Patienten 1 und 2 war das kürzere Fragment 161 Basen lang, das längere 167, wodurch sich eine Differenz von 6 Basen ergibt. Das entspricht der bei den beiden Patienten nachgewiesenen Expansion des $(GCG)_6$ -Trakts um zwei (GCG) -Triplets (= 6 Basen). Bei den anderen Patienten wurden Fragmentlängen von 161 und 170 Basen nachgewiesen. Das entspricht den 3 Triplets (= 9 Basen) langen Einschüben dieser Patienten. Die Ergebnisse der durch die Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse des ersten Versuchsteils konnten folglich in allen 6 Fällen bestätigt werden.

Wie oben bereits erläutert, wurden anhand der Fluoreszenzintegrale der PCR-Produkt-Peaks die Menge der PCR-Produkte ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Aus diesen Werten wurden anschließend zwei Bereiche gleicher Transkription bestimmt, einen für die 6 Basenpaare lange Insertion, einen zweiten für die 9 Basenpaare umfassende Mutation (Tab. 6).

Patient Nr.	PCR1			PCR 2			PCR 3			PCR 4			PCR 5		
	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.
1	33908	23881	0,7	16620	15373	0,92	-	-	-	22296	11608	0,52	13958	10740	0,77
2	-	-	-	8775	7290	0,83	-	-	-	3812	3597	0,94	6155	3753	0,61
3	43558	19899	0,46	20445	13233	0,65	18495	16062	0,87	24528	13072	0,53	13777	8569	0,62
4	26296	19646	0,75	20526	12091	0,59	-	-	-	39997	20927	0,52	22434	13814	0,62
5	18112	11611	0,64	11850	11001	0,93	8255	5622	0,68	12981	6243	0,48	12511	10784	0,86
6	-	-	-	5737	3817	0,67	8702	6004	0,69	30186	16481	0,55	13421	8256	0,62

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der mit jeder DNA-Probe 5 mal wiederholten PCR.

normal: Fluoreszenzintegral des PCR-Produkt-Peaks des Wildtyp-Allels

mutiert: Fluoreszenzintegral des PCR-Produkt-Peaks des mutierten Allels

m./n.: [Fluoreszenzintegral des PCR-Produkt-Peaks des Wildtyp-Allels / Fluoreszenzintegral des PCR-Produkt-Peaks des mutierten Allels]

In einigen Analysen war die Basis der Peaks so breit, dass die Ergebnisse durch die Auswertungssoftware verzerrt wurden. Diese Werte wurden nicht mit zur Berechnung des Bereiches gleicher Transkription herangezogen. In der Tabelle wurden die entsprechenden Felder durch ein „-“ kenntlich gemacht.

Länge des Einschubs	Mittelwert m./n.	t 0,05	Bereich gleicher Transkription
6 Basen	0,76 (n=7)	0,41	0,25-1,17
9 Basen	0,65 (n=18)	0,36	0,29-1,01

Tabelle 6: Berechnung des Bereiches gleicher Transkription für die Mutationen gleicher Länge anhand der in Tab. 5 aufgeführten Werte.

Mittelwert m./n.: Mittelwert der Werte aus der Spalte „m./n.“ aus Tab.5, in Bezug auf die Länge der Insertion (n: Anzahl der jeweils in die Berechnung des Mittelwertes einbezogenen Quotienten)

t 0,05: Student-t-Test [Standardabweichung * 2 * $\sqrt{2}$]

Bereich gleicher Transkription: [Mittelwert +/- t 0,05]

Für die Patienten 1 und 2 (6 Basen lange Insertion) ergab sich ein Bereich gleicher Transkription von 0,25-1,17; für die Patienten 3, 4, 5 und 6 (9 Basen lange Insertion) ein Bereich von 0,29-1,01.

Zur Bestimmung der allelischen Transkriptionsverhältnisse wurde genau wie mit der DNA auch mit der mRNA eines jeden Patienten 5mal eine RT-PCR durchgeführt. Diese Reaktion war bis auf den zusätzlichen RT-Schritt identisch mit der PCR. Anschließend erfolgte wiederum eine Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte. Es zeigte sich, dass genau wie bei der PCR in allen sechs Fällen neben dem Wildtyp-Allel auch das mutierte Allel transkribiert vorlag.

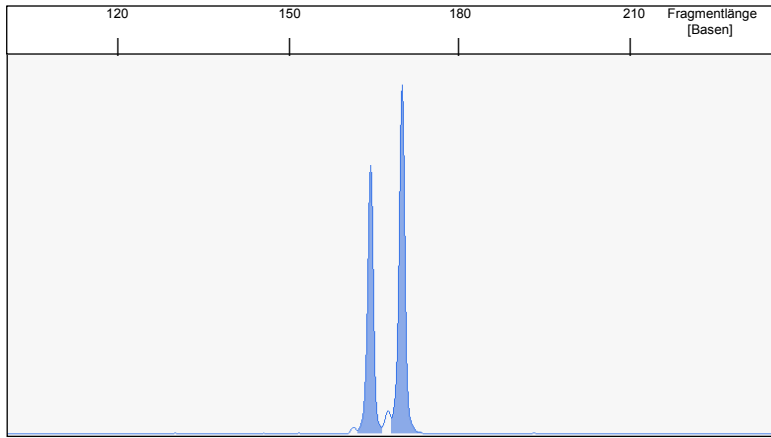


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Fragmentanalyse der RT-PCR-Produkte von Patient 2. Wie bei der Fragmentanalyse der PCR-Produkte (vgl. Abb. 4) sind auch hier zwei Produkt-Peaks zu erkennen. Jedoch ist hier das Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks der vom mutierten Allel transkribierten mRNA (rechts) größer als das Fluoreszenzintegral der vom Wildtyp-Allel transkribierten mRNA (links).

Die Länge der RT-PCR-Produkte entsprach genau der Länge der PCR-Produkte, also 161 und 167 Basen bei den Patienten 1 und 2, 161 und 170 Basen bei den übrigen Patienten. Analog zu dem Vorgehen bei den Versuchen mit der DNA wurde anhand der Fluoreszenzintegrale die Menge der RT-PCR-Produkte bestimmt (Tab. 7)

Patient Nr.	RT-PCR1			RT-PCR 2			RT-PCR 3			RT-PCR 4			RT-PCR 5		
	Normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	normal	mutiert	m./n.	Normal	mutiert	m./n.
1	1321	1579	1,2	6293	3923	0,62	7668	10870	1,42	12921	27327	2,11	4852	10512	2,17
2	4078	6555	1,61	17214	27994	1,63	26147	34683	1,33	19759	22232	1,13	8577	12830	1,5
3	2176	1541	0,71	3849	2138	0,56	5268	6303	1,2	15777	14271	0,9	5636	2165	0,38
4	519	546	1,05	1597	1605	1,01	1028	1745	1,7	5772	4354	0,75	908	1032	1,14
5	2067	2623	1,27	9955	10669	1,07	12113	12868	1,06	31516	31407	1	3876	6294	1,62
6	444	1145	2,58	4218	3430	0,81	3203	2187	0,68	13721	11174	0,81	2713	4400	1,62

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der 5mal mit jeder Patienten-mRNA durchgeführten RT-PCR.

normal: Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom Wildtyp-Allel transkribierten mRNA

mutiert: Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom mutierten Allel transkribierten mRNA

m./n.: [Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom mutierten Allel transkribierten mRNA / Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom Wildtyp-Allel transkribierten mRNA]

Für jeden Patienten wurde aus den 5 Quotienten ein Mittelwert gebildet und mit dem zuvor bestimmten Bereich gleicher Transkription verglichen. Dabei zeigte sich, dass nur ein Wert innerhalb des Bereiches gleicher Transkription lag (Patient 3), 5 der 6 Mittelwerte sich jedoch oberhalb dieses Referenzbereiches befanden (Patienten 1, 2, 4, 5 und 6).

Werte innerhalb des Bereiches gleicher Transkription entsprechen einer gleich starken Transkription des mutierten und des Wildtyp-Allels, Werte oberhalb dieses Bereichs entsprechen einer höheren Transkriptionsrate des mutierten Allels. Folglich wies nur Patient 3 eine gleich hohe Transkriptionsrate beider Allele auf. Die übrigen Patienten zeigten jedoch in den untersuchten Muskelbiopsien eine stärkere Transkription des mutierten *PABPN1*-Allels im Vergleich zum Wildtyp-Allel (Tab. 8).

Patient Nr.	Länge des Einschubs	Bereich gleicher Transkription	Mittelwerte der Quotienten aus Tab. 7	Vergleich Transkription mutiertes Allel - normales Allel
1	6 Basen	0,25-1,17	1,50	mutiertes Allel > normales Allel
2	6 Basen	0,25-1,17	1,44	mutiertes Allel > normales Allel
3	9 Basen	0,29-1,01	0,71	mutiertes Allel = normales Allel
4	9 Basen	0,29-1,01	1,13	mutiertes Allel > normales Allel
5	9 Basen	0,29-1,01	1,20	mutiertes Allel > normales Allel
6	9 Basen	0,29-1,01	1,30	mutiertes Allel > normales Allel

Tabelle 8: Zusammenstellung der Ergebnisse des 2. Versuchsteils. Da die Mittelwerte der Quotienten aus Tab. 7 der Patienten 1, 2, 4, 5 und 6 über dem jeweiligen Bereich gleicher Transkription liegen, bedeutet dies, dass das mutierte Allel in diesen Fällen stärker transkribiert wurde als das normale. Lediglich bei Patient Nr. 3 liegt der Mittelwert innerhalb des Referenzbereiches, was einer gleich starken Transkription beider Allele entspricht.

Diskussion

Das Thema der vorliegenden Dissertation sind molekulargenetische Untersuchungen zur Okulopharyngealen Muskeldystrophie. In diesem Rahmen wurde die aus Muskelbiopsien von 6 Patienten isolierte DNA und RNA untersucht und in allen Fällen eine für die OPMD typische Mutation im *PABPNI*-Gen entdeckt. Der Fund einer bisher noch nicht beschriebenen Mutation des *PABPNI*-Gens in der DNA eines Patienten gibt Anlass zur Diskussion des molekularen Mechanismus, der der Mutation des *PABPNI*-Gens zu Grunde liegt. Auch eine Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp scheint durchaus von Interesse, auch wenn die Anzahl der untersuchten Fälle zu gering ist, um repräsentative Aussagen machen zu können. Des Weiteren lässt sich im Zusammenhang mit den Resultaten der Untersuchung der mRNA eine Verbindung zwischen ungleicher Transkription von mutiertem und nicht mutiertem *PABPNI*-Allel auf der einen und dem klinischen Erscheinungsbild der Krankheit auf der anderen Seite diskutieren.

Der Mechanismus der (GCG)-Triplet Expansion bei der OPMD

Die typische der OPMD zu Grunde liegende Mutation ist die Expansion eines (GCG)₆-Traktes im *PABPNI*-Gen auf eine Länge von (GCG)₈₋₁₃ [20]. Neben dieser „klassischen“ Mutation wurden jedoch in den letzten Jahren bei einigen Patienten auch andere Mutationen gefunden. So entdeckte man bei Patienten aus Louisiana (USA) eine (GCG)₆(GCA)(GCG)₂-Basensequenz [79]. In Japan fand man zwei weitere Mutationen, nämlich (GCG)₆(GCA)(GCG)₃ und (GCG)₆(GCA)₃(GCG)₂. Bei einer Untersuchung von holländischen OPMD-Patienten stieß man bei 2 Personen auf eine (GCG)₆(GCA)₂(GCG)₂ Mutation [90]. All diese Variationen haben eine Gemeinsamkeit, es handelt sich nämlich nicht um eine reine Expansion des (GCG)-Traktes, es kommt zusätzlich zum Einschub von einem oder mehreren (GCA)-Triplets.

Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Mutation entdeckt, die Ähnlichkeit mit den oben beschriebenen besitzt. Neben der unmutierten (GCG)₆-Basenfolge

fand sich bei Patient 5 folgende Sequenz: (GCG)₆(GCA)₂(GCG). Genau wie in den oben aufgeführten Fällen kam es hier also auch zur Insertion von (GCG)- und (GCA)-Triplets.

Da das (GCA)-Triplet genau wie das (GCG)-Triplet Alanin codiert, ist phänotypisch kein Unterschied zwischen den „klassischen“ und den hier beschriebenen ungewöhnlichen Mutationen zu erwarten. Diese Annahme wird durch die Untersuchungsergebnisse der Träger dieser Mutationen bestätigt. So wiesen sowohl die Patienten aus Louisiana, Holland und Japan wie auch Patient 5 der hier vorliegenden Untersuchungsreihe einen für die OPMD typischen Krankheitsverlauf auf [68, 90, 79].

Momentan werden in der Literatur zwei mechanistische Modelle diskutiert, welche die Expansion des (GCG)-Traktes als Ursache der OPMD bewirken könnten [19]. Der erste Mechanismus ist das sog. „polymerase slippage“-Modell, der zweite ist der sog. „unequal crossing over“-Mechanismus.

Die Expansion einer Tripletsequenz stellt die genetische Grundlage einer Gruppe neuromuskulärer und neurodegenerativer Erbkrankheiten dar (Tab. 9) [98]. Obwohl letztlich noch nicht nachgewiesen werden konnte, durch welchen Mechanismus diese Mutationen hervorgerufen werden, schenkt man in diesem Zusammenhang dem „polymerase slippage“-Mechanismus die meiste Aufmerksamkeit [99]. Die Expansion der Tripletsequenz wird dabei durch die Ausbildung einer Haarnadel-Struktur auf dem neu synthetisierten Strang während der DNA-Replikation erklärt [49].

Krankheit	Erbmodus	Triplet	Triplet-Wiederholungen	
			Normal	mutiert
Dentatorubropallidolysische Atrophie	AD	CAG	6-35	51-88
Kennedy-Syndrom	XR	CAG	11-33	38-66
Chorea Huntington	AD	CAG	6-39	36-121
Spinozerebellare Ataxie Typ 1	AD	CAG	6-39	41-81
Spinozerebellare Ataxie Typ 2	AD	CAG	14-31	35-64
Spinozerebellare Ataxie Typ 3	AD	CAG	12-41	40-84

Tabelle 9: Beispielhafte Darstellung einiger durch Expansion von Triplet Sequenzen hervorgerufener Erbkrankheiten [99].

AD: autosomal dominant; XR: x-chromosomal rezessiv

In Tabelle 9 sind beispielhaft einige der neurodegenerativen Erkrankungen aufgeführt, die als genetische Grundlage die Verlängerung einer Triplet Sequenz haben. Vergleicht man diese Krankheiten mit der OPMD, die ja klassischerweise auch durch die Expansion einer einheitlichen Tripletfolge hervorgerufen wird, kann man einige Gemeinsamkeiten feststellen.

So werden die meisten der in der Tabelle erwähnten Krankheiten wie die OPMD autosomal dominant vererbt. Des Weiteren liegen die Mutationen der OPMD und der oben aufgelisteten Krankheiten im Bereich von Exonen, werden also im entsprechenden Protein exprimiert [99]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten könnte man annehmen, dass die OPMD auf einen ähnlichen Mutationsmechanismus zurückzuführen ist. Es gibt jedoch auch einige Gründe, die dies unwahrscheinlich erscheinen lassen. So ist die Länge der Triplet-Wiederholungen der in Tabelle 9 erwähnten Krankheiten sowohl im mutierten als auch im unmutierten Zustand länger als die der (GCG)-Sequenz des *PABPNI*-Gens. Es wird angenommen, dass für die Verlängerung einer repetitiven Tripletsequenz durch den „polymerase slippage“-Mechanismus eine Mindestlänge von 25 bis 35 Triplets nötig ist [58]. Die längste in der Literatur beschriebene (GCG)-Tripletfolge im *PABPNI*-Gen hat jedoch nur eine Länge von 13 Wiederholungen, ist also 12 Triplets zu kurz. Eine weitere Eigenschaft der Mutationen der oben aufgelisteten Erbkrankheiten ist ihre Instabilität [46]. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die OPMD dadurch aus, dass sie meiotisch stabil ist. Die in Tabelle 9 beschriebenen verlängerten Tripletsequenzen bestehen alle aus reinen Wiederholungen eines Basen-Triplets. Sowohl die bei Patienten aus Holland, Japan und Louisiana entdeckten Mutationen wie auch die im Rahmen dieser Dissertation gefundene Insertion weisen aber neben der Verlängerung des (GCG)₆-Traktes den Einschub von (GCA)-Triplets auf. Diese Heterogenität und die Kürze des (GCG)-Traktes lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass die Mutation der OPMD durch das „polymerase slippage“-Modell verursacht wird [68].

Der zweite Mechanismus, durch den die Mutation der OPMD entstehen könnte, ist das „unequal crossing over“-Modell. Dieser basiert auf dem Austausch ungleich großer DNA-Abschnitte zwischen zwei homologen Chromosomen, wenn diese sich während der Meiose einander anlagern [49].

Die Expansion des (GCG)₆-Traktes zu (GCG)₈₋₁₂ lässt sich durch „unequal crossing over“ recht einfach erklären. Diese Mutationen können durch den Austausch von ungleichen DNA-Abschnitten entstehen, wobei ein Allel 4-6 (GCG)-Triplets der (GCG)₆-Sequenz des anderen Allels erhält. Neben der (GCG)₆-Sequenz zu Beginn des *PABPNI*-Gens gibt es auch einen (GCG)₇-Polymorphismus [20]. Mit diesem lässt sich auch die (GCG)₁₃-Mutation durch das „unequal crossing over“-Modell erklären. Genau wie diese „klassischen“ OPMD-Mutationen können auch die Mutationen, die bei Patienten aus Holland, Japan und Louisiana entdeckt wurden, aus dem Austausch ungleicher DNA-Abschnitte zwischen zwei homologen Chromosomen hervorgegangen sein [68, 90]. Auch die (GCG)₆(GCA)₂(GCG)-Sequenz, die bei Patient 5 der vorliegenden Dissertation gefunden wurde, kann durch „unequal crossing over“ entstanden sein (Abb. 6).

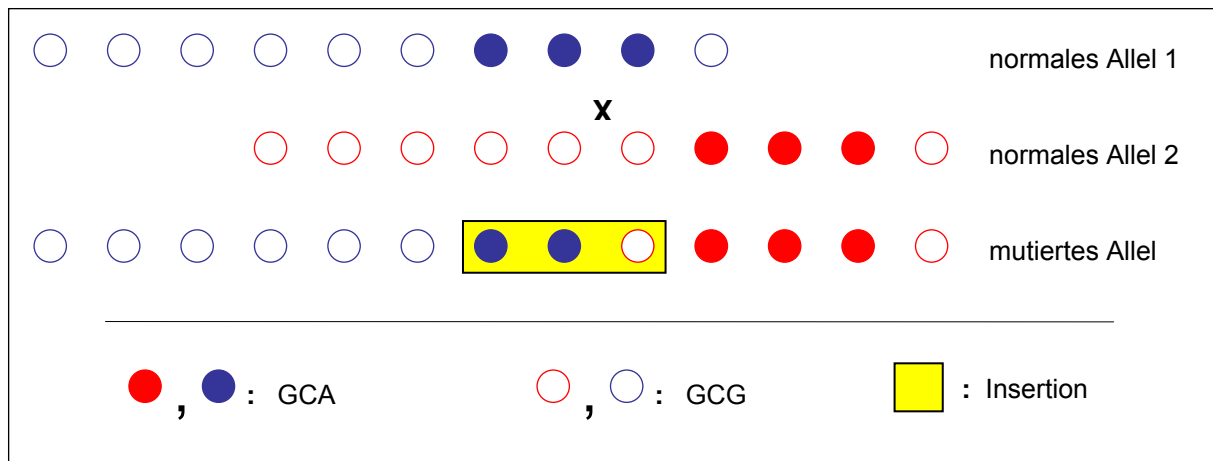


Abbildung 6: Schematische Darstellung, wie durch den „unequal crossing over“-Mechanismus die Entstehung der $(GCG)_6(GCA)_2(GCG)$ Sequenz erklärt werden kann. Dabei markiert das „X“ die Stelle, an der es zum Austausch zwischen den beiden Allelen kommt. Die Farben Rot und Blau sollen verdeutlichen, von welchem Allel das jeweilige Triplet stammt.

Die Polysyndaktylie (PSD) ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit. Als der dieser Krankheit zugrunde liegende Mutationsmechanismus wird das „unequal crossing over“-Modell vermutet [97]. Bei der PSD kommt es aufgrund einer Mutation des auf Chromosom 2 in Abschnitt 2q31 liegenden *HOXD13*-Gens wie bei der OPMD zu einer Verlängerung einer Polyalaninsequenz im entsprechenden Protein [78]. Wird bei der OPMD ein 10stelliger Polyalaninabschnitt auf eine Länge von 12 bis 17 ausgedehnt, so kommt es bei der PSD zu einer Verlängerung von normalerweise 15 auf 22 bis 29 Stellen [67, 4]. Wie beim PABPN1, dessen Polyalaninsequenz durch eine $(GCG)_6(GCA)_3(GCG)$ -Abfolge codiert wird, wird auch der bei der PSD expandierte Polyalanintrakt durch eine inhomogene Tripletsequenz kodiert. Die Mutation der PSD besteht ebenfalls aus einer inhomogenen Tripletinsertion. Zwar sind die „klassischen“ Mutationen der OPMD homogene Expansionen des $(GCG)_6$ -Traktes, jedoch zeigen sich auch hier, wie bereits beschrieben, vereinzelt inhomogene Einschübe, die neben (GCG) auch (GCA) enthalten. Hinzu kommt, dass die Mutation der PSD genau wie die der OPMD meiotisch stabil ist. Somit haben die Mutationen der OPMD und der PSD einige wichtige Gemeinsamkeiten, wie die Inhomogenität und die relativ kurze Ausdehnung der expandierten Kodonsequenz und die Stabilität der Mutation. In diesen drei wesentlichen Punkten unterscheiden sich beide Krankheiten also von den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen, die auf einen „polymerase slippage“-Mechanismus zurückgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Mutation der OPMD mit größerer Wahrscheinlichkeit auf das „unequal crossing over“-Modell als auf den „polymerase slippage“-Mechanismus zurückzuführen ist.

Korrelation Genotyp - Phänotyp

Die OPMD ist eine Krankheit mit großen Variationen im interindividuellen Erscheinungsbild. Dies wird deutlich beim Vergleich der klinischen Daten der im Rahmen dieser Dissertation molekularbiologisch untersuchten Patienten.

Patient Nr.	Insertion	Beginn d. Symptome	Erstes Symptom	Klinische Symptome		
				Ptosis	Dysphagie	Muskelschwäche
1	(GCG) ₂	60 Lj.	Ptosis	+	+	+
2	(GCG) ₂	86 Lj.	Dysphagie	+	+	+
3	(GCG) ₃	53 Lj.	Muskelschmerzen	+	+	+
4	(GCG) ₃	56 Lj.	Ptosis	+	-	+
5	(GCA) ₂ (GCG)	59 Lj.	Ptosis	+	+	-
6	(GCG) ₃	67 Lj.	Ptosis	+	+	-

Tabelle 10: Gegenüberstellung einiger klinischer Daten mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse der 6 molekularbiologisch untersuchten Patienten. Die Spalte „Klinische Symptome“ bezieht sich auf die zum Zeitpunkt des Klinikaufenthaltes des jeweiligen Patienten vorhandenen Hauptsymptome. +: Symptom vorhanden; -: Symptom nicht vorhanden.

Die Patienten unterscheiden sich zum Teil erheblich in Bezug auf den Zeitpunkt des Auftretens und die Art der ersten Beschwerden durch die Krankheit. Traten bei Patient 3 die ersten Symptome bereits im Alter von 53 Jahren auf, so bemerkte Patient 2 sie erst im Alter von 86. Bei den Patienten 1, 4, 5 und 6 war die Ptosis das erste Symptom, bei Patient 2 machte sich als erstes eine Dysphagie bemerkbar. Patient 3 klagte zunächst über Muskelschmerzen, ein eher ungewöhnliches Symptom, welches jedoch bereits im Zusammenhang mit der OPMD beschrieben wurde [59]. Weiterhin waren auch die während des Klinikaufenthalts vorliegenden Symptome unterschiedlich. Klagten alle Patienten über eine Ptosis, so hatten jedoch nur fünf Schluckbeschwerden und nur vier eine Schwäche der Muskulatur.

Die Interpretation dieser klinischen Daten in Bezug auf einen Zusammenhang zwischen der Länge des Einschubs und dem Krankheitsbild ist zweideutig. Auf der einen Seite zeichnet sich durchaus ein Trend zu einem früheren Auftreten der ersten Krankheitsanzeichen in Verbindung mit einem längeren Einschub ab. So waren die vier Patienten mit der 9-Basen-

Insertion zum Zeitpunkt der Untersuchungen jünger (56 bis 70 Jahre) als die zwei anderen mit der 6-Basen-Insertion (72 bis 87 Jahre). Demgegenüber steht die Tatsache, dass beide Patienten mit dem Einschub von zwei Triplets alle drei Hauptsymptome der Krankheit aufweisen. Hingegen konnte man nur bei einem der vier Patienten, deren Mutation aus drei zusätzlichen Triplets besteht, alle drei Hauptsymptome feststellen. Eine spätere Manifestation der „fehlenden“ Symptome ist jedoch nicht auszuschließen.

Zwar ist aufgrund der geringen Größe des Patientenkollektivs kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp festzustellen, jedoch lassen die Erkenntnisse aus Untersuchungen anderer hereditärer Krankheiten, die genetisch Ähnlichkeiten mit der OPMD aufweisen, auch im Zusammenhang mit den hier erhaltenen Befunden eine Korrelation vermuten. Als Beispiele sollen die zuvor bereits erwähnten neurodegenerativen und neuromuskulären Erbkrankheiten sowie der Polysyndaktylie (PSD) dienen. So findet man bei der Gruppe der neurodegenerativen und neuromuskulären Krankheiten in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen längeren Expansionen und einem früherem Manifestationsalter sowie einem schwererem Verlauf der jeweiligen Krankheit [51]. Auch bei der genetisch sehr ähnlichen PSD ist mit zunehmender Länge der Expansion ein schwererer Phänotyp und eine höhere Penetranz verbunden [46].

Untersuchungen der OPMD ergaben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Vorliegens einer Genotyp-Phänotyp Korrelation. So konnte zum Beispiel in einer Studie mit 31 britischen Patienten ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp festgestellt werden. Dabei waren längere Expansionen mit einem früheren Anfangsalter und einem schwereren klinischen Krankheitsbild verbunden [48]. In einer Studie mit 15 spanischen OPMD-Patienten stellte man ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der zusätzlichen Triplets und der Ausprägung der Symptome fest. Allerdings kam man in dieser Untersuchungsreihe zu dem Ergebnis, dass die (GCG)₉ Mutation ein schwereres Krankheitsbild zur Folge hat als noch längere Einschübe [73]. Dagegen konnten andere Autoren wiederum gar keinen Zusammenhang zwischen der Länge der Expansion und dem klinischen Bild der Krankheit feststellen [19].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche Phänotyp-Genotyp Korrelation keine eindeutigen Schlüsse zulassen. Zwar ist eine Tendenz zu einem früheren Beginn der Krankheit in Verbindung mit einer längeren Insertion vorhanden, gleichzeitig weisen jedoch die Patienten mit kürzerem Einschub eine ausgeprägtere Symptomatik der Krankheit auf.

Einfluss allelischer Transkription auf das klinische Krankheitsbild

Unabhängig von der Frage, ob eine Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp der OPMD besteht, ist auffällig, dass auch zwischen Trägern identischer Mutationen erhebliche Unterschiede in Bezug auf das klinische Erscheinungsbild der Krankheit existieren. So liegen beispielsweise bei Patienten, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation molekularbiologisch untersucht wurden, trotz des gleichen Genotyps erhebliche Schwankungen in Bezug auf das Lebensalter während der Manifestation der ersten Krankheitssymptome vor. So sind die Patienten 1 und 2 zwar beide Träger der (GCG)₈-Mutation, dennoch machten sich bei Patient 1 die ersten Anzeichen der Krankheit 26 Jahre früher bemerkbar. Bei den Patienten 3 und 6 ist der Abstand nicht ganz so groß, es liegt aber trotz gleicher Mutation [(GCG)₉] immerhin ein Altersunterschied von 14 Jahren vor.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen wäre beispielsweise - neben anderen bis jetzt unbestimmten epigenetischen Faktoren - eine ungleich starke Expression von mutiertem und nicht mutiertem *PABPN1*-Allel. Interessanterweise konnte in fünf der sechs untersuchten Fälle eine signifikant größere Menge mutierter mRNA als nicht mutierter mRNA nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen der Transkription von mutiertem und Wildtyp-Allel und dem Manifestationsalter des jeweiligen Patienten war zwar nicht festzustellen, dies kann jedoch unter anderem mit der Größe des Patientenkollektivs in Zusammenhang stehen. Des Weiteren gilt es zu berücksichtigen, dass für die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen von jedem Patienten jeweils nur eine Muskelbiopsie zur Verfügung stand, um daraus DNA und mRNA zu isolieren. Somit können lediglich Aussagen über die Expression von gesundem und mutiertem Allel in dem jeweiligen Muskel gemacht werden. Nur bei zwei Patienten (Nr. 3 und 4) wurde Material von dem Muskel entnommen, der als erster von den jeweiligen Krankheitssymptomen betroffen war. Jedoch ist auch bei diesen beiden Patienten kein Zusammenhang zwischen der Transkriptionsrate und dem Manifestationsalter ersichtlich. Bei vier Patienten wurde die Muskelbiopsie am M. deltoideus durchgeführt, bei jeweils einem am M. orbicularis oculi und am M. gluteus maximus. Vergleicht man die Relation zwischen der Transkription von mutiertem zu nicht mutiertem Allel mit der Schwere der Muskelschwäche des Muskels, aus dem die Biopsie entnommen wurde, so lässt sich eine Tendenz erkennen.

Patient Nr.	Muskel	MW	Symptom der entsprechenden Muskeln [#]
1	M. deltoideus	1,5	manifeste Paresen der Arme / M. deltoideus KG 4 / 6
2	M. deltoideus	1,44	proximale Schulter und Armparesen / KG 4+ / 5
6	M. deltoideus	1,3	diskrete Parese der Armabduktion / KG 4+ / 5
5	M. deltoideus	1,2	keine Paresen
4	M. orbicularis oculi	1,13	mäßige Ptosis
3	M. gluteus max.	0,71	proximal betonte Parese der Beine; Aufstehen aus der Hocke nur mit Hilfe möglich

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Transkriptionsrate der beiden Allele mit den Symptomen der Muskeln, aus deren Biopsie die mRNA isoliert wurde.

Muskel: Muskel, aus dem die Biopsie entnommen wurde

MW: Mittelwert des Quotienten [Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom mutierten Allel transkribierten mRNA / Fluoreszenzintegral des RT-PCR-Produkt-Peaks von der vom Wildtyp-Allel transkribierten mRNA] der jeweils 5 Fragmentanalysen (vgl. Tab. 8). Höhere Werte entsprechen einer stärkeren Transkription des mutierten Allels

[#]: Symptome, die durch die Beteiligung des Muskels, aus dem die Muskelbiopsie entnommen wurde, an den pathologischen Vorgängen im Rahmen der OPMD hervorgerufen werden. KG ist die Abkürzung von Kraft-Grad. Niedrigere Werte entsprechen einer stärkeren Parese. Bei Patient Nr. 1 bezieht sich der Wert ausschließlich auf den M. deltoideus, bei den Patienten 2 und 6 auf die Muskelgruppe bzw. -funktion.

Bei vier Patienten wurde die Gewebeprobe, aus der die mRNA isoliert wurde, aus dem M. deltoideus entnommen. Bei diesen Patienten steht eine stärker ausgeprägte Parese der Arme in Korrelation zu einer im Vergleich zur Transkription des normalen Allels stärkeren Transkription des mutierten Allels. Es scheint also, als hätte die Transkriptionsrate einen Einfluss auf den Schweregrad der Symptome im jeweiligen Muskel.

Eine Erklärung für diesen möglichen Zusammenhang liefert eine Betrachtung des Grundmechanismus der Genexpression. Zunächst wird dabei die DNA in mRNA umgeschrieben, diese wird dann in die entsprechende Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt. Folglich würde eine verstärkte Transkription des mutierten Allels zu einer höheren Menge an entsprechender mRNA führen, aus der wiederum eine größere Menge von verändertem Protein entstehen könnte. Auch wenn noch nicht klar ist, wie genau der pathogenetische Mechanismus der OPMD aussieht, so bestehen doch kaum Zweifel, dass er in Zusammenhang mit verlängerten Polyalaninsequenzen im PABPN1 steht. Würde also durch eine verstärkte Transkription des mutierten Allels letztendlich auch mehr verändertes PABPN1 entstehen, könnte somit ein verstärkter Ablauf des Pathomechanismus erklärt werden.

Diese Theorie wird durch die folgende, in einer anderen Arbeitsgruppe erhaltene Beobachtung bekräftigt: In einem Zellexperiment wurden COS-7 Zellen mit verschiedenen Mengen des mutierten *PABPN1*-Gens transfiziert. Eine größere Menge von DNA mit dem mutierten Gen führt auch zu einer größeren Menge an entsprechender mRNA. Es zeigte sich, dass, abgesehen von einer Ausnahme, eine höhere Menge an DNA zu einem früheren Zelltod und einer größeren Anzahl von intranukleären Einschlüssen führte [7].

In der Literatur liegen keine Berichte über den Einfluss einer unterschiedlich großen Transkriptionsrate von mutiertem und nicht mutiertem Allel auf die OPMD oder vergleichbare Erbkrankheiten vor. Es existieren zwar Informationen über ein allelisches Ungleichgewicht bei der Genexpression im Zusammenhang mit kanzerösen Erkrankungen, jedoch ist der pathogenetische Mechanismus nicht vergleichbar mit dem der OPMD [3].

Die Tatsache, dass in den Muskelbiopsien von fünf der sechs untersuchten Patienten eine stärkere Transkription des mutierten Allels als des Wildtyp-Allels nachgewiesen werden konnte, führt zu der Vermutung, dass das *PABPN1*-Gen generell unterschiedlich stark allelisch transkribiert wird und dass diese Transkription Einfluss auf die Pathogenese der OPMD hat. Dass in der hier vorliegenden Untersuchung eine Tendenz zu einer stärkeren Muskelschwäche bei höherer Transkriptionsrate des mutierten Allels beobachtet werden konnte, untermauert diese Vermutung.

Aufgrund der geringen Größe des Patientenkollektivs kann die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Versuchsreihe nur einen Hinweis auf mögliche Zusammenhänge zwischen allelischer Transkription und klinischem Bild der OPMD geben. Durch Studien mit größeren Patientenkollektiven könnte es möglich sein, diesen Zusammenhang für die OPMD – aber auch für andere, vergleichbare Krankheiten - zu bestätigen.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 6 Patienten molekulargenetisch untersucht, bei denen aufgrund der klinischen Symptome und der elektronenmikroskopischen Befunde eine OPMD diagnostiziert worden war.

In allen 6 Fällen konnte eine die OPMD verursachende Mutation zu Beginn des *PABPN1*-Gens nachgewiesen werden. Besonders zu betonen ist, dass eine der gefundenen Mutationen von dem klassischen Muster der für die Krankheit charakteristischen Mutationen abweicht. Anstelle der sonst üblichen Expansion einer (GCG)₆-Sequenz zu (GCG)₈₋₁₃ wurde bei Patient Nr. 5 nach dieser (GCG)₆-Sequenz eine (GCA)₂(GCG)-Insertion identifiziert. Eine derartige Mutation wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Aus dieser Struktur lassen sich Rückschlüsse auf den Entstehungsmechanismus der Mutation der OPMD ziehen. Diese Veränderung spricht eher für den „unequal crossing over“-Mechanismus als für das „polymerase slippage“-Modell.

Durch die Untersuchung der mRNA konnte nachgewiesen werden, dass in den Muskeln, aus deren Biopsiematerial die mRNA isoliert wurde, sowohl das mutierte wie auch das nicht mutierte *PABPN1*-Allel transkribiert wurden. Beim Vergleich des Verhältnisses der Transkriptionsraten von mutiertem zu Wildtyp-Allel mit der Muskelschwäche der Muskelgruppe, aus der die mRNA isoliert wurde, ergab sich tendenziell eine Korrelation: Eine höhere Transkriptionsrate des mutierten Allels stand in Zusammenhang mit einer stärkeren Muskelschwäche der jeweiligen Muskulatur.

Die aus den durchgeführten Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse könnten durchaus einen weiteren Schritt auf dem Weg zur Klärung der noch offenen Fragen im Zusammenhang mit der Pathogenese der OPMD bedeuten. Zum einen lassen sie Schlüsse zu auf den Entstehungsmechanismus der Mutation, welche der OPMD zu Grunde liegt, zum anderen weisen sie darauf hin, dass eine unterschiedlich starke allelische Transkription der *PABPN1*-Allele einen Einfluss auf das klinische Bild der Krankheit hat.

Literatur

1. Abu-Baker A, Messaed C, Laganriere J, Gaspar C, Brais B, Rouleau GA: Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 12:2609-2623 (2003).
2. Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN: The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 273:13015-13021 (1998).
3. Aihara T, Noguchi S, Miyoshi Y, Nakano H, Sasaki Y, Nakamura Y, Monden M, Imaoka S: Allelic imbalance of insulin-like growth factor II gene expression in cancerous and precancerous lesions of the liver. *Hepatology* 28:86-89 (1998).
4. Akarsu AN, Stoilov I, Yilmaz E, Sayli BS, Sarfarazi M: Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families. *Hum Mol Genet* 5:945-952 (1996).
5. Amyot R: Hereditary, familial and acquired ptosis of late onset. *Can Med Assoc J* 59:434-438 (1948).
6. Arenas J, Huertas RA, Campos Y, Cabello A, Gutierrez E, Bautista J, Segura D: Oculopharyngeal muscular dystrophy and mitochondrial abnormalities. *Muscle Nerve* 15:1055-1056 (1992).
7. Bao YP, Cook LJ, O'Donovan D, Uyama E, Rubinsztein DC: Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Biol Chem* 277:12263-12269 (2002).
8. Becher MW, Kotzuk JA, Davis LE, Bear DG: Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2. *Ann Neurol* 48:812-815 (2000).
9. Becher MW, Morrison L, Davis LE, Maki WC, King MK, Bicknell JM, Reinert BL, Bartolo C, Bear DG: Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans. *Jama* 286:2437-2440 (2001).
10. Bienroth S, Keller W, Wahle E: Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *Embo J* 12:585-594 (1993).
11. Blumbergs PC, Chin D, Burrow D, Burns RJ, Rice JP: Oculopharyngeal dystrophy: clinicopathological study of an Australian family. *Clin Exp Neurol* 19:102-109 (1983).

12. Blumen SC, Brais B, Korczyn AD, Medinsky S, Chapman J, Asherov A, Nisipeanu P, Codere F, Bouchard JP, Fardeau M, Tomé FM, Rouleau GA: Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann Neurol* 46:115-118 (1999).
13. Blumen SC, Nisipeanu P, Sadeh M, Asherov A, Tomé FM, Korczyn AD: Clinical features of oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neuromuscul Disord* 3:575-577 (1993).
14. Blumen SC, Sadeh M, Korczyn AD, Rouche A, Nisipeanu P, Asherov A, Tomé FM: Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neurology* 46:1324-1328 (1996).
15. Bouchard JP: Andre Barbeau and the oculopharyngeal muscular dystrophy in French Canada and North America. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S5-11 (1997).
16. Bouchard JP: Report on the first international symposium on oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S2-4 (1997).
17. Bouchard JP, Brais B, Brunet D, Gould PV, Rouleau GA: Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S22-29 (1997).
18. Bouchard JP, Marcoux S, Gosselin F, et al.: A simple test for the detection of the dysphagia in members of families with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). *Can J Neurol Sci* 19:296-297 (1992).
19. Brais B: Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res* 100:252-260 (2003).
20. Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tomé FM, Lafreniere RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn AD, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codere F, Fardeau M, Rouleau GA, Korczyn AD: Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18:164-167 (1998).
21. Brais B, Rouleau GA, Bouchard JP, Fardeau M, Tomé FM: Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Semin Neurol* 19:59-66 (1999).
22. Brais B, Xie YG, Sanson M, Morgan K, Weissenbach J, Korczyn AD, Blumen SC, Fardeau M, Tomé FM, Bouchard JP, et al.: The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. *Hum Mol Genet* 4:429-434 (1995).
23. Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RC, Muenke M: Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of *Drosophila* odd-paired. *Nat Genet* 20:180-183 (1998).

24. Brunet G, Tomé FM, Eymard B, Robert JM, Fardeau M: Genealogical study of oculopharyngeal muscular dystrophy in France. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S34-37 (1997).
25. Calado A, Kutay U, Kuhn U, Wahle E, Carmo-Fonseca M: Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *Rna* 6:245-256 (2000).
26. Calado A, Tomé FM, Brais B, Rouleau GA, Kuhn U, Wahle E, Carmo-Fonseca M: Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet* 9:2321-2328 (2000).
27. Canzian F, Salovaara R, Hemminki A, Kristo P, Chadwick RB, Aaltonen LA, de la Chapelle A: Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res* 56:3331-3337 (1996).
28. Chen Z, Li Y, Krug RM: Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* 18:2273-2283 (1999).
29. Codere F, Brais B, Rouleau G, Lafontaine E: Oculopharyngeal muscular dystrophy: What's new? *Orbit* 20:259-266 (2001).
30. Colgan DF, Manley JL: Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11:2755-2766 (1997).
31. Coquet M, Vital C, Julien J: Presence of inclusion body myositis-like filaments in oculopharyngeal muscular dystrophy. Ultrastructural study of 10 cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16:393-400 (1990).
32. Dahl R, Wani B, Hayman MJ: The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene* 16:1579-1586 (1998).
33. de Seze J, Pasquier F, Ruchoux MM, Hurtevent JF, Petit H: [Mitochondrial anomalies in oculopharyngeal muscular dystrophy]. *Rev Neurol (Paris)* 153:335-338 (1997).
34. Duranceau A: Cricopharyngeal myotomy in the management of neurogenic and muscular dysphagia. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S85-89 (1997).
35. Duranceau A, Forand MD, Fauteux JP: Surgery in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Am J Surg* 139:33-39 (1980).
36. Duranceau AC, Jamieson GG, Beauchamp G: The technique of cricopharyngeal myotomy. *Surg Clin North Am* 63:833-839 (1983).
37. Dutil A: Note sur une forme de ptosis noncongénital et héréditaire. *Prog Med* 16:401-403 (1892).

38. Fan X, Dion P, Laganier J, Brais B, Rouleau GA: Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum Mol Genet* 10:2341-2351 (2001).
39. Fan X, Rouleau GA: Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* 30:8-14 (2003).
40. Fradet G, Pouliot D, Robichaud R, St-Pierre S, Bouchard JP: Upper esophageal sphincter myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy: long-term clinical results. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S90-95 (1997).
41. Fuchs E: Über isolierte doppelseitige Ptosis. *Arch Ophthalmol* 36:234-259 (1890).
42. Gambelli S, Malandrini A, Ginanneschi F, Berti G, Cardaioli E, De Stefano R, Franci M, Salvadori C, Mari F, Bruttini M, Rossi A, Federico A, Renieri A: Mitochondrial abnormalities in genetically assessed oculopharyngeal muscular dystrophy. *Eur Neurol* 51:144-147 (2004).
43. Gervais M, Dorion D: Quality of life following surgical treatment of oculopharyngeal syndrome. *J Otolaryngol* 32:1-5 (2003).
44. Goh KJ, Wong KT, Nishino I, Minami N, Nonaka I: Oculopharyngeal muscular dystrophy with PABPN1 mutation in a Chinese Malaysian woman. *Neuromuscul Disord* 15:262-264 (2005).
45. Goodman FR, Bacchelli C, Brady AF, Brueton LA, Fryns JP, Mortlock DP, Innis JW, Holmes LB, Donnemfeld AE, Feingold M, Beemer FA, Hennekam RC, Scambler PJ: Novel HOXA13 mutations and the phenotypic spectrum of hand-foot-genital syndrome. *Am J Hum Genet* 67:197-202 (2000).
46. Goodman FR, Mundlos S, Muragaki Y, Donnai D, Giovannucci-Uzielli ML, Lapi E, Majewski F, McGaughan J, McKeown C, Reardon W, Upton J, Winter RM, Olsen BR, Scambler PJ: Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7458-7463 (1997).
47. Hietaharju A, Juvonen V, Farkkila M, Haapasalo H, Rantala I, Himanen SL, Kuusisto H, Sorri A, Udd B: [Cases of oculopharyngeal muscular dystrophy even in Finland]. *Duodecim* 119:625-628 (2003).
48. Hill ME, Creed GA, McMullan TF, Tyers AG, Hilton-Jones D, Robinson DO, Hammans SR: Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* 124:522-526 (2001).
49. Jinks-Robertson S, Greene C, Chen W: Genetic instabilities in yeast. In: Wells RD, Warren ST (eds) *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. San Diego, p 485-507 (1998).

50. Kahl-Nieke B: Dysostosen, Syndrome und Fehlentwicklungen. In: Einführung in die Kieferorthopädie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, p 98-110 (2001).
51. Kakizuka A: Degenerative ataxias: genetics, pathogenesis and animal models. *Curr Opin Neurol* 10:285-290 (1997).
52. Kang DH, Koo SH, Ahn DS, Park SH, Yoon ES: Correction of blepharoptosis in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Ann Plast Surg* 49:419-423 (2002).
53. Keller RW, Kuhn U, Aragon M, Bornikova L, Wahle E, Bear DG: The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol* 297:569-583 (2000).
54. Keller W: No end yet to messenger RNA 3' processing! *Cell* 81:829-832 (1995).
55. Kim YJ, Noguchi S, Hayashi YK, Tsukahara T, Shimizu T, Arahata K: The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum Mol Genet* 10:1129-1139 (2001).
56. Klostermann W, Wessel K, Reusche E, Kessler C, Kompf D: [Oculopharyngeal muscular dystrophy. Clinical, electromyography and muscle biopsy findings in 2 cases]. *Nervenarzt* 61:351-355 (1990).
57. Krause S, Fakan S, Weis K, Wahle E: Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp Cell Res* 214:75-82 (1994).
58. Kunst CB, Warren ST: Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 77:853-861 (1994).
59. Lampe JB, Schafer J, Gartner HJ, Reichmann H: [Proximal weakness and exercise-induced pain as initial symptom of oculopharyngeal muscular dystrophy]. *Nervenarzt* 72:652-655 (2001).
60. Levy JA, Topczewski A, de Mendonca LI, Zatz M, Levisky RB: The spectrum of myopathies in the city of Sao Paulo. *Neurol Neurocir Psiquiatr* 18:219-224 (1977).
61. Löffler G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag, Berlin (2001).
62. Mathieu J, Lapointe G, Brassard A, Tremblay C, Brais B, Rouleau GA, Bouchard JP: A pilot study on upper esophageal sphincter dilatation for the treatment of dysphagia in patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S100-104 (1997).
63. Medici M, Pizzarossa C, Skuk D, Yorio D, Emmanuelli G, Mesa R: Oculopharyngeal muscular dystrophy in Uruguay. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S50-52 (1997).

64. Minvielle-Sebastia L, Keller W: mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 11:352-357 (1999).
65. Mitsumoto H, Bradley WG: Mitochondrial abnormalities in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 15:1210 (1992).
66. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR: Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89:773-779 (1997).
67. Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR: Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* 272:548-551 (1996).
68. Nakamoto M, Nakano S, Kawashima S, Ihara M, Nishimura Y, Shinde A, Kakizuka A: Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch Neurol* 59:474-477 (2002).
69. Nemeth A, Krause S, Blank D, Jenny A, Jenó P, Lustig A, Wahle E: Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res* 23:4034-4041 (1995).
70. Nohira O, Imai N, Okabe T, Hamaguchi K: [A Japanese pedigree with oculopharyngeal muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 34:461-465 (1994).
71. Noyes AP: A case of myasthenia gravis with certain unusual features. *Rhode Island Med J* 13:52-59 (1930).
72. Perie S, Eymard B, Laccourreye L, Chaussade S, Fardeau M, Lacau St Guily J: Dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy: a series of 22 French cases. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S96-99 (1997).
73. Pou Serradell A, Lloreta Trull J, Corominas Torres JM, Hammouda EH, Urtizberea JA, Richard P, Brais B: [Oculopharyngeal muscular dystrophy: study of patients from seven Spanish families with different GCG expansions in PABP2 gene]. *Neurologia* 19:239-247 (2004).
74. Rankin J, Wyttenbach A, Rubinsztein DC: Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death. *Biochem J* 348 Pt 1:15-19 (2000).
75. Restivo DA, Marchese Ragona R, Staffieri A, de Grandis D: Successful botulinum toxin treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Gastroenterology* 119:1416 (2000).
76. Rodrigue D, Molgat YM: Surgical correction of blepharoptosis in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S82-84 (1997).

77. Salvesen R, Brautaset NJ: Oculopharyngeal muscular dystrophy in Norway. Survey of a large Norwegian family. *Acta Neurol Scand* 93:281-285 (1996).
78. Sarfarazi M, Akarsu AN, Sayli BS: Localization of the syndactyly type II (synpolydactyly) locus to 2q31 region and identification of tight linkage to HOXD8 intragenic marker. *Hum Mol Genet* 4:1453-1458 (1995).
79. Scacheri PC, Garcia C, Hebert R, Hoffman EP: Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry. *Am J Med Genet* 86:477-481 (1999).
80. Schröder JM, Krabbe B, Weis J: Oculopharyngeal muscular dystrophy: clinical and morphological follow-up study reveals mitochondrial alterations and unique nuclear inclusions in a severe autosomal recessive type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21:68-73 (1995).
81. Shanmugam V, Dion P, Rochefort D, Laganier J, Brais B, Rouleau GA: PABP2 polyalanine tract expansion causes intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Ann Neurol* 48:798-802 (2000).
82. Taylor EW: Progressive vagus glossopharyngeal paralysis with ptosis: a contribution to the group of family diseases. *J Nerv Ment Dis* 42:129-139 (1915).
83. Tomé FM, Chateau D, Helbling-Leclerc A, Fardeau M: Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S63-69 (1997).
84. Tomé FM, Fardeau M: Nuclear changes in muscle disorders. *Methods Achiev Exp Pathol* 12:261-296 (1986).
85. Tomé FM, Fardeau M: Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 49:85-87 (1980).
86. Tomé FM, Fardeau M: Ocular myopathies. *Pathol Res Pract* 180:19-27 (1985).
87. Uyama E, Nohira O, Tomé FM, Chateau D, Tokunaga M, Ando M, Maki M, Okabe T, Uchino M: Oculopharyngeal muscular dystrophy in Japan. *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1:S41-49 (1997).
88. Uyama E, Tsukahara T, Goto K, Kurano Y, Ogawa M, Kim YJ, Uchino M, Arahata K: Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 23:1549-1554 (2000).
89. van der Sluijs BM, Hoefsloot LH, Padberg GW, Van Der Maarel SM, Van Engelen BG: Oculopharyngeal muscular dystrophy with limb girdle weakness as major complaint. *J Neurol* 250:1307-1312 (2003).

90. van der Sluijs BM, van Engelen BG, Hoefsloot LH: Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) due to a small duplication in the PABPN1 gene. *Hum Mutat* 21:553 (2003).
91. Victor M, Hayes R, Adams RD: Oculopharyngeal muscular dystrophy. A familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *N Engl J Med* 267:1267-1272 (1962).
92. Villanova M, Kawai M, Lubke U, Oh SJ, Perry G, Six J, Ceuterick C, Martin JJ, Cras P: Rimmed vacuoles of inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy contain amyloid precursor protein and lysosomal markers. *Brain Res* 603:343-347 (1993).
93. Wahle E: A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66:759-768 (1991).
94. Wahle E: Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem* 270:2800-2808 (1995).
95. Wahle E, Lustig A, Jenö P, Maurer P: Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem* 268:2937-2945 (1993).
96. Wahle E, Ruegsegger U: 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 23:277-295 (1999).
97. Warren ST: Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* 275:408-409 (1997).
98. Wells RD: Molecular basics of genetic instability of triplet repeats. *J Biol Chem* 271:2875-2878 (1996).
99. Wilmot GR, Warren ST: A new mutational basis for disease. In: Wells RD, Warren ST (eds) *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases*. San Diego, p 3-12 (1998).
100. Zhao J, Hyman L, Moore C: Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445 (1999).

Anhang

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Neuropathologie des Universitäts-Klinikums der RWTH Aachen

Meinem verehrten akademischen Lehrer, Herrn Professor Schröder, danke ich für die interessante wissenschaftliche Themenstellung sowie für die stetige Förderung. Er hat mich in jeder Hinsicht unterstützt und mir einen Einblick in wichtige molekularbiologische Methoden ermöglicht.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. rer. nat. A. Beckmann danken, der mir jederzeit hilfreich zur Seite stand. Er beantwortete meine Fragen stets mit viel Geduld und half mir bei der Überwindung zahlreicher fachlicher Probleme. In sehr netten und kollegialen Gesprächen gab er mir wertvolle Anregungen für diese Dissertation.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie bedanken. Ich wurde in der Abteilung sehr nett aufgenommen und fühlte ich mich dort aufgrund der Hilfsbereitschaft und der guten Atmosphäre sehr wohl. Mein besonderer Dank gilt Frau E. Pascuale, die mich nicht nur in die experimentellen Methoden der Molekularbiologie eingewiesen hat, sondern mir auch bei der Durchführung der Versuche stets hilfreich zur Seite stand.

Nicht zuletzt gilt mein Dank im besonderen Maße meiner Familie. So danke ich meinen Eltern für die stetige Unterstützung, mit der sie nicht nur die vorliegende Arbeit, sondern mein gesamtes Studium gefördert haben. Insbesondere möchte ich meiner Mutter für das Interesse danken, mit dem sie die Entstehung dieser Dissertation verfolgt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname:	Thomas Klossok
Geburtsdatum:	11. Dezember 1978
Geburtsort:	Koblenz
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Dr. med. dent. Heinrich Klossok Brigitte Klossok, geb. Walter
Geschwister:	Stefanie Klossok Wolfgang Klossok

Schulbildung:

1985 - 1989:	Besuch der Grundschule Boppard
1989 - 1998:	Besuch des Kant-Gymnasiums Boppard
Juni 1998:	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

August 1998 - August 1999:	Lebenshilfe für geistig behinderte Menschen e.V. in Koblenz
----------------------------	--

Hochschulstudium:

Oktober 1999:	Immatrikulation an der Albrecht-Ludwigs-Universität Freiburg
September 2000:	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 2002:	Zahnärztliche Vorprüfung
Oktober 2002:	Exmatrikulation an der Albrecht-Ludwigs-Universität Freiburg
Juli 2005:	Immatrikulation an der RWTH Aachen Staatsexamen und Approbation