

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Walker-Warburg Syndrom und Muscle-Eye-Brain Erkrankung Auf Fehlersuche im Erbgut

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Anne Mareike Erlekotte
aus Düsseldorf

Hamburg 2013

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.04.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: PD Dr. J. Denecke

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. K.Kutsche

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Genetik der α -Dystroglykanopathien	8
1.1.1 Glykosylierung	8
1.1.2 O-Mannosylierung	9
1.1.3 Der Dystrophin-Glykoprotein Komplex	10
1.2 Klinik der α -Dystroglykanopathien	13
1.2.1 Walker-Warburg Syndrom (WWS)	13
1.2.2 Muscle-Eye-Brain Erkrankung (MEBD)	14
1.2.3 Fukuyama-Erkrankung	14
1.2.4 Kongenitale Muskeldystrophie Typ 1C (MDC1C) und Gliedergürtel- dystrophie Typ 2I (LGMD2I)	15
1.2.5 Gliedergürteldystrophie Typ 2O (LGMD2O)	15
1.2.6 Kongenitale Muskeldystrophie Typ 1D (MDC1D)	16
1.2.7 Dystroglykan-Mutation c.575 C>T (p.T192M) assoziiert mit Typ 2-Glieder- gürteldystrophie	16
1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Nomenklatur	17
1.4 Epidemiologie	19
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Methoden	21
2.1.1 Fibroblasten-Zellkultur	21
2.1.2 RNA-Präparation	21
2.1.3 Reverse Transkription	21
2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution	21
2.1.6 Klonierung der PCR-Produkte in Bakterienzellen und Plasmid-Isolierung ..	22
2.1.7 Sequenzierung der Kandidatengene	22
2.1.8 Bestätigung der Mutationen auf gDNA-Ebene	22
2.1.9 Restriktionsanalyse	23
2.1.10 Real-Time PCR zur Bestimmung des Exon 6-Skippings von POMT2	23
2.1.11 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der Hemizygotie der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT]	24
2.1.12 Real-Time PCR zur Bestimmung der Expression der Zielgene	24

2.2 Material.....	25
2.2.1 Zellkultur.....	25
2.2.2 RNA-Präparation.....	25
2.2.3 Reverse Transkription.....	25
2.2.4 PCR.....	26
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution	26
2.2.6 Klonierung der PCR-Produkte in Bakterienzellen und Plasmid-Isolierung ..	27
2.2.7 Sequenzierung	27
2.2.8 Bestätigung der Mutationen auf gDNA- Ebene	28
2.2.9 Restriktions-Analyse	29
2.2.10 Real- Time PCR	29
2.2.11 Geräte:.....	30
2.2.12 Programme/ Internetseiten:	30
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Klinische Befunde	32
3.2 Genetische Befunde.....	38
3.2.1 Sequenzierung der Kandidatengene	38
3.2.2 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 1	38
3.2.3 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 2	39
3.2.4 Real-Time PCR zur Bestimmung des Exon 6-Skippings des POMT2-Gens	40
3.2.5 Untersuchung zur Vererbung der POMT2-Mutationen.....	41
3.2.6 Restriktionsanalyse.....	43
3.2.7 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der Hemizygotie der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT].....	44
3.2.8 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 9	46
3.2.9 Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs)	47
3.2.10 Splice-Varianten.....	49
3.2.11 Real-Time PCR zur Bestimmung der Expression der Zielgene.....	50
4. Diskussion	54
4.1 Klinische Befunde	54
4.2 Genetische Befunde.....	55
4.2.1 Sequenzierung der Kandidatengene	55
4.2.2 Real-Time PCR-Experimente	55
4.3 Befunde von Patient 1	57

4.4 Befunde von Patient 2	60
4.5 Befunde von Patient 9	63
4.6 Genotyp- Phänotyp-Korrelation.....	66
4.7 Zusammenschau und Ausblick	68
5. Zusammenfassung.....	69
6. Abkürzungsverzeichnis	70
7. Literaturverzeichnis	71
8. Danksagung	81
9. Lebenslauf	82
10. Eidesstattliche Versicherung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der O-Mannose verknüpften Glykane.....	9
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes	11
Abbildung 3: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PsHAI.....	23
Abbildung 4: Zerebrales MRT von Patient 1	34
Abbildung 5: Zerebrales MRT von Patient 2	35
Abbildung 6: Zerebrales MRT von Patient 7	35
Abbildung 7: POMT1-Sequenzierung von Patient 1	38
Abbildung 8: Ergebnis der POMT2-PCR bei Patient 2.....	39
Abbildung 9: Schematische Darstellung des POMT2-Genes bei Patient 2	39
Abbildung 10: POMT2-Sequenzierung von Patient 2.....	40
Abbildung 11: Relative Expressionswerte der Real-Time PCR von Patient 2	41
Abbildung 12: Stammbaum des Patienten 2 und Sequenzierungs-Ergebnisse	42
Abbildung 13: PsHAI-Restriktionsanalyse	43
Abbildung 14: Stammbaum des Patienten 2 und quantitative Real-Time PCR.....	45
Abbildung 15: POMGnT1-PCR von Patient 9.....	46
Abbildung 16: Schematische Darstellung des POMGnT1-Gens bei Patient 9.....	46
Abbildung 17: POMGnT1-Sequenzierung von Patient 9	47
Abbildung 18: Expression der Kandidatengene bei Patient 1	51
Abbildung 19: Expression der Kandidatengene bei Patient 2	52
Abbildung 20: Expression der Kandidatengene bei Patient 9.....	53
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der POMT1.....	58
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der POMT2.....	61
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der POMGnT1	64
Abbildung 24: Grundstruktur der O-Mannose verknüpften Glykane mit Angabe der bei unseren Patienten identifizierten defekten Enzyme	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nomenklatur der muskulären Dystrophie-Dystroglykanopathien nach Sparks und Escolar	18
Tabelle 2: Zellkulturmedien	25
Tabelle 3: Reagenzien der RNA-Präparation	25
Tabelle 4: PCR- Reagenzien	26
Tabelle 5: Oligonukleotid-Primer der cDNA-PCRs	26
Tabelle 6: Reagenzien von Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution	26
Tabelle 7: Zusammensetzung des TAE-Puffers	26
Tabelle 8: Reagenzien der Klonierung und Plasmid-Isolierung	27
Tabelle 9: Zusammensetzung der LB-Platten	27
Tabelle 10: Zusammensetzung des LB-Mediums	27
Tabelle 11: Reagenzien und Material der Sequenzierungen	27
Tabelle 12: Oligonukleotid-Primer der Sequenzierungen	28
Tabelle 13: Oligonukleotid-Primer der gDNA- PCRs	28
Tabelle 14: Oligonukleotid-Primer der Restriktions- Analyse	29
Tabelle 15: Oligonukleotid-Primer der Real- Time PCRs	29
Tabelle 16: Verwendete Geräte	30
Tabelle 17: Verwendete Programme und Internetseiten	30
Tabelle 18: Übersicht über die klinischen Befunde der 10 Patienten	33
Tabelle 19: Exonische SNPs der sechs Kandidatengene	48
Tabelle 20: In den Sequenzierungen identifizierte Splice-Varianten	49
Tabelle 21: Real-Time PCRs zur Messung der Expression der 6 Zielgene	50

1 Einleitung

1.1 Genetik der α -Dystroglykanopathien

Das Walker-Warburg Syndrom (WWS) und die Muscle-Eye-Brain Erkrankung (englisch: Muscle-Eye-Brain disease, MEBD) sind seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen. Sie zählen zu der Erkrankungsgruppe der α -Dystroglykanopathien, welche durch eine defekte O-Mannosylierung des α -Dystroglykans verursacht werden und somit eine Untergruppe der Glykosylierungsstörungen (Congenital disorders of glycosylation, CDG) sind (Schachter et al. 2004). Neben WWS und MEBD zählen aktuell auch die Fukuyama-Erkrankung, die kongenitalen Muskeldystrophien Typ Ic und Id und die Gliedergürtel-Muskeldystrophien Typ 2I und 2O zu den α -Dystroglykanopathien. Im Jahr 2011 wurde zudem eine primäre Mutation des Dystroglykan-Gens identifiziert, welche die O-Mannosylierung des Proteins beeinträchtigt (Yuji Hara et al. 2011).

1.1.1 Glykosylierung

Es sind verschiedene Formen der Glykosylierung, also der Anknüpfung von Zuckern und Zuckerketten an Proteine, bekannt. Je nach Art und chemischer Verbindung der Zucker und Aminosäuren werden N- und O-Glykosylierung, C- und O-Mannosylierung und daneben noch Sonderformen glykosylierter Moleküle, die Phosphoglykane und GPI-Anker unterschieden (Varki et al. 1999). Insgesamt sind über 40 verschiedene Verbindungen zwischen Zuckern und Aminosäuren beschrieben, die sich aus 8 verschiedenen Aminosäuren und 13 verschiedenen Monosacchariden zusammensetzen (Spiro 2002). Durch weitere kettenartige und verzweigte Verknüpfungen dieser Zucker entsteht eine überwältigende Vielzahl von Glykanen. Der überwiegende Teil der Glykosylierungsprozesse ereignet sich im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, so dass sich die meisten glykosylierten Proteine schließlich in der Zellmembran und der extrazellulären Matrix (ECM) befinden. Dort erfüllen sie vielfältige Funktionen als Struktur- und Transportproteine, Enzyme, in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation, aber auch in der Auseinandersetzung mit pathogenen und symbiontischen Organismen.

1.1.2 O-Mannosylierung

Die O-Mannosylierung ist eine bei Säugetieren seltene Form der Glykosylierung, welche fast ausschließlich als posttranslationale Modifikation des α -Dystroglykans bekannt ist (Barresi und Campbell 2006). Der erste Schritt der O-Mannosylierung, die Anknüpfung von Mannose an Serin- bzw. Threonin-Reste des Proteins, wird durch die Protein-O-Mannosyltransferasen (POMT) 1 und 2, die ein Heterodimer formen, gemeinsam katalysiert (siehe Abbildung 1) (Akasaka-Manyá et al. 2006, Manyá et al. 2004). In einem zweiten Schritt wird mittels der Protein O-Mannose-N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) N-Acetyl-Glucosamin angefügt. Hieran werden anschließend Galaktose und Sialinsäure geknüpft.

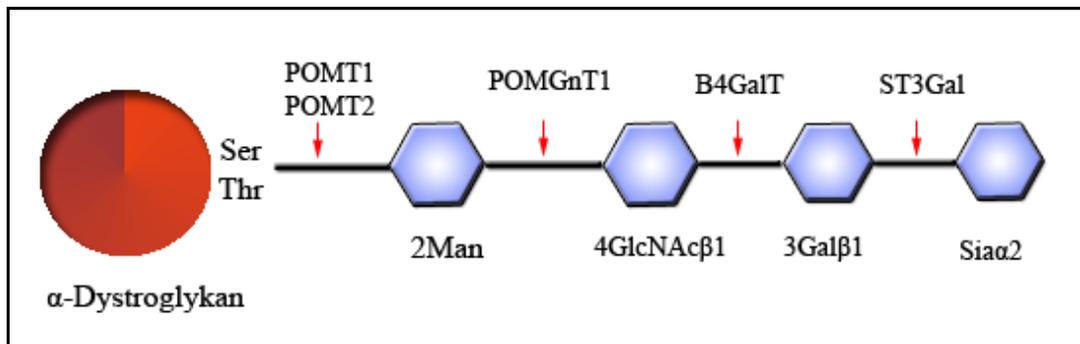


Abbildung 1: Grundstruktur der O-Mannose verknüpften Glykane (modifiziert nach Beltran-Valero de Bernabe et al. 2002).

Auf dieses aus vier Monosacchariden zusammengesetzte Grundgerüst erfolgen schließlich verschiedenste Ergänzungen und Modifikationen. Pathophysiologische Relevanz haben hierbei die Enzyme Fukutin, Fukutin related protein (FKRP) und LARGE, deren Funktionen jedoch noch nicht vollständig erforscht sind. Xiong et al. beschrieben, dass Fukutin mit POMGnT1 interagiert und möglicherweise dessen Aktivität moduliert (Xiong et al. 2006). Das LARGE-Protein scheint hingegen eine regulierende Funktion in der Glykosylierung des α -Dystroglykans einzunehmen (Barresi et al. 2004).

Im April 2012 wurde zudem das Genprodukt des Isoprenoid synthase domain-containing Gens (ISPD) als essentieller Cofaktor für den ersten Schritt der O-Mannosylierung identifiziert (Roscioli et al. 2012, Willer et al. 2012). Das Enzym, welches bei Prokaryoten an der Isoprenoid-Synthese beteiligt ist, war bei Wirbeltieren zuvor nicht beschrieben worden und seine genaue Funktion ist bislang unbekannt. Den

mutmaßlichen Glykosyltransferasen β -1-3-N-Acetylglucosaminyltransferase (β 3GNT1), transmembrane proteine 5 (TMEM5), Glykosyltransferase-like domaine-containing proteine 2 (GTDC2) sowie β -1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (β 3GALNT2) werden ebenfalls bislang nicht näher bekannte Funktionen im O-Mannosylierungs-Stoffwechsel zugeschrieben (Buysee et al. 2013, Manzini et al. 2012, Stevens et al. 2013, Vuillaumier-Barrot et al. 2012)

Bei den α -Dystroglykanopathien wurden bislang Defekte der Glykosyltransferasen POMT1, POMT2, POMGnT1, von Fukutin, FKR1P, LARGE, ISPD, β 3GNT1, TMEM5, GTDC2 und β 3GALNT2 beschrieben. Daneben ist eine Missense-Mutation des Dystroglykan-Gens (DAG1) bekannt, welche zu einer Beeinträchtigung der O-Mannosylierung des Proteins führt (Yuji Hara et al. 2011).

1.1.3 Der Dystrophin-Glykoprotein Komplex

Die Bedeutung der O-Mannosylierung für den menschlichen Organismus wurde erst erkannt, als Defekte der oben genannten involvierten Enzyme aufgedeckt wurden. Dabei rückte besonders eine supramolekulare Struktur in den Fokus: der Dystrophin-Glykoprotein Komplex (DGC). Diese Struktur bindet mit ihrer Komponente Dystrophin an den Zytoskelettbestandteil Aktin, durchspannt via β -Dystroglykan die Zellmembran, um dann mit der Komponente α -Dystroglykan in den Extrazellulärraum zu ragen (siehe Abbildung 2) (Ervasti et al. 1993). α - und β -Dystroglykan werden von einer gemeinsamen mRNA kodiert, nach der Translation enzymatisch in beide Anteile gespalten und anschließend unterschiedlich glykosyliert (Holt et al. 2000). α -Dystroglykan wird hierbei ausgeprägt O-mannosyliert. Die O-verknüpfte Zucker stellen schließlich eine Verbindung zu α 2-Laminin und anderen Komponenten der ECM wie Agrin und Neurexin, her. Diese Verbindungen spielen insbesondere in Skelettmuskulatur und Nervenzellen eine wichtige Rolle für Stabilität, Adhäsion und Zell-Zell-Kommunikation (Sunada und Campbell 1995).

Es wurde gezeigt, dass die O-Mannose-Reste des α -Dystroglykans für die Interaktion zwischen dem Zytoskelett und der ECM von zentraler Bedeutung sind (Michele et al. 2002). Hierdurch scheint die defekte O-Mannosylierung des α -Dystroglykans die entscheidende pathophysiologische Ursachen der α -Dystroglykanopathien - neuronale Migrationsstörung und Verlust der muskulären Integrität - zu bedingen.

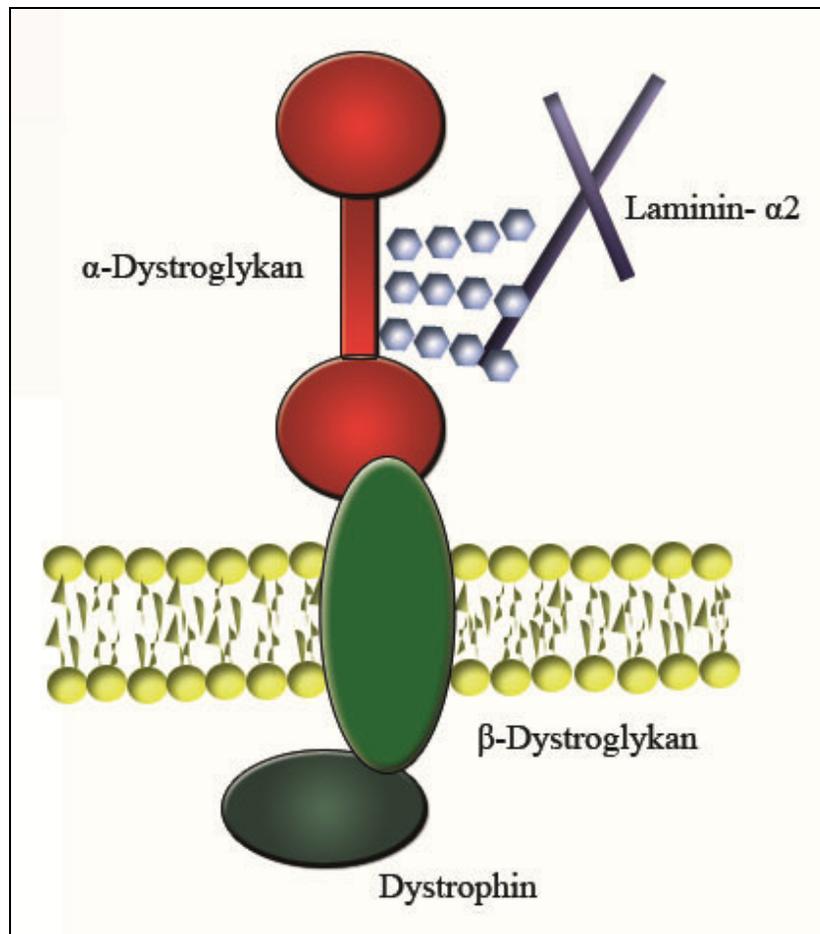


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Dystrophin- Glykoprotein- Komplexes (DGC) (modifiziert nach Sciandra et al. 2007). Die blau dargestellten O-Mannose-verknüpften Glykane stellen Verbindungen des DGC mit Komponenten der extrazellulären Matrix, z.B. Laminin- α 2 her.

Muskelbiopsien von α -Dystroglykanopathie-Patienten zeigen als Folge der genannten Defekte dystrophische Veränderungen im Sinne einer abnormen Variation der Fasergröße, Bindegewebsproliferation, zentraler Verlagerung der Zellkerne sowie Zeichen von Nekrose und Regeneration (Jimenez-Mallebrera et al. 2003, Sabatelli et al. 2003). Die Basalmembran ist verdünnt und unvollständig, dabei in Abschnitten auch doppelt angelegt (Vajsar et al. 2000). Pathognomonisch ist die fehlende immunhistochemische Anfärbbarkeit von α -Dystroglykan bei einer regulären Darstellung des β -Dystroglykans.

Die Lokalisation des DGC im Gehirn wurde von Moore et al. näher beschrieben. Sie fanden diesen Protein-Komplex besonders in Astrozyten und Neuronen von

Hippocampus und zerebellären Cortex (Moore et al. 2002). In histologischen Schnitten aus Autopsien von α -Dystroglykanopathie-Patienten zeigte sich insbesondere eine abnorme kortikale Schichtung mit einer Unterbrechung der Glia limitans und einer Migration von Neuroblasten in den Subarachnoidalraum (Beltran-Valero de Bernabe 2002). Anhand der Ausprägung der neuroglialen Ektopie und der kortikalen Desorganisation wurde 2012 ein histoneuropathologischen Kriterienkatalog erstellt, nach welchem postmortal eine Diagnosestellung und Graduierung der α -Dystroglykanopathien möglich ist (Devisme et al. 2012).

1.2 Klinik der α -Dystroglykanopathien

Im Vordergrund des klinischen Bildes der α -Dystroglykanopathie-Patienten steht die Trias aus muskulärer Dystrophie, zerebralen und okulären Fehlbildungen. Aufgrund des erstgenannten obligaten Befundes zählt die Erkrankungsgruppe auch zu den kongenitalen Muskeldystrophien (congenital muscular dystrophies, CMD). Bei den zerebralen Fehlbildungen fällt als gemeinsames Merkmal der schweren Erkrankungsformen die Lissenzephalie auf, benannt nach der glatt wirkenden Oberfläche der Großhirnrinde, welche durch ein Fehlen (Agyrie) bzw. eine Vergrößerung (Pachygyrie) der Hirnwindungen als Folge der neuronalen Migrationsstörung entsteht. Nach der Einteilung von Dobyns und Truwit besteht bei den α -Dystroglykanopathie-Patienten nach pathologisch-anatomischen Kriterien eine Typ II-Lissenzephalie, welche aufgrund des makroskopischen Aspekts des Gehirns auch als „Kopfsteinpflaster-Dysplasie“ (engl.: cobblestone dysplasia) bezeichnet wird und im Gegensatz zu der klassischen (Typ I) Lissenzephalie von weiteren schweren zerebralen Fehlbildungen begleitet ist (Dobyns et al. 1985, Dobyns und Truwit 1995).

1.2.1 Walker-Warburg Syndrom (WWS)

Das erstmals im Jahr 1942 von Walker beschriebene WWS ist mit einer geschätzten Prävalenz von 1,2 pro 100.000 Einwohner eine sehr seltene Erkrankung (Mostacciolo et al. 1996). Die betroffenen Patienten dieser schwersten Form der α -Dystroglykanopathien haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von unter einem Jahr. Bei den WWS-Patienten bestehen ausgeprägte Gehirnfehlbildungen. Neben der Typ II-Lissenzephalie fallen insbesondere okzipitale Enzephalozelen, ein z.T. massiver Hydrozephalus, eine Balkenhypoplasie oder -agenesie und eine Dandy-Walker Malformation (Hypoplasie des Kleinhirnwurms mit zystischer Erweiterung des vierten Ventrikels) auf (Dobyns et al. 1989). Die okulären Fehlbildungen schließen Mikrophthalmie, kongenitalen Katarakt, Retinadysplasie und die Atrophie des Nervus opticus ein. Als diagnostisch notwendiger Parameter der zumeist schweren Muskeldystrophie bestehen erhöhte Kreatinkinase (CK)- Werte im Serum.

Beltran-Valero de Bernabe et al. beschrieben 2002 als erste eine Mutation des POMT1-Genes bei einem WWS-Patienten. In der Folge wurden bei WWS-Patienten auch Mutationen in den Genen der POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKRP, LARGE, ISPD, β 3GNT1, TMEM5 und β 3GALNT2 identifiziert (Beltran-Valero de Bernabe et al. 2003, Beltran-Valero de Bernabe et al. 2004, Buysee et al. 2013, van Reeuwijk et al.

2005b, van Reeuwijk et al. 2007, Roscioli et al. 2012, Stevens et al. 2013, Vuillaumier-Barrot et al. 2012, Willer et al. 2012) Bei der Mehrzahl der Betroffenen, ca. 60%, ist die genetische Ursache jedoch bis heute nicht bekannt. Bei den WWS-Patienten, bei denen die zugrunde liegende Mutation identifiziert werden konnten, lagen zumeist Defekte der POMT1 vor.

1.2.2 Muscle-Eye-Brain Erkrankung (MEBD)

Die MEBD wurde erstmals in Finnland 1978 beschrieben und nach den betroffenen Organsystemen, Muskel, Auge und Gehirn, benannt (Raitta et al. 1978). Das Spektrum der klinischen Symptome der MEBD-Patienten ist breit und der Übergang von schweren MEBD-Fällen zum WWS ist fließend. Die beschriebenen Gehirnfehlbildungen umfassen besonders Typ II-Lissenzephalie, Hydrozephalus, Balkenhypoplasie, Kleinhirnrinden- und Vermishypoplasie. Die ophthalmologischen Befunde schließen eine schwere kongenitale Myopie, Glaukom und retinale Hypoplasie ein. Wie bei dem WWS findet sich eine schwere Muskeldystrophie mit erhöhtem CK-Wert im Serum. Die Lebenserwartung der betroffenen Patienten beträgt 10 bis 30 Jahre. Im Jahr 2001 wurden bei mehreren MEBD-Patienten Mutationen des POMGnT1-Genes identifiziert (Yoshida et al. 2001). Bei der Mehrzahl der bis heute analysierten MEBD-Fälle wurden ebenfalls Defekte der POMGnT1 beschrieben. Die Prävalenz der bei Weitem häufigste Mutation c.1539 + 1 G>A beträgt in Finnland aufgrund eines Founder-Effektes 2 pro 100.000 Einwohner, in isolierten Gegenden West-Finnlands ist sie sogar bedeutend höher (Nori et al. 2002). Unter den weiteren bekannten POMGnT1-Mutationen sind insbesondere die von Saredi et al. und Vuillaumier-Barrot et al. et al. identifizierten intragenetischen Rearrangements durch Deletion der Exone 2-8 bzw. 17-22 erwähnenswert (Saredi et al. 2012, Vuillaumier et al. 2012). Neben POMGnT1-Mutationen wurden bei MEBD-Patienten aber auch Mutationen der Gene der Glykosyltransferasen POMT1, POMT2 bzw. von Fukutin, FKRP, LARGE und β 3GALNT2 identifiziert (Mercuri et al. 2006, Stevens et al. 2013).

1.2.3 Fukuyama-Erkrankung

Die Fukuyama-Erkrankung (englisch: Fukuyama congenital muscular dystrophy, FCMD) ist eine fast ausschließlich in Japan vorkommende Erkrankung. Dort zählt sie jedoch mit einer Inzidenz von 6,9 - 11,9 pro 100.000 Geburten zu den verhältnismäßig häufig auftretenden CMDs (Kato et al. 2004). Der erste FCMD-Fall wurde 1960

beschrieben (Fukuyama et al. 1960). Neben der charakteristischen Muskeldystrophie besteht bei den betroffenen Patienten eine mentale Retardierung mit im Vergleich zu den beiden zuvor beschriebenen Krankheitsbildern weniger ausgeprägten zerebralen Fehlbildungen (Mikropolygyrie, fokale Fusion der Hemisphären, Hydrozephalus). Nur in schweren Fällen bestehenden zudem ophthalmologische Auffälligkeiten. Die Lebenserwartung der Patienten beträgt 10 bis 30 Jahre.

Viel Beachtung fand eine Nature-Veröffentlichung zur Genetik der FCMD, welche bei 87% der betroffenen Patienten eine Founder-Mutation, bestehend aus einer 3 kb großen retrotransposalen Insertion in der 3'UTR des Fukutin-Gens, beschrieb (Kobayashi et al. 1998). Es wird angenommen, dass diese Insertion die Stabilität der mRNA durch eine Veränderung der Sekundärstruktur herabsetzt. Sicher ist jedenfalls, dass die Expression des betroffenen Gens deutlich reduziert ist.

1.2.4 Kongenitale Muskeldystrophie Typ 1C (MDC1C) und Gliedergürtel-dystrophie Typ 2I (LGMD2I)

Die kongenitale Muskeldystrophie Typ1C und die Gliedergürteldystrophie Typ 2I sind weniger schwere Erkrankungsbilder aus der Gruppe α -Dystroglykanopathien. Bei den betroffenen Patienten finden sich nur geringe oder keine zerebralen Fehlbildungen und mentale Retardierung. Die Muskeldystrophie bei der LGMD2I ist geringer ausgeprägt als bei der MDC1C. Viele der Patienten mit dem Erkrankungsbild der LGMD2I sind gehfähig. Den beiden Erkrankungen liegt zumeist eine Mutation des FKRPs zugrunde (Brockington et al. 2001, Brockington et al. 2002). Wie auch bei den zuvor genannten Syndromen besteht jedoch keine zwingende Genotyp-Phänotyp-Korrelation. So wurden bei betroffenen Patienten auch Defekte der anderen oben genannten Glykosyltransferasen identifiziert (Biancheri et al. 2007, van Reeuwijk et al. 2006).

1.2.5 Gliedergürteldystrophie Typ 2O (LGMD2O)

Die nur in 2 Fällen beschriebene LGMD2O ist durch eine sich im Jugendalter manifestierende Gliedergürteldystrophie, eine Myopie und eine unauffällige mentale Entwicklung gekennzeichnet und wird durch Mutationen des POMGnT1-Gens verursacht (Clement et al. 2008). In der aktuellen Veröffentlichung von Raducu et al. wird hierbei erstmals ein Promotor-Defekt der POMGnT1 beschrieben. Als Folge einer homozygoten 9-bp Duplikation in der Promotor-Region des Gens wurde eine

Halbierung der POMGnT1-mRNA- und Protein-Expression nachgewiesen (Raducu et al. 2012).

1.2.6 Kongenitale Muskeldystrophie Typ 1D (MDC1D)

Die außerordentlich seltene kongenitale Muskeldystrophie Typ 1D wird durch Mutationen des LARGE-Gens verursacht. Klinische Charakteristika sind eine mäßige Muskeldystrophie und eine schwere mentale Retardierung mit geringen strukturellen zerebralen Fehlbildungen (Longman et al. 2003).

1.2.7 Dystroglykan-Mutation c.575 C>T (p.T192M) assoziiert mit Typ 2-Gliedergürteldystrophie

Im Jahr 2011 wurde die Missense-Mutation c.575 C>T (p.T192M) des Dystroglykan-Gens (DAG1) bei einer Patientin mit CMD und geringen kognitiven Einschränkungen beschrieben (Yuji Hara et al. 2011). Die Autoren wiesen in einem Maus-Modell nach, dass die Mutation zu einer Verminderung der posttranslationalen O-Mannosylierung von α -Dystroglykan führt, möglicherweise durch eine Reduktion der Interaktion des Proteins mit LARGE. Immunhistochemisch wurde eine verminderte Laminin- α -Dystroglykan-Bindung in Gehirn- und Skelettmuskelproben, nicht jedoch im Herzmuskel festgestellt. Die Ergebnisse warfen viele Fragen auch, unter anderem auch zur Terminologie der α -Dystroglykanopathien. Yuji Hara et al bezeichnen die von Ihnen beschriebene Erkrankung als primäre, sämtliche zuvor genannten als sekundäre α -Dystroglykanopathien. Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet kann man bei den zuvor genannten von einer primären, bei der DAG1-Mutation von einer sekundären O-Mannosylierungsstörung sprechen.

1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Nomenklatur

Die Begriffe WWS und MEBD, wie auch die Namen der weiteren α -Dystroglykanopathien, beschreiben klinische Syndrome. Die Zuordnung eines klinischen Bildes zu der Diagnose WWS bzw. MEBD erfolgt nach dem Schweregrad der Fehlbildungen und Beeinträchtigungen. Bei der Betrachtung des gesamten Kollektivs der α -Dystroglykanopathie-Patienten fallen jedoch fließende Übergänge zwischen den klinischen Charakteristika der einzelnen Erkrankungen auf, was zu diagnostischen Unsicherheiten führt.

Zusätzliche Schwächen der Nomenklatur werden bei der Darstellung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation deutlich. Einerseits wurden bei WWS- (wie auch MEBD-) Patienten Mutationen in verschiedenen Genen (POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKRP, Large, ISPD, β 3GNT1, TMEM5 und β 3GALNT2) identifiziert, andererseits wurde nachgewiesen, dass POMT1-Mutationen verschiedene Syndrome -WWS, MEBD und LGMD2I - bedingen können.

Nach Bestimmung des betroffenen Gens wird von Sparks und Escolar daher eine neue Nomenklatur empfohlen (Sparks und Escolar 2011). Die α -Dystroglykanopathien werden hiernach zunächst klinisch in die Typen A (kongenital, mit Gehirn- und Augenfehlbildungen), B (kongenital, mit mentaler Retardierung) und C (Gliedergürteldystrophie-Typ) unterteilt, die folgende Ziffer bezeichnet dann das betroffene Gen.

Tabelle 1: Nomenklatur der muskulären Dystrophie-Dystroglykanopathien (MDDG) nach Sparks und Escolar

	Kongenital, mit Gehirn- und Augenfehlbildungen	Kongenital, mit mentaler Retardierung	Gliedergürtel- Dystrophie-Typ
POMT1	MDDGA 1	MDDGB 1	MDDGC 1
POMT2	MDDGA 2	MDDGB 2	MDDGC 2
POMGnT1	MDDGA 3	MDDGB 3	MDDGC 3
Fukutin	MDDGA 4	MDDGB 4	MDDGC 4
FKRP	MDDGA 5	MDDGB 5	MDDGC 5
Large	MDDGA 6	MDDGB 6	-
ISPD	MDDGA 7	-	-
GTDC2	MDDGA 8	-	-
DAG1	-	-	MDDGC 9
TMEM5	MDDGA 10	-	-
B2GALNT2	MDDGA 11	-	-

1.4 Epidemiologie

α -Dystroglykanopathien sind sogenannte „orphan diseases“ (englisch: orphan „Waise“, disease „Erkrankung“), sehr seltene Erkrankungen. Es gibt keine exakten Angaben zur weltweiten Prävalenz. In verschiedenen, regional begrenzten Studien wurden Raten von 0,1 bis 12 Fälle pro 100.000 Geburten angegeben, wobei die große Schwankungsbreite durch Founder-Mutationen zu erklären ist, welche zu lokalen Konzentrationen von Erkrankungsfällen führen (Kato et al. 2004, Mostacciuolo et al. 1996, Taniguchi et al. 2003). So wurden die meisten MEBD-Fälle in Finnland berichtet und die Fukuyama-Erkrankung tritt fast ausschließlich in Japan auf.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Diese Arbeit untersucht die klinischen und genetischen Befunde eines Kollektivs von 10 Patienten, die an einem WWS oder einer MEBD leiden bzw. litten. Die Beschreibung der klinischen Phänotypen soll das Spektrum der schweren Fehlbildungen und Beeinträchtigungen der α -Dystroglykanopathien aufzeigen. Die genetischen Untersuchungen bestehen einerseits aus der Sequenzierung der Kandidatengene POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKR1 und LARGE auf cDNA-Ebene, andererseits aus der Messung ihrer Expression mittels eines Real-Time PCR-Verfahrens. Die nach Abschluss der Studie im Jahr 2012 identifizierten WWS-Kandidatengen ISPD, β 3GNT1, TMEM5 und β 3GALNT2 wurden nicht untersucht.

Die Zielsetzungen der Experimente war erstens die Detektion von Mutationen in den genannten Genen, zweitens die Erfassung von Defekten der Regulation ihrer Expression, drittens die Untersuchung der Auswirkungen der beschriebenen Mutationen auf die Expression der sechs Gene und viertens die Beurteilung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation für die Patienten mit bzw. ohne identifizierte Mutationen.

Durch die Sequenzierung auf Transkriptebeleg erfolgte eine Erweiterung der üblichen diagnostischen Methoden auf die Erfassung von Splicing-Alterationen und intragenetischen Rearrangements, z.B. durch Deletion mehrerer Exone. Die Messung der Genexpression ermöglichte zudem eine Identifikation von Defekten der Regulation, z.B. durch Promotormutationen. Durch die Wahl dieser Methoden wurde eine in der Art zuvor nicht etablierte Genauigkeit und Vielschichtigkeit des Mutations-Screenings bei α -Dystroglykanopathie-Patienten erreicht.

Die vorliegende Arbeit soll somit neue Einblicke in die pathogenetischen Mechanismen der α -Dystroglykanopathien schaffen und einen weiteren Baustein für das Verständnis dieser wenig erforschten Erkrankungsgruppe bilden.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Fibroblasten-Zellkultur

Nach ausführlicher Aufklärung und der Einwilligung der Eltern wurden den Patienten Hautbiopsien entnommen und hieraus Fibroblasten-Zellkulturen angelegt. Als Nährmedium diente Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM). Die Zellkultur wurde bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufluss geführt.

2.1.2 RNA-Präparation

Nach Ablösung der Fibroblasten mit Trypsin und Reinigung mit PBS wurde die gesamte RNA mittels des RNeasy mini kits extrahiert.

2.1.3 Reverse Transkription

Die Menge der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt und nach dem Protokoll der Powerscript RT in cDNA der Konzentration von 1µg/µl transkribiert. Die cDNA wurde mit Hilfe einer Test-PCR überprüft und anschließend bei -30 °C gelagert.

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der cDNA erfolgte mittels des Standardverfahrens der Polymerase-Kettenreaktion nach Herstellerangaben der Taq DNA Polymerase. Mithilfe des Programmes PerlPrimer wurden Primer zur Amplifikation der vollständigen Gene von POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKRP und LARGE entworfen (Marshall 2004). Zum Erhalt der optimalen Reaktionsbedingungen wurde für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR durchgeführt.

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarose wurde mit TAE-Laufpuffer angesetzt und aufgekocht, je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße wurde die Agarose 0,8 bis 1,5 prozentig konzentriert. Als Probenpuffer wurde Bromphenolblau verwendet. Zur Größenbestimmung lief ein kommerziell erhältlicher Größenstandard mit. Nach Elektrophorese bei 3-4 V/cm wurden die Gele zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente unter UV-Licht in ein Ethidiumbromid-Bad gegeben. Die gewünschte Bande

wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Perfectprep Gel Cleanup Kits nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.1.6 Klonierung der PCR-Produkte in Bakterienzellen und Plasmid-Isolierung

Die PCR-Produkte wurden mittels des Topo TA Cloning Kits in den linearisierten Plasmid-Vektor pCR®II ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente TOP10F⁻-E.coli bei einem Hitzeschock (42°C) von 45 Sekunden Dauer. Nach Inkubation der Bakterien in SOC-Medium nach Angaben des Herstellers wurden die E.coli auf LB/Ampicillin/X-Gal/IPTG-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Mindestens 10 Kolonien pro Platte wurden anschließend in 3 ml LB-Medium bei 37°C und 180 rpm über Nacht angezogen. Die Plasmide wurde mittels des PerfectPrep Plasmid Mini Kits aus den Bakterienzellen isoliert.

2.1.7 Sequenzierung der Kandidatengene

Die Gene POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKR1P und LARGE wurden unter Verwendung von BigDye 3.1 und Sequenzierungsprimern, die an dem Plasmidvektor (M13 for & rev des Topo TA Cloning Kits) bzw. an zentrale Regionen der Zielgene anlagern nach Aufreinigung über Sephadex-Gelsäulen sequenziert. Pro Patient und Gen wurden mindestens vier, im Durchschnitt fünf Transkripte untersucht.

Die Transkript-Sequenzen wurden mit folgenden Referenzsequenzen (RefSeq, National Center for Biotechnology Information, NCBI) aligned: NM_007171.3, NM_013382.4, NM_017739.2, NM_006731.2, NM_001039885.1, NM_133642.2. Die Nomenklatur zur Charakterisierung der Mutationen basiert auf den Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS), wobei +1 dem A des ATG-Initiations-Codons (Codon 1) entspricht.

2.1.8 Bestätigung der Mutationen auf gDNA-Ebene

Das Vorhandensein der Mutationen wurde mittels einer Sequenzierung auf gDNA-Ebene bestätigt. Hierfür wurde genomische DNA aus den Fibroblasten der Patienten bzw. aus Blutproben der Eltern mittels des QIAamp DNA Mini Kits isoliert. Die betroffenen Exone (Exon 15 von POMT1, Exone 3 bis 6 von POMT2, Exone 15 bis 17 von POMGnT1) wurden mittels Primern, die in der flankierenden 5`und 3`-Intron-Sequenzen lokalisiert waren, mithilfe der bereits beschriebenen Methoden amplifiziert und anschließend unter Verwendung der PCR-Primer sequenziert.

2.1.9 Restriktionsanalyse

Um die Verteilung der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT] in der Familie des Patienten 2 zu untersuchen, wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym PshAI durchgeführt. Dieses Enzym schneidet an der in Abbildung 3 dargestellten Erkennungssequenz. Bei Vorliegen der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT] ist die Schnittstelle durch den Austausch des letzten Cytosins durch Adenin verändert, so dass die Restriktion nicht erfolgt. Nach Durchführung einer PCR unter Verwendung der gDNA der zu untersuchenden Familienmitglieder und den Primern für das Exon 6 des POMT2-Gens erfolgte die Restriktion nach Angaben des Herstellers und die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese.

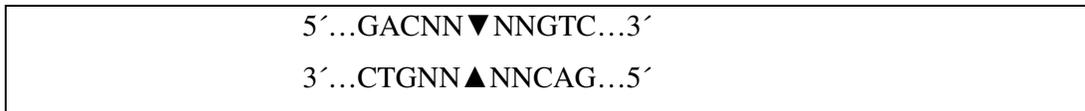


Abbildung 3: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PshAI

2.1.10 Real-Time PCR zur Bestimmung des Exon 6-Skippings von POMT2

Um die Auswirkungen der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT] weiter zu untersuchen, wurden Real-Time PCR-Bedingungen entworfen, mittels welcher das Ausmaß des Skipping des 6.Exons des POMT2-Gens bestimmt werden sollte. Als Referenz wurden vier Zelllinien gesunder Kontrollpersonen verwendet. Zunächst wurden Primer, welche die Exon-Exon-Grenze 6/7 überspannen, entworfen. In einem weiteren Ansatz wurden Primer verwendet, welche über der Exon-Exon-Grenze 8/9 lagen. Als Kontrolle dienten Primer für die Housekeeping-Gene Cyclophylin A, h-ALU und GAPDH. Für jedes Primerpaar wurden unter Verwendung von Kontroll-cDNA in den Konzentrationen 20, 10, 1 und 0.1ng/µl Standard- Kurven zur Überprüfung der Effizienz der Reaktion erstellt. Die Spezifität der Reaktion wurde über eine Schmelzpunkt- Analyse ermittelt. Jeder Reaktionsansatz der Real-Time PCRs bestand aus 1 µl cDNA (20ng/µl), 6 µl Sybr[®]Green Master, 1 µl Primer-Mix (10pmol/µl) und 4 µl Wasser und wurde zweimal pro Patient bzw. Kontrolle und Primerpaar durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten in 40 Zyklen von 95°C mit einer Dauer von 15 Sekunden, gefolgt von einer Minute bei 60°C. Mit Hilfe der komparativen Ct-Methode wurde die Relation der Transkripte, die die Exone 6 und 7 beinhalten, zu den Transkripten, die die Exone 8 und 9 beinhalten, berechnet (Pfaffl 2001). Da in den durchgeführten cDNA-Sequenzierungen des POMT2-Gens keine weiteren Splice-

Varianten identifiziert wurden, durfte man den so berechneten Wert als Maß für das Skipping des 6.Exons betrachten.

2.1.11 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der Hemizygotie der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT]

Zum Nachweis der Hemizygotie der POMT2- Mutation c.[808C>A; 811delT] bei Patient 2 wurde eine quantitative Real-Time PCR angewandt (Griffin et al. 2005, Wilke et al. 2000). Hierfür wurden zwei Primerpaare entworfen, welche auf dem POMT2-Gen (Chromosom 14) lokalisiert waren, und nach dem oben beschriebenen Real-Time PCR-Verfahren in einem Ansatz mit gDNA des Patienten, seiner Familienmitglieder und zwei gesunden Kontrollen verwendet. Als Kontroll-Gen diente FKRP auf dem Chromosom 19.

2.1.12 Real-Time PCR zur Bestimmung der Expression der Zielgene

Die Quantifizierung der Expression der Zielgene in den Fibroblasten der Patienten erfolgte ebenfalls mittels Real-Time PCR. Als Referenz wurden vier Zelllinien gesunder Kontrollpersonen verwendet. Für das Experiment wurden für jedes zu untersuchende Gen Primer entworfen, welche mindestens eine Exon-Exon-Grenze überspannen. Hierfür wurden Regionen ausgewählt, in denen in den Sequenzierungen keine Splice-Variationen aufgetreten waren. Als Kontrolle dienten die Housekeeping-Gene Cyclophilin A, h-ALU und GAPDH. Die PCR-Ansätze und die Validierung der PCRs erfolgten nach den bereits beschriebenen Verfahren. Die Expression der Zielgene in den Patientenzellen in Relation zu den vier Kontrollzelllinien und in Relation zu den Referenzgenen wurde mittels der komparativen Ct-Methode berechnet.

2.2 Material

2.2.1 Zellkultur

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Dulbecco´s modified Eagle´s Medium (DMEM)	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
+ 10 % fetales Rinderserum	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
+ 2 mM L-Glutamin	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
+ 100 U/ml Penicillin	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
+ 100 µg/ml Streptomycinsulfat	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

+ jeweils 1%:

Dulbecco´s MEM	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Arginin	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Cystein	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Glutamin	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Inositol	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Leucin	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Phosphat	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien

2.2.2 RNA-Präparation

Tabelle 3: Reagenzien der RNA-Präparation

PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
2- Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNeasy mini kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2.3 Reverse Transkription

PowerScript RT

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.2.4 PCR

Tabelle 4: PCR-Reagenzien

Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP- Mix	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Oligonukleotid- Primer der cDNA-PCRs Operon, Köln, Deutschland

POMT1 forw	CAACCGTCGGCCCAGTC
POMT1 rev	CCTTCAACCTCGTCCCGACC
POMT2 forw	GCTGGTCAGACAAAGTGTGCCTCC
POMT2 rev	ACCCAGGCTGGAATCTTTGCAGTG
POMGnT forw	GGACATTGGTGACCCGCCAATC
POMGnT rev	CGCAGGGTCCTGGAGGAGGTC
Fukutin forw	GACAACCAAGTGAGCAGCAC
Fukutin rev	GTTCCCACTTATGTTTGACAAATAG
FKRP forw	ACTGAGGCTCAGGCCAAATC
FKRP rev	CGCTCACACAGAGCTTCTCC
Large forw	GAGGACTTCATGCTCCGGACAG
Large rev	CCAAACAGCGAGTGGCACTTC

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution

Tabelle 6: Reagenzien von Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Elution

Agarose	Fa. Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
100 bp DNA-ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 7: Zusammensetzung des TAE-Puffers

1 l AqDest + 242 g Trisbase	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
+ 57,1 ml Acetat	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
+ 100 ml EDTA	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.2.6 Klonierung der PCR-Produkte in Bakterienzellen und Plasmid-Isolierung

Tabelle 8: Reagenzien der Klonierung und Plasmid-Isolierung

Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
SOC- Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
PerfectPrep Plasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Zusammensetzung der LB-Platten

500 ml LB- Agar, Miller	Merck, Darmstadt, Deutschland
+ 200 µl Ampicillin	Merck, Darmstadt, Deutschland
+ 700 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-indolyl-galactopyranosid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
+ 200 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10: Zusammensetzung des LB- Mediums

LB- Broth, Lennox	Merck, Darmstadt, Deutschland
+ 0,1 % Ampicillin 1:1000	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2.7 Sequenzierung

Tabelle 11: Reagenzien und Material der Sequenzierungen

BigDye 3.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sephadex™ G- 50 Fine DNA Grade	Amersham Biosciences, Upssala, Schweden
Multi Screen Filter Plates for High Throughput Separations	Millipore Corporation, Bedford, USA
MicroAmp Optical 96- Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 12: Oligonukleotid-Primer der Sequenzierungen Operon, Köln, Deutschland

POMT1 seq1	CCGTGCCTCACAGGTCTCGG
POMT1 seq2	CCCACCAGCAACAGGTGACC
POMT2 seq1	CCACAGGCACCTCTACCC
POMT2 seq2	GATAATCCACAGGTTGTTGTAGT
POMGnT seq1	CCAAACAGTGCCACCACATC
POMGnT seq2	CTCTCCTTTCAGCCCAGGGG
Fukutin forw	GACAACCAAGTGAGCAGCAC
Fukutin rev	GTTCCCACTTATGTTTGACAAATAG
FKRP seq1	AGACCACGCGCTGCTTCG
FKRP seq2	CTCGAGCCAGTAGCGCACG
Large seq1	GGTCAGCCTCCACATCTGCTC
Large seq2	CCCTTGGAAGAGGCTACAACAC
Large seq3	AGCATTGACAGCAACTCCGC

2.2.8 Bestätigung der Mutationen auf gDNA- Ebene

QIAamp DNA Mini Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 13: Oligonukleotid-Primer der gDNA-PCRs Operon, Köln, Deutschland

POMT1 Exon 15 forw	TTCTGCTCTGAGCTCTTGACC
POMT1 Exon 15 rev	CAATGCTCAGCGAGCTAGG
POMT2 Exon 3 forw	GCAGCTGGAGGGAAGTTCAG
POMT2 Exon 3 rev	TTAGTGTGGCCCAGGGTTC
POMT2 Exon 4 forw	TCATCAGGTCCCCTGTCTTAAATG
POMT2 Exon 4 rev	GGGCCCTTGAATGTAAGTACTGATTTTC
POMT2 Exon 5 forw	GTTTCCTACTACTGGGGTGCTTGG
POMT2 Exon 5 rev	ACAGAAATTTTGGAGTTGCCACAG
POMT2 Exon 6 forw	AAGACAGGGCACAGCACAGC
POMT2 Exon 6 rev	CCAGAACACAGCCACTCTGC
POMGnT1 Exon 15-17 forw	AGGAGGTGCTCCTGAGACC
POMGnT1 Exon 15-17 rev	CTTCCCAAGGTTACATGG

2.2.9 Restriktions-Analyse

PshAI

New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 14: Oligonukleotid-Primer der Restriktions-Analyse

Operon, Köln, Deutschland

POMT2 Exon 6 forw	AAGACAGGGCACAGCACAGC
POMT2 Exon 6 rev	CCAGAACACAGCCACTCTGC

2.2.10 Real- Time PCR

Sybr[®]Green Master Mix

Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 15: Oligonukleotid-Primer der Real-Time PCRs

Operon, Köln, Deutschland

RT hAlu forw	GGTTTCTGGTTCACAGT
RT hAlu rev	ACCATGCAGCACAGACCAATT
RT GAPDH forw	GTCAGTGGTGGACCTGACCT
RT GAPDH rev	ACCTGGTGCTCAGTGTAGCC
RT Cyclophilin A forw	TTTCATCTGCACTGCCAAGA
RT Cyclophilin A rev	TTGCCAAACACCACATGCT
RT POMT1 for	ACGTCAGCAGGAACCTCAGC
RT POMT1 rev	CCAGCATCCTCCACTGCAG
RT POMT2 forw	CAACCTGCACAATGCTTCCATC
RT POMT2 rev	CATCCGGAGGTTCTTCACAGTG
RT POMGnT1 for	CCCGCGTGTCTCAGCACTAC
RT POMGnT1 rev	AATCCACAGCAATGTCCAGGTC
RT Fukutin for	CCTATGGAAGAATGAGGAAGG
RT Fukutin rev	GGCCAGTTTGCAGATATAGTG
RT FKRP for	TCGTATGGGAGAAGGCGGTC
RT FKRP rev	GTGGTTGCTTTCGCTGTACTGC
RT Large 1for	AGAAATGCGAGACAATCCACG
RT Large 1 rev	TGCTCCGCAATGGAGTCAG
RT Large 2 for	GCTCCGAGCAGTGCTACAGAG
RT Large 2 rev	TCAGAAGATTGCCGTCATACTCC
RT POMT2 Exon 6 forw	ATTGCAGACCTTTGGTACCTGTTC

RT POMT2 Exon 6/7 rev	GTGTTTTCCCACAGTCACCAATG
RT gDNA FKRP forw	TCGTATGGGAGAAGGCGGTC
RT gDNA FKRP rev	GTGGTTGCTTTCGCTGTAAGTGC
RT gDNA POMT2 1 forw	GCGTTAGTCTTGCTGGTGCTTTAG
RT gDNA POMT2 1 rev	ACTGAGGTCTCCGAACAGGTACC
RT gDNA POMT2 2 forw	CTCTGTGTGCTGTAGTGACGGC
RT gDNA POMT2 2 rev	CGCATCATTCCAAGTACGATGC

2.2.11 Geräte:

Tabelle 16: Verwendete Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock ThermoStat	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Typ RFAX 1 DR	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
ABI PRISM 3700	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI PRISM 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.2.12 Programme/ Internetseiten:

Tabelle 17: Verwendete Programme und Internetseiten

Primer- Generierung	Marshall O.J., Parkville, Australia (2004) URL: http://perlprimer.sourceforge.net/ [Stand: 01.03.2008]
Alignment	European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK (2008) URL: http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html [Stand: 01.04.2008]
Reverse & Complement	Stothard P., Edmonton, Canada (2000) URL: http://www.ualberta.ca/~stothard/ javascript/rev_comp.html [Stand: 01.03.2008]
Referenz- Sequenzen	Bethesda MD., Rockville Pike, USA (2002) URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/ [Stand: 01.01.2009]

SNP- Referenz	National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, USA (2009). URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp [Stand:30.08.2012]
Mutations- Nomenklatur	Den Dunnen J.T. and Antonarakis S.E., Leiden, Niederlande (2000) URL: http://www.hgvs.org/mutnomen [Stand: 01.02.2009]
Real- Time PCR- Analyse	SDS 2.1 Software, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Befunde

Das Patientenkollektiv dieser Studie besteht aus fünf männlichen und fünf weiblichen unverwandten Patienten, welche in deutschen Kliniken in den Jahren 2001 bis 2007 behandelt wurden. Bei acht Patienten wurde klinisch die Diagnose eines Walker-Warburg Syndroms gestellt, bei zwei Patienten wurde eine Muskel-Eye-Brain Erkrankung diagnostiziert. Tabelle 2 bietet einen Überblick über die klinischen Befunde der Patienten.

Betrachtet man die klinischen, laborchemischen und radiologischen Befunde, zeigt sich bei sämtlichen Patienten die Kombination schwerer zerebraler Fehlbildungen, pathologischer ophthalmologischer Befunde, muskulärer Hypotonie und ihrer Folgeerkrankungen.

Die Eltern der Patienten 2, 3, 9 und 10 waren konsanguin. Drei der Mütter hatten vorangegangene Aborte. Die Eltern des dritten Patienten hatten ein weiteres schwer betroffenes Kind, welches im Alter von drei Tagen verstorben war. Vier der zehn sämtlich türkischstämmigen Patienten wurden spontan geboren, sechs kamen per Sectio zur Welt. Drei Patienten waren frühgeboren (Patient 3: 35. SSW, Patient 7: 36.SSW, Patient 10: 34. SSW).

Die postpartalen klinischen Untersuchungsbefunde der Patienten berichteten Makrozephalie, Mikrophthalmie, eine Hornhauttrübung, muskuläre Hypotonie und pathologische Apgar-Werte. Bei sieben WWS-Patienten war okzipital eine weiche Vorwölbung tastbar, welche sich MR-tomographisch als Enzephalozele darstellte.

Laborchemisch bestand bei den drei Frühgeborenen eine Hyperbilirubinämie sowie, soweit angegeben, in sämtlichen Fällen eine Hyper-CK-ämie als Zeichen der Muskeldystrophie. Die weiteren, z.T. sehr umfangreichen erhobenen Laborwerte waren initial unauffällig.

Tabelle 18: Übersicht über die klinischen Befunde der 10 Patienten

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Geschlecht	w	w	m	m	w	w	w	m	m	m
Mutation	POM T1	POM T2	-	-	-	-	-	-	POM GnT1	-
Phänotyp	WWS	WWS	WWS	WWS	WWS	WWS	WWS	WWS	MEB	MEB
Alter/ Erreichtes Alter	13M	7M	14 T	22 M	16 M	4 J	13 M	11 M	18M	4 M
Typ II Lissenzephalie	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++
Hydro- zephalus	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+
C. callosum- Hypoplasie	+++	+	++	N/A	+	+++	++	++	N/A	++
Zerebelläre Hypoplasie	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++
Enzephalozele	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Microph- thalmie	+	+	-	+	+	-	++	+	-	-
Kongenitaler Katarakt	N/A	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Muskuläre Hypotonie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CK (U/I)	3.170 (8T)	4.961 (10T)	2.937 (1T)	3.445 (4T)	2.207 (7M)	N/A	6.652 (10T)	11.48 9(6T)	631 (2M)	N/A
Weitere Befunde	SP HS	SP HS GS TI	SP R H	IC	HS TM	DW	DW DA VSD	DW ASD	SP R ASD	HS NO

Geschlecht: w: weiblich; m: männlich

Mutation: - : keine Mutation in den untersuchten Genen

Phänotyp: WWS: Walker-Warburg Syndrom; MEB: Muscle-Eye-Brain
Erkrankung

Alter/ Erreichtes Alter: T: Tage; M: Monate; J: Jahre

MRT/ Okuläre Befunde: - : keine ; +, ++, +++ : vorhanden / Schweregrad

Weitere Befunde: SP: Septum pellucidum-Agenesie; HS: Abgeflachter Hirnstamm;
DW: Dandy-Walker Malformation; ON: Atrophie des Nervus opticus; R: Retinale Dys-
plasie; IC: Iriskolobom; GS: Gaumenspalte; TM: Tracheomalazie; H: Hydronephrose,
DA: Persistierender Ductus arteriosus, ASD: Vorhofseptumdefekt; VSD: Ventrikel-
septumdefekt, TI: Trikuspidalklappeninsuffizienz

Die EEG-Befunde berichteten sämtlich epilepsietypische Potentiale und schwere Allgemeinveränderungen, z.T. ein intermittierendes Burst-Suppression-Muster. Die durchgeführten BERA-Untersuchungen zeigten pathologische Befunde, soweit näher beschrieben als Leitungsstörung im Pons/ Mittelhirnbereich.

MR-tomographisch zeigten sich in allen Fällen eine Typ II Lissenzephalie, als Agyrie oder Pachygyrie unterschiedlicher Ausprägung beschrieben, ein z.T. massiver Hydrozephalus internus, eine Kleinhirnhypoplasie und eine Balkenhypoplasie bis -agenesie (siehe Abbildungen 4 bis 6). Eine Agenesie des Septum pellucidum wurde bei vier, eine Dandy-Walker Malformation bei drei und eine okzipitale Enzephalozele bei sieben Patienten beschrieben.

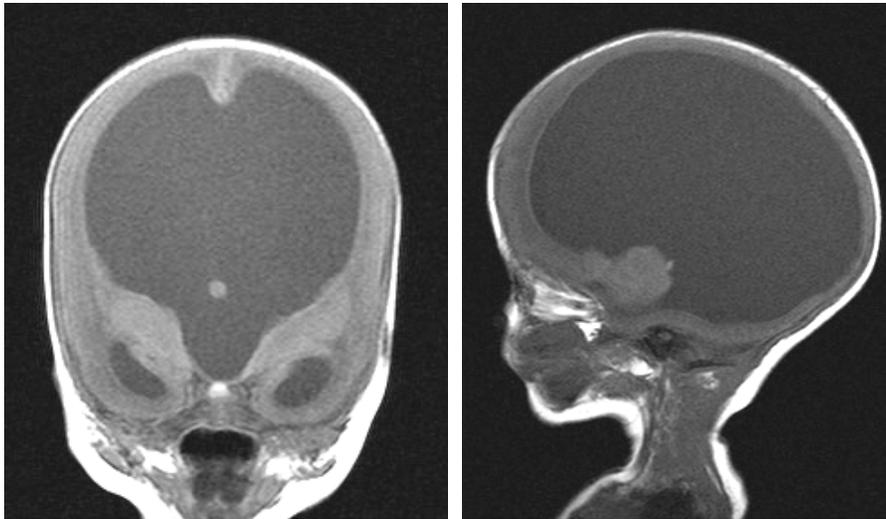


Abbildung 4: Zerebrales MRT von Patient 1:
Massiver Hydrozephalus, fehlendes Septum pellucidum

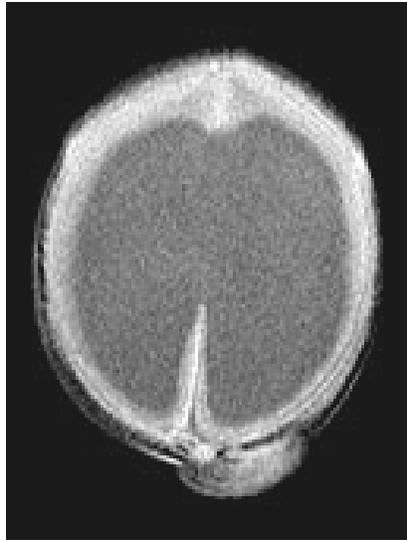


Abbildung 5: Zerebrales MRT von Patient 2:
Hydrozephalus, okzipitale Enzephalozele

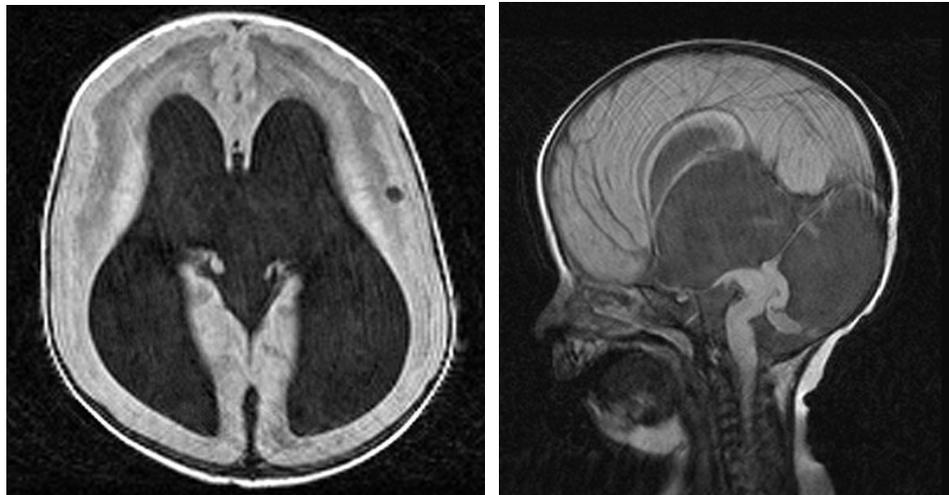


Abbildung 6: Zerebrales MRT von Patient 7:
Lissenzephalie, hypoplastischer Corpus callosum, Dandy-Walker Malformation,
Kinking des Hirnstamms

Bei Patient 3 erfolgte eine operative Entfernung und histologische Untersuchung der Enzephalozele. Der Befund beschreibt neben Haut, Hautanhangsgebilden und Fettgewebe Anteile von Leptomeningen und zentralnervösem Gewebe.

Bei allen zehn Patienten wurden pathologische ophthalmologische Befunde erhoben. Unter anderem wurden eine Mikrophthalmie bei sechs Patienten, ein kongenitaler Katarakt bei fünf Patienten, eine Retinadysplasie bei zwei Patienten, eine Atrophie des

Nervus opticus bei zwei Patienten und ein Iriskolobom bei einem Patienten beschrieben.

Die echokardiographischen Befunde waren unauffällig bis auf Vorhofseptumdefekte vom Sekundumtyp in zwei Fällen, einen kleinen muskulären ventrikulären Septumdefekt (VSD) in einem Fall, eine geringe Trikuspidalklappeninsuffizienz und einen persistierenden Ductus arteriosus in einem Fall.

Bei einzelnen Patienten wurden weitere pathologischen Befunde erhoben, welche nicht zu den charakteristischen Pathologien der α -Dystroglykanopathien zählen: eine submuköse Gaumenspalte (Patient 2), eine Tracheomalazie (Patient 5) und eine Hydronephrose (Patient 3).

Während der weiteren Überwachung fielen bei der Mehrzahl der Patienten intermittierende Bradykardien, eine respiratorische Insuffizienz und eine Trinkschwäche auf. Die vollständige oder ergänzende Ernährung über eine enterale Sonde war in den meisten Fällen, insbesondere bei den WWS-Patienten, notwendig.

Soweit bekannt, litten sämtliche Patienten an einer symptomatischen Epilepsie, z.T. mit Blitz-Nick-Salaam-Anfällen, und wurden antikonvulsiv behandelt. Außer bei Patient 3 erfolgte in allen Fällen die Anlage eines ventrikuloperitonealen Shunts zur Entlastung des Hydrozephalus. In einigen Fällen traten komplizierend Shuntinfektionen und Ventrikulitiden auf.

Die motorische Entwicklung der Patienten war deutlich eingeschränkt. Als maximale motorische Leistungen wurden bei den WWS-Patienten Spontanbewegung der Hände gegen die Schwerkraft (Patient 4) beschrieben, bei den beiden MEBD-Patienten Spontanbewegungen der Arme und Bein gegen die Schwerkraft und Kopfseitwenden (Patient 9).

Sieben der zehn Patienten verstarben während des Untersuchungszeitraums. Sie erreichten ein Alter von 2 Wochen bis 22 Monaten. Als Todesursachen wurden respiratorische Insuffizienz und rezidivierende Pneumonien genannt.

Drei der zehn Patienten des Untersuchungskollektivs befanden sich, den letzten vorliegenden Befunden zufolge, in einem klinisch stabilen Zustand. Das zuletzt angegebene Alter betrug 11 Monate bis 4 Jahre.

3.2 Genetische Befunde

3.2.1 Sequenzierung der Kandidatengene

Zur Untersuchung der bei den zehn Patienten zugrunde liegenden genetischen Defekte erfolgte zunächst die Sequenzierung der sechs Kandidatengene POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKR1P und LARGE auf cDNA-Ebene. Hierbei wurden in drei Fällen Mutationen von pathogenetischer Relevanz identifiziert.

3.2.2 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 1

Die Sequenzierung des POMT1-Gens von Patient 1 erbrachte die homozygote Nonsense-Mutation c.1540 C>T (p.R514X) (siehe Abbildung 7). Durch den Austausch des Cytosins durch Thymin entsteht anstelle der 514. von insgesamt 747 Aminosäuren ein vorzeitiges Stopp-Codon (englisch: premature termination codon, PTC). Als Folge der Mutation entfallen somit die 234 carboxy-terminalen Aminosäuren des POMT1-Proteins.

Die Eltern des Patienten trugen diese Mutation beide in heterozygoter Form. Yis et al. hatten die Mutation c.1540 C>T (p.R514X) zuvor bei einem ebenfalls türkischen WWS-Patienten beschrieben (Yis et al. 2007). Villanova et al. identifizierten diese hingegen kombiniert heterozygot mit der Mutation p.Q590H bei einem CMD-Patienten ohne Typ-II-Lissenzephalie (Villanova et al. 2000).

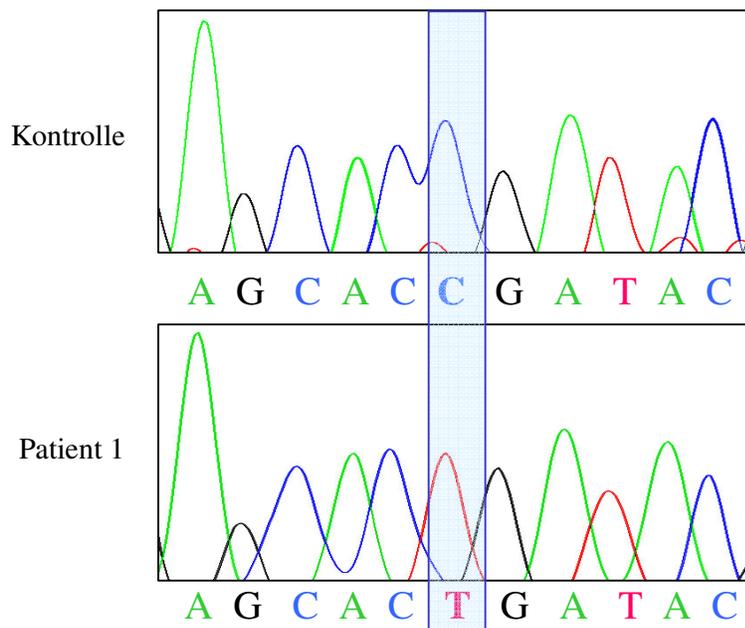


Abbildung 7: POMT1-Sequenzierung von Patient 1. Es besteht die homozygote Mutation c.1540 C >T (p.R514X)

3.2.3 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 2

Der molekulargenetische Befund des zweiten Patienten war ungleich komplexer und warf immer neue Fragen auf. Bei der zur Amplifikation des POMT2-Gens auf Transkriptebene durchgeführten PCR fielen zunächst verkürzte PCR-Produkte auf (siehe Abbildung 8), welche, wie sich bei der anschließenden Sequenzierung herausstellte, vorwiegend durch ein Skipping der Exone 3 bis 6 entstanden waren (siehe Abbildung 9).

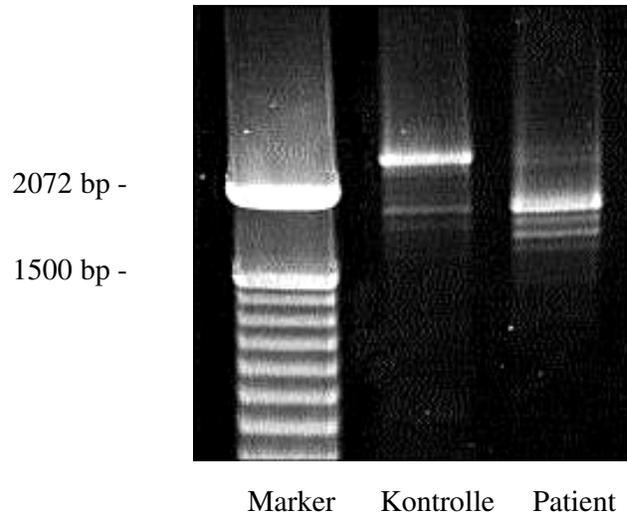


Abbildung 8: Ergebnis der POMT2-PCR. In der cDNA-Probe von Patient 2 fielen verkürzte PCR-Produkte auf. Die stärkste Bande der Patienten-Probe befand sich auf derselben Höhe wie eine schwache Bande bei der Kontrolle. Auf Höhe der Kontroll-POMT2-Bande zeigte sich in der Patienten-Probe hingegen nur ein schwaches Signal.

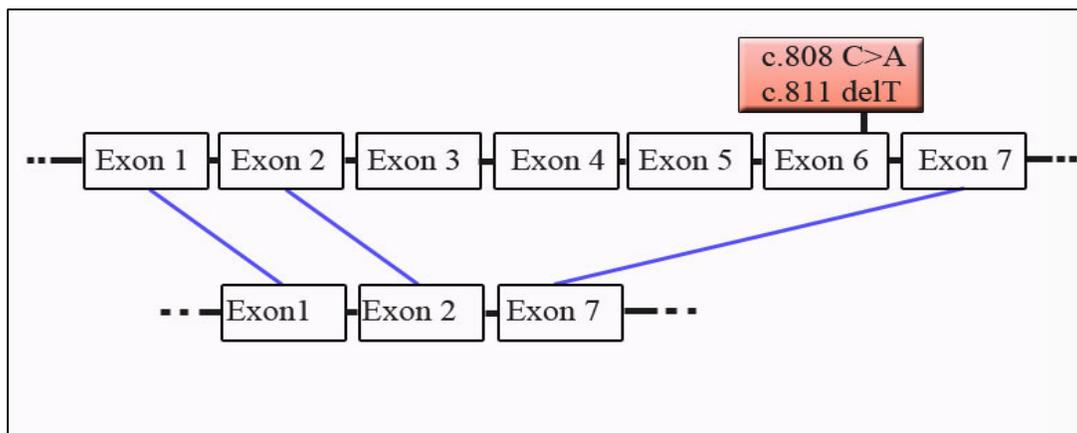


Abbildung 9: Schematische Darstellung des betroffenen mRNA-Abschnitts des POMT2- Gens bei Patient 2. Es fiel vorwiegend ein Skipping des Exone 3 bis 6 auf, durch welches die Mutation herausgeschnitten wurde.

Unter der Annahme, dass für diesen Befund eine Splice-Site-Mutation des POMT2-Gens ursächlich wäre, wurden die Exone 2 bis 6 und die flankierenden intronischen Regionen auf genomischer Ebene sequenziert. Die Sequenzen der Exone 2 bis 5 sowie ihre 3' und 5'-Splice-Sites waren dabei unauffällig. In Exon 6 des POMT2-Gens zeigten sich dann die homozygote Missens-Mutation c.808C>A (p.L270I) und die homozygote Frameshift-Mutation c.811delT (S271HfsX3), welche ein PTC generiert (siehe Abbildung 10).

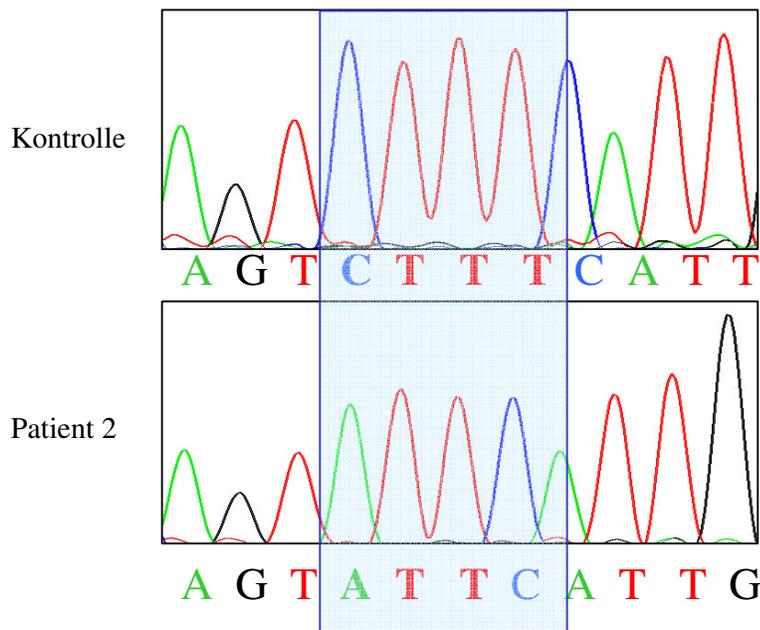


Abbildung 10: POMT2-Sequenzierung von Patient 2. Es besteht die homozygote Missens-Mutation c.808 C>A (p.L270I) und die Frameshift-Mutation c.811delT (S271fsX273).

3.2.4 Real-Time PCR zur Bestimmung des Exon 6-Skippings des POMT2-Gens

Zur weiteren Einordnung und Quantifizierung der mit den POMT2-Mutationen in Zusammenhang stehenden Splice-Varianten wurde eine Real-Time PCR entworfen, mittels derer einerseits die Gesamtexpression der POMT2, andererseits der Anteil der Transkripte, bei denen das sechste Exon geskippt wurde, bestimmt werden konnte. Für Ersteres wurden Primerpaare verwendet, welche über der von der Mutation nicht betroffenen Exongrenze 8/9 anlagerten, bei der zweiten Untersuchung lagerten die Primer über der Exongrenze 6/7 an.

Hiermit wurde festgestellt, dass die Gesamt-POMT2-Transkription bei dem Patienten nur ca. 50% der Kontrollwerte betrug. Splice-Varianten, welche das sechste Exon beinhalteten, waren in Fibroblasten des Patienten sogar auf unter 10% der Werte gesunder Kontrollen reduziert (siehe Abbildung 11).

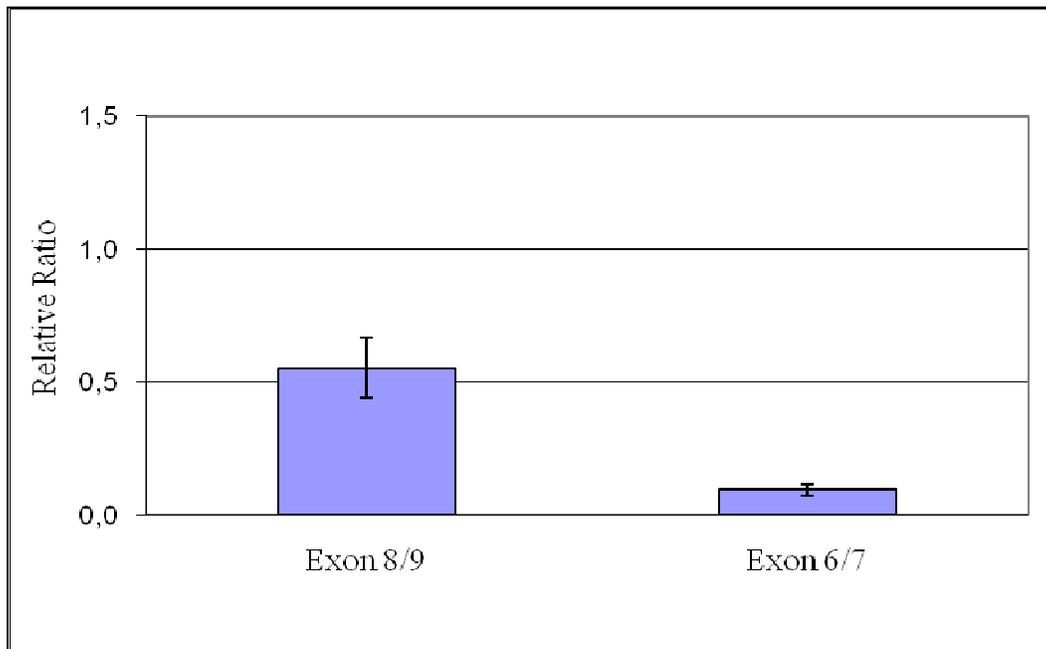


Abbildung 11: Relative Expressionswerte der Real-Time PCR von Patient 2. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. Die Gesamt- Expression des POMT2-Gens betrug bei dem Patienten $56 \pm 13\%$ des Wertes gesunder Kontrollen. Die Expression von Transkripten, welche das sechste Exon beinhalteten, war in den Patienten-Proben auf unter $10 \pm 2\%$ der Kontrollwerte reduziert.

3.2.5 Untersuchung zur Vererbung der POMT2-Mutationen

Die routinemäßig durchgeführte Sequenzierung des sechsten Exons des POMT2-Gens aus gDNA der Eltern des zweiten Patienten erbrachte eine Überraschung. Bei der Untersuchung der väterlichen DNA fanden sich sowohl die Missens-Mutation c.808C>A als auch die Frameshift-Mutation c.811delT in heterozygoter Form. Die mütterlichen Sequenzen ergaben jedoch mit einer vollständig regulären Basenfolge einen unerwarteten Befund (siehe Abbildung 12).

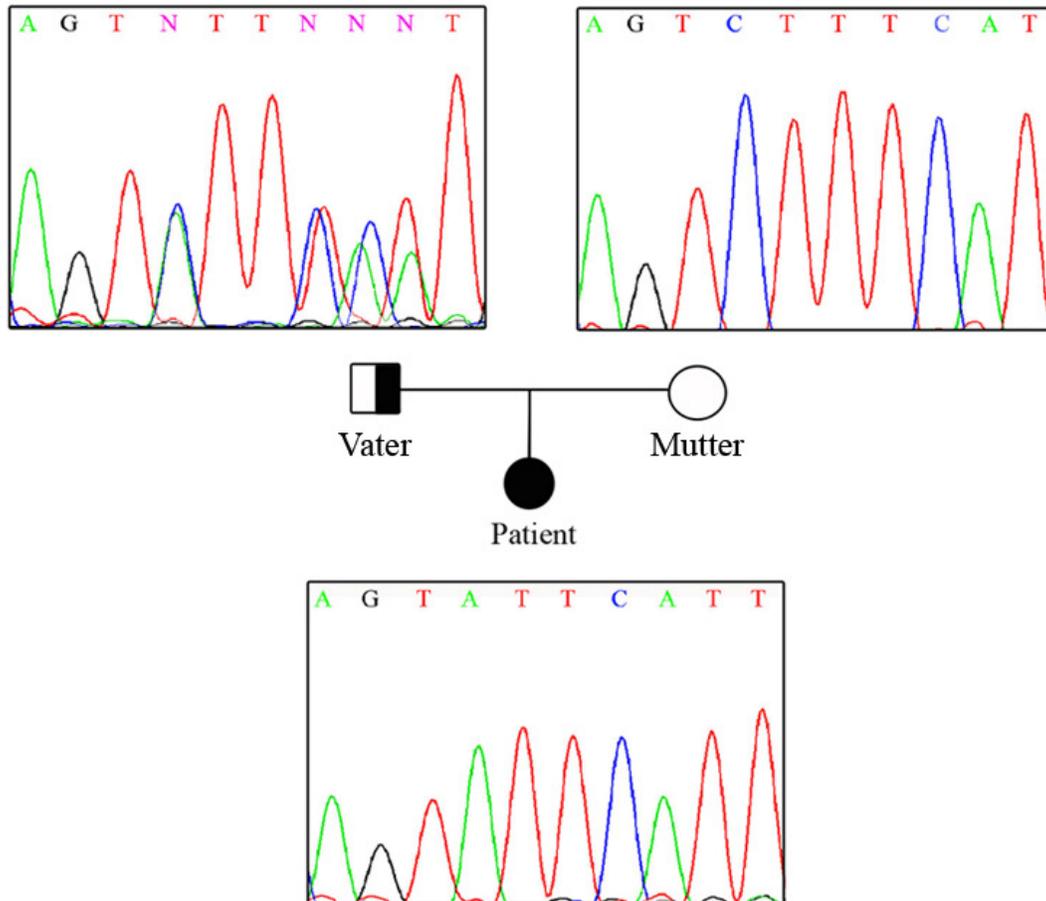
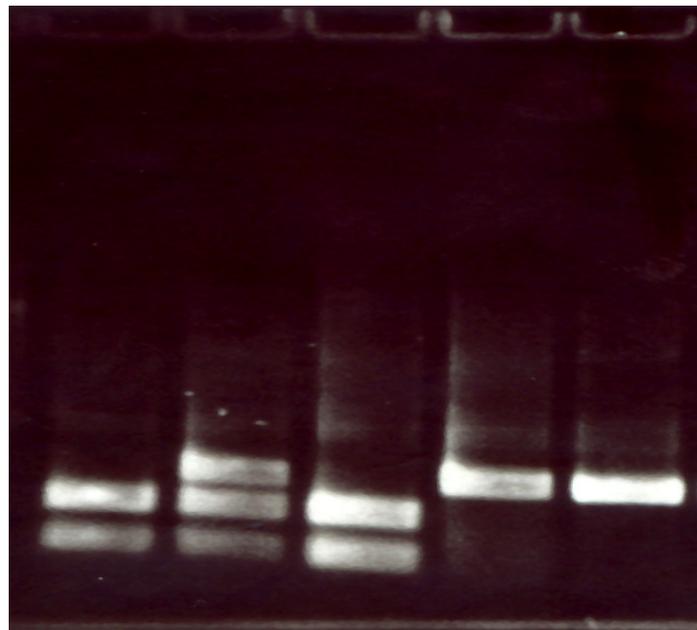


Abbildung 12: Stammbaum des zweiten Patienten und Sequenzierungs-Ergebnisse für die Mutation c.[808C>A; 811delT]. Bei der direkten Sequenzierung erschienen der Patient homozygot und der Vater heterozygot für die Mutation. Die Sequenzierung der mütterlichen gDNA ergab die Wildtyp-Sequenz.

Eine zunächst vermutete Proben-Verwechslung wurde durch Abnahme einer weiteren Blutprobe der Eltern und erneute Durchführung von PCR und Sequenzierung ausgeschlossen. Wäre es die väterliche Probe gewesen, bei der die POMT2-Mutation nicht gefunden werden konnte, hätte man schlicht vermuten können, dass dieser nicht der biologische Vater des Patienten sei, der unauffällige genetische Befund wurde jedoch aus den mütterlichen Proben erhoben.

3.2.6 Restriktionsanalyse

Ergänzend wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym PshAI durchgeführt, durch welches bei Vorliegen der regulären Basenfolge des betroffenen Genabschnitts ein Restriktionsschnitt erfolgt. Durch die POMT2- Mutationen c.[808C>A; 811delT] war die Schnittstelle des Enzyms derart verändert, dass die Restriktion nicht erfolgte (siehe Abbildung 13). Die Restriktionsanalyse bestätigte die Konstellation der genetischen Befunde in der Familie des Patienten.



Kontroll- Vater Mutter Patient Kontrolle
DNA ohne Enzym

Abbildung 13: PshAI-Restriktionsanalyse nach Durchführung einer PCR mit den Exon 6-Primern des POMT2-Gens. Das Enzym schneidet nicht bei Vorliegen der POMT2-Mutation, bei Vorliegen der Wildtyp-Sequenz entstehen zwei Bruchstücke. In der ersten Probe sieht man die beiden Abschnitte, die durch die vollständige Teilung der DNA gesunder Probanden entstehen. Die letzte Reihe zeigt die DNA-Stückgröße der PCR ohne Restriktionsschnitt. Die Patienten-DNA wird nicht geschnitten, da sie nicht die Wildtyp-Sequenz beinhaltet. Die mütterliche DNA wird vollständig geteilt, enthält somit nicht die von der Mutation betroffene Sequenz. Die väterliche Probe weist drei Banden auf: Die ungeschnittene DNA (das erste Allel trägt die Mutation) und die beiden Bruchstücke des Restriktionsschnittes (das zweite Allel trägt die Mutation nicht). Die Mutation liegt bei dem Vater somit in heterozygoter Form vor.

3.2.7 Quantitative Real-Time PCR zur Untersuchung der Hemizygotie der POMT2-Mutation c.[808C>A; 811delT]

Zur Erklärung der zunächst verwirrend wirkenden Konstellation propagierten wir ein hemizygoties Vorliegen des die Mutation tragenden Allels - wir vermuteten also, dass der betroffene DNA-Abschnitt auf dem zweiten Chromosom des Patienten und der Mutter nicht vorhanden ist.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Real-Time PCR zur relativen Quantifizierung der genomischen DNA dieses Abschnitts durchgeführt. Hierfür wurden zwei Primerpaaren verwendet, welche in Intron 5/6 bzw. Exon 6 des POMT2-Gens lokalisiert waren. Die Ergebnisse der PCRs wurden in Relation zu einem unabhängigen, auf einem anderen Chromosom liegendem Referenzgen gesetzt.

Die Delta-Ct-Berechnung ergab, dass bei dem zweiten Patienten die gDNA des untersuchten Basenabschnitt auf ca. 50% der Kontrollwerte reduziert war (siehe Abbildung 14). In einem nächsten Untersuchungsschritt mit gDNA der Eltern und der Großeltern mütterlicherseits wurde gezeigt, dass auch bei der Mutter sowie dem Großvater mütterlicherseits eine fünfzigprozentige Reduktion des PCR-Produktes und somit eine Deletion des entsprechenden DNA-Abschnitts auf einem Chromosom vorlag. Die Proben des Vaters und der Großmutter mütterlicherseits erbrachten unauffällige Befunde.

Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR bestätigten somit die Hypothese der Hemizygotie der POMT2-Mutationen bei dem Patienten. Es wurde deutlich, dass beide Mutationen, c.808C>A und c.811delT, auf einem Allel lagen und vom Vater vererbt wurden und das andere, von der Mutter vererbte Allel von einer genomische Deletion zumindest großer Teile des POMT2-Gens betroffen war.

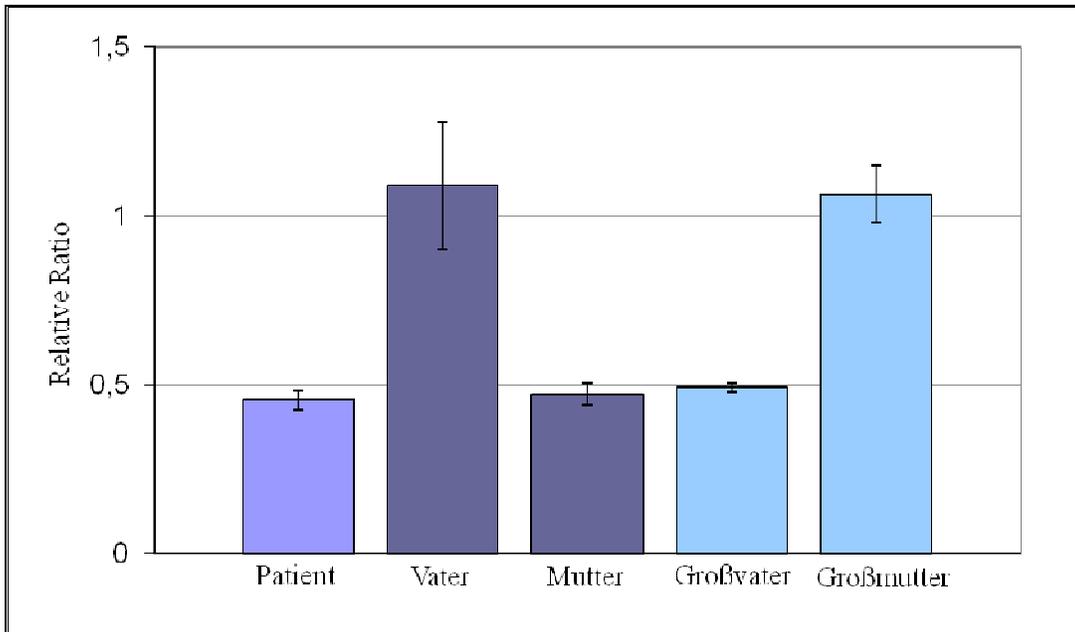
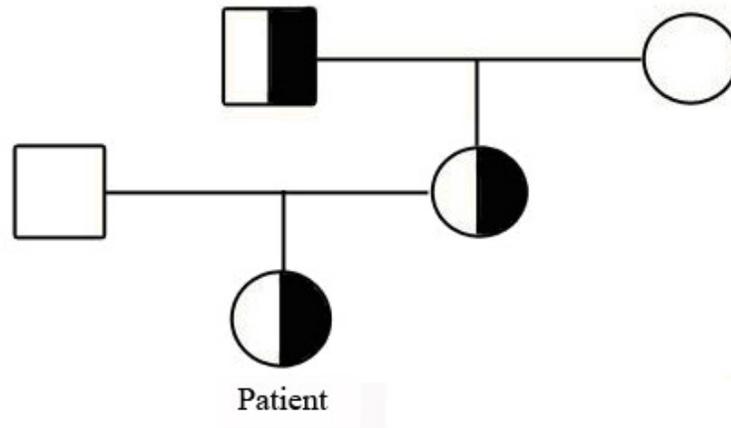


Abbildung 14: Stammbaum des zweiten Patienten und Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR des POMT2-Gens. Die ΔC_t -Verhältnisse des Patienten, der Mutter und des Großvaters mütterlicherseits zeigen mit einer fünfzigprozentigen Reduktion der gDNA eine Hemizygotie in dem untersuchten Abschnitt an. Der Vater und die Großmutter des Patienten haben mit einem Relative Ratio von 1 gleich viele PCR-Kopien wie die Kontrollpersonen.

3.2.8 Sequenzierungs-Ergebnis von Patient 9

Bei der Sequenzierung des POMGnT1-Gens aus cDNA des neunten Patienten, dessen klinisches Bild als Muscle-Eye-Brain Syndrom eingeordnet wurde, fiel ein Skipping des Exon 17 in sämtlichen untersuchten Transkripten auf, welches zu einer Verkürzung des PCR-Produktes um 123 Basenpaare führte (siehe Abbildungen 15 und 16).

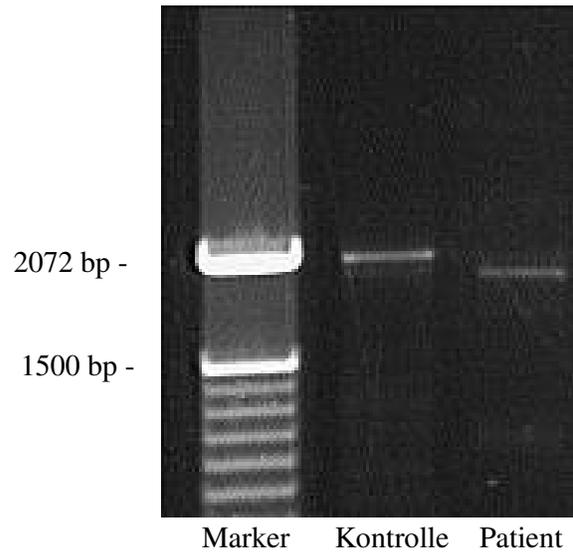


Abbildung 15: POMGnT1-PCR von Patient 9. Es fällt eine Verkürzung des PCR-Produktes auf, welche, wie sich bei der Sequenzierung herausstellte, durch ein Skipping des Exons 17 verursacht wurde.

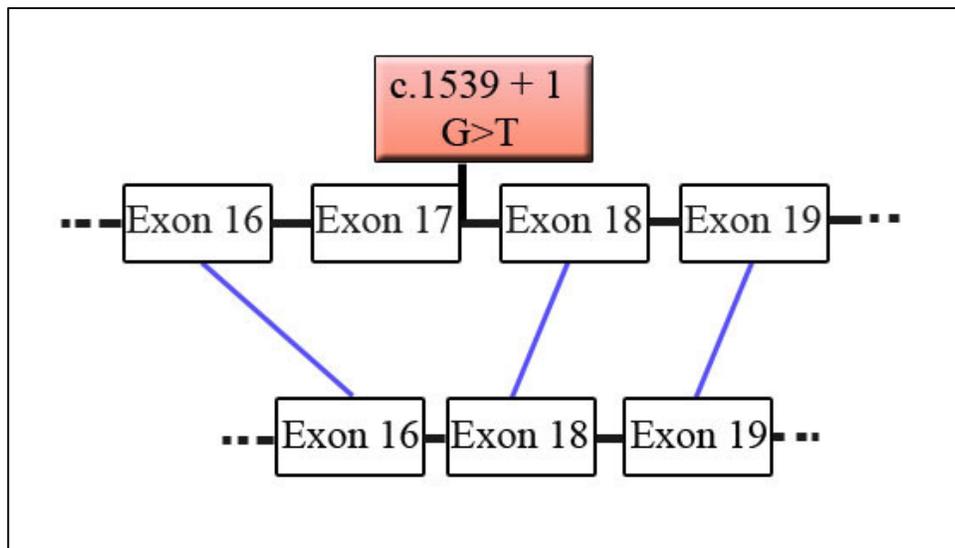


Abbildung 16: Schematische Darstellung des betroffenen mRNA-Abschnittes des POMGnT1-Gens bei Patient 9 mit dem auf cDNA-Ebene beobachteten Skipping des Exons 17.

Bei der Sequenzierung des 17. Exons und der flankierende intronischen Sequenz auf gDNA-Ebene zeigte sich die Mutation c.1539+1 G>T (siehe Abbildung 17), welche die konservierte Splicing-Donor-Sequenz der Exon 17-Intron 17/18-Grenze von der Basenfolge GT in TT verändert. Dieses führt zu einem Verlust der Konsensus-Splice-Site und dadurch zu einem in-frame Skippings des Exons 17, welches in einem Verlust der Aminosäuren 472 bis 513 der POMGnT1 resultiert. Bei beiden Eltern des Patienten wurde die Mutation in heterozygoter Konstellation festgestellt. Die Mutation c.1539+1 G>T wurde bereits bei Muscle-Eye-Brain Disease-Patienten beschrieben (Yoshida et al. 2001).

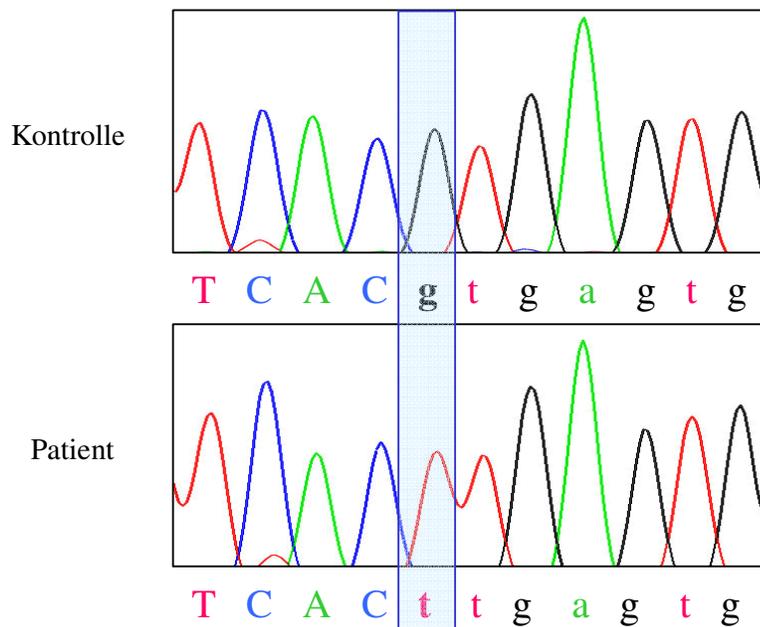


Abbildung 17: POMGnT1-Sequenzierung von Patient 9. Es besteht die homozygote Mutation c.1539+1 G>T der Donor-Splice-Site an der Exon 17-Intron 17/18-Grenze

3.2.9 Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs)

Bei den verbleibenden sieben Patienten wurden in den Sequenzen der Kandidatengene keine pathogenetisch relevanten Mutationen, jedoch mehrere Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) identifiziert (siehe Tabelle 3). SNPs sind genetische Varianten der Referenzsequenz, welche entweder keine Veränderung der Aminosäureabfolge bedingen (synonyme SNPs) oder zwar zur Veränderung einer Aminosäure führen (nicht-synonyme SNPs), aber auch im Erbgut gesunder Individuen gefunden werden.

Tabelle 19: Exonische SNPs der sechs Kandidatengene mit Angabe des Effektes auf Proteinebene, der Referenz und der Anzahl der Patienten, bei denen der SNP festgestellt wurde.

Gen	SNP	Effekt auf Proteinebene	Referenz	Anzahl der Patienten
POMT1	c.[1113 C>T] + [=]	p.(=)	NCBI- SNP rs3739494	1
POMT2	c.[1026 G>A] + [=]	p.(=)	Neuer SNP	1
	c.[1383 G>A] + [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs2270419	3
	c.[1383 G>A] + c.[1383 G>A]	p.(=)	NCBI-SNP rs2270419	7
	c.[1911 T>G]+ [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs3209079	2
	c.[1911 T>G] + c.[1911 T>G]	p.(=)	NCBI-SNP rs3209079	6
POMGnT1	c.[681 A>G] + [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs2292487	2
	c.[681 A>G] + c.[681 A>G]	p.(=)	NCBI-SNP rs2292487	2
Fukutin	c.[166 C>T] + [=]	p.(Arg56Cys)	NCBI-SNP rs41277797	1
	c.[608 G>A] + [=]	p.(Arg203Gln)	NCBI-SNP rs34787999	1
	c.[81026 C>A] + [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs17309806	1
FKRP	c.[135 C>T] + [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs2287717	2
LARGE	c.[435 C>T] + [=]	p.(=)	NCBI-SNP rs86487	2
	c.[435 C>T] + c.[435 C>T]	p.(=)	NCBI-SNP rs86487	1

3.2.10 Splice-Varianten

Außer den beiden bereits beschriebenen Splicing-Veränderungen wurden bei den zehn Patienten keine als pathologisch zu wertenden Auffälligkeiten des Splicings festgestellt. Es fielen jedoch sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen mehrere physiologische Splice-Varianten auf (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: In den Sequenzierungen der Patienten- und Kontrollproben identifizierte Splice-Varianten. Pro Patient bzw. Kontrollprobe und Gen wurden durchschnittlich fünf Transkripte sequenziert.

Gen / Splice-Variante	Anzahl der betroffenen Transkripte	Relativer Anteil der Variante an den insgesamt untersuchten Transkripten
POMT1		
Exon 2 und 3 vorhanden	39	0,54
Exon 2 -Skipping	10	0,14
Exon 3 -Skipping	2	0,03
Exons 2 und 3 -Skipping	21	0,29
Summe	72	1
POMT1		
Exon 8' vorhanden	16	0,22
Exon 8' -Skipping	56	0,78
Summe	72	1
POMGnT1		
Exon 8 vorhanden	6	0,9
Exon 8 -Skipping	61	0,1
Summe	67	1

Vor allem bei der Sequenzierung der POMT1-Transkripte zeigten sich verschiedene mRNAVarianten. Hier fiel insbesondere ein Skipping von Exon 2 und/ oder Exon 3 bei 45,8% der untersuchten Transkripte auf. Die Bedeutung dieser Varianten, welche das aktuell propagierte ATG-Initiations-Codon eliminieren und/ oder das offene Leseraster unterbrechen, ist bislang nicht vollständig erklärt. Erstmals beschrieben Jurado et al. diese Auffälligkeit und schlugen ein weiter stromabwärts gelegenes ATG als

alternatives Initiations-Codon vor, welches in der Generierung eines verkürztes Proteins resultiert (Jurado et al. 1999). Als weitere, auch von Jurado et al. vorbeschriebene häufige Variante der POMT1- Transkription fiel ein Skipping der ersten 66 Basenpaare des 8.Exons (auch als Exon 8' beschrieben) in 77, 8% der Transkripte auf. In unserem Fall war also die Variante, die das Exon 8' nicht beinhaltete, die häufigere, wobei über die funktionelle Bedeutung der übersprungenen 22 Aminosäuren bislang nichts bekannt ist. Bei der Sequenzierung der POMGnT1-Transkripte zeigte sich ein Skipping des achten Exons bei 9% der Transkripte, eine Splice-Variante, über deren Funktion ebenfalls bislang nichts Genaues bekannt ist.

3.2.11 Real-Time PCR zur Bestimmung der Expression der Zielgene

Als weiterer Schritt der Suche nach den molekulargenetischen Ursachen der α -Dystroglykanopathien führten wir Real-Time PCR-Experimente zur Quantifizierung der Expression der sechs Kandidatengene durch. Hierbei sollten einerseits Defekte der Regulation aufgedeckt, andererseits die Effekte der gefundenen Mutationen auf die Expression der sechs Gene analysiert werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der Real-Time PCRs zur Messung der Expression der Zielgene in Fibroblasten der Patienten in Relation zu gesunden Kontrollen ($\Delta\Delta C_t$ -Werte). Rot markiert sind die betroffenen Gene der Patienten, bei denen Mutationen nachgewiesen wurden. Expressionswerte, die mehr als 30% von denen der Kontrollen abweichen, sind beige hinterlegt.

	POMT1	POMT2	POMGnT1	Fukutin	FKRP	LARGE
Patient 1	0,12 \pm 0,03	1,43 \pm 0,22	0,96 \pm 0,13	1,25 \pm 0,34	0,86 \pm 0,13	1,50 \pm 0,49
Patient 2	0,94 \pm 0,27	0,56 \pm 0,12	0,90 \pm 0,20	0,84 \pm 0,29	0,72 \pm 0,16	1,21 \pm 0,33
Patient 3	0,74 \pm 0,18	0,98 \pm 0,19	0,77 \pm 0,16	1,24 \pm 0,45	0,57 \pm 0,12	1,09 \pm 0,30
Patient 5	1,03 \pm 0,23	1,05 \pm 0,16	0,99 \pm 0,16	1,20 \pm 0,38	0,87 \pm 0,14	0,99 \pm 0,31
Patient 6	0,78 \pm 0,21	1,06 \pm 0,21	0,91 \pm 0,17	1,16 \pm 0,33	0,99 \pm 0,19	0,90 \pm 0,30
Patient 7	1,04 \pm 0,23	1,00 \pm 0,15	1,13 \pm 0,17	1,43 \pm 0,40	0,84 \pm 0,13	1,42 \pm 0,39
Patient 8	0,69 \pm 0,28	0,69 \pm 0,25	0,47 \pm 0,18	0,60 \pm 0,31	0,92 \pm 0,34	0,63 \pm 0,23
Patient 9	0,81 \pm 0,21	1,10 \pm 0,20	0,58 \pm 0,11	1,23 \pm 0,39	0,72 \pm 0,19	1,75 \pm 0,55
Patient 10	1,04 \pm 0,22	1,51 \pm 0,20	1,13 \pm 0,14	1,50 \pm 0,40	0,92 \pm 0,12	1,18 \pm 0,34

Zunächst fiel auf, dass die Expression der drei Gene, welche Mutationen tragen, bei den betroffenen Patienten in allen drei Fällen reduziert war. Am Eindrücklichsten war hierbei der Wert der POMT1-Expression bei Patient 1, welcher eine Reduktion der Expression auf 12 % der Kontrollwerte anzeigte (siehe Abbildung 18). Dagegen war die POMT2-Expression bei diesem Patienten leicht erhöht.

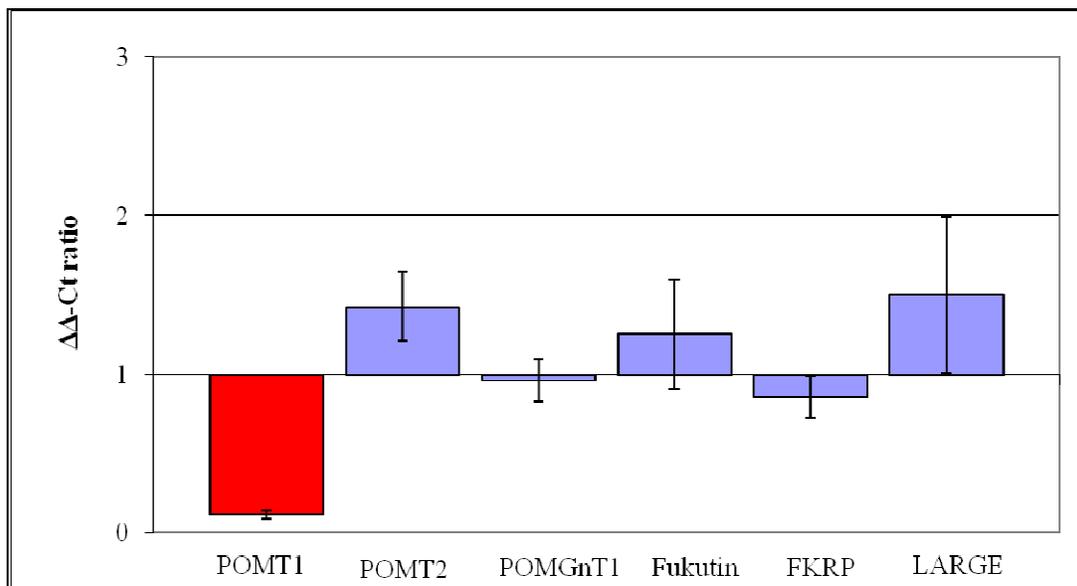


Abbildung 18: Expression der Kandidatengene in Fibroblasten des ersten Patienten in Relation zu den Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. Die POMT1-Transkription ist auf $0,12 \pm 0,03$ reduziert, die POMT2-Expression hingegen auf $1,43 \pm 0,22$ erhöht.

Die Real-Time PCR-Ergebnisse des zweiten Patienten zeigten, wie bereits in 3.2.4 bestimmt, eine Reduktion der POMT2- mRNA auf ca. die Hälfte der Kontrollwerte an (siehe Abbildung 19). Bei der Interpretation dieses Befundes muss jedoch die Deletion des betroffenen POMT2-Abschnittes auf einem Chromosom des Patienten berücksichtigt werden. Die Expressionswerte der weiteren Kandidatengene waren, bis auf eine leichte Reduktion der FKRP-Transkription, unauffällig.

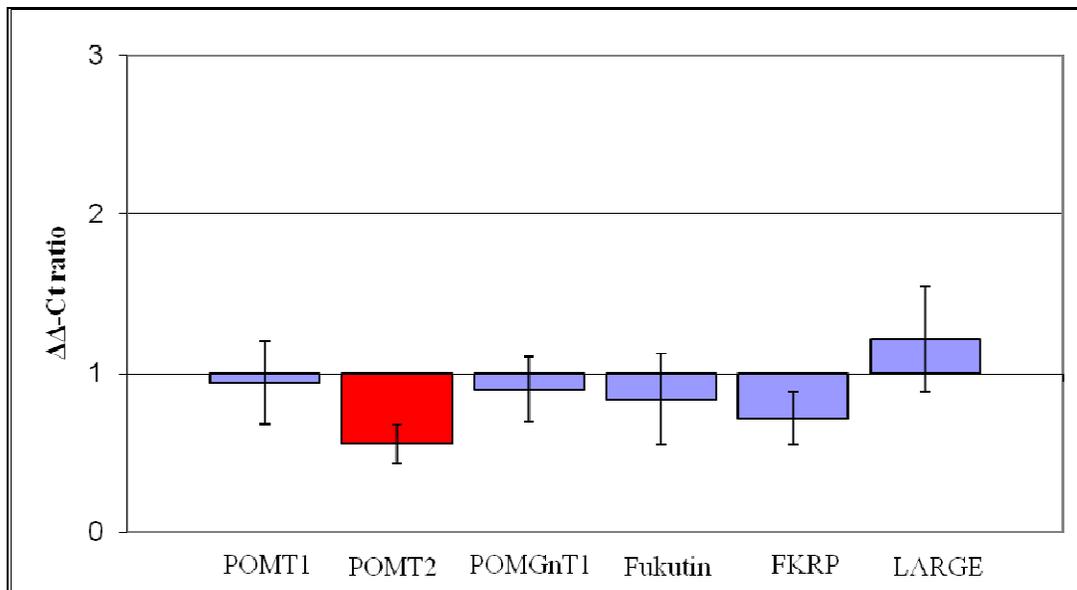


Abbildung 19: Expression der Kandidatengene in Fibroblasten des zweiten Patienten in Relation zu den Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. Die POMT2-Transkription ist auf $0,56 \pm 0,12$ reduziert.

In den Proben des Patienten, bei dem die POMGnT1-Splice-Site-Mutation vorlag, Patient 9, war die POMGnT1-Expression auf $58 \pm 11\%$ herabgesetzt und die LARGE-Expression um 55% der Kontrollwerte erhöht (siehe Abbildung 20).

Des Weiteren wurden bei drei der Patienten, bei denen keine Mutation festgestellt worden war, interessante Veränderungen der Expression der für die α -Dystroglykopathien relevanten Gene beobachtet. So fiel bei Patient 3 eine Reduktion der FKRP-Expression auf $57 \pm 12\%$ auf. Bei Patient 8 waren hingegen die Expressionswerte sämtlicher Kandidatengene außer FKRP herabgesetzt. Schließlich war die POMT2-Expression bei Patient 10 auf $151 \pm 20\%$ erhöht.

Insgesamt betrachtet waren die erhobenen Abweichungen der Expression der Kandidatengene gering. Abgesehen von den Werten der POMT1-Transkription des 1. Patienten über- bzw. unterschritt die Expression nicht eine Verdopplung bzw. eine Halbierung der Referenzwerte.

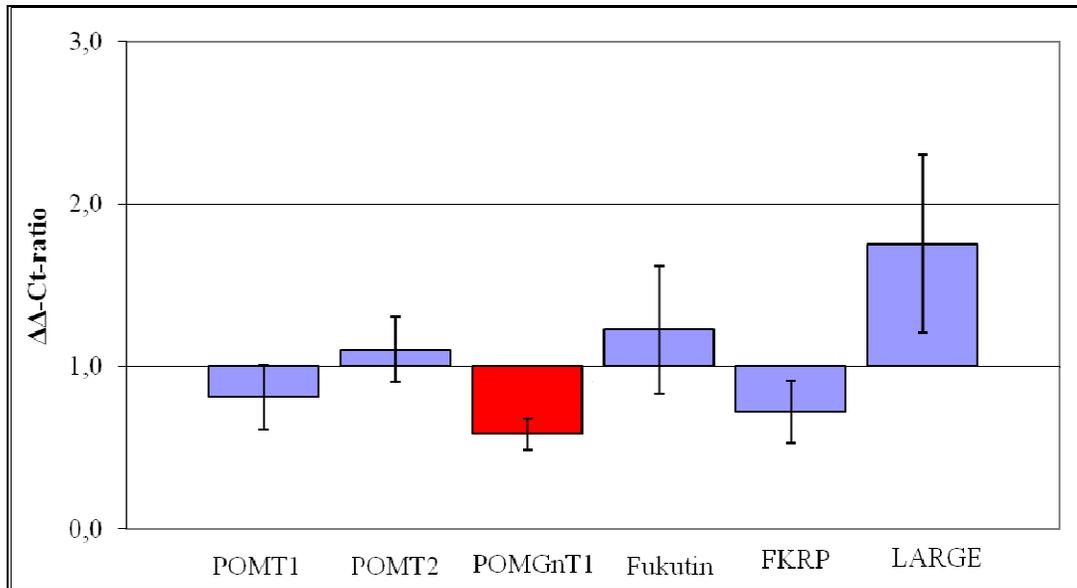


Abbildung 20: Expression der Kandidatengene in Fibroblasten des neunten Patienten in Relation zu den Kontrollen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen wieder. Die Expression des POMGnT1-Gens ist auf $0,58 \pm 0,11$ reduziert. Die LARGE-Expression ist auf $1,75 \pm 0,55$ erhöht.

4. Diskussion

4.1 Klinische Befunde

Die klinischen Befunde der zehn Patienten zeigen das Spektrum der schweren Formen der α -Dystroglykanopathien auf. Die Diagnosestellung eines WWS bzw. einer MEBD erfolgte nach den etablierten diagnostischen Kriterien (Cormand et al 2001, Dobyns et al 1989). Für die Diagnose einer MEBD werden hiernach eine CMD, cerebrale Malformationen einschließlich einer Typ-II-Lissencephalie und oculäre Veränderungen gefordert. Bei Vorliegen einer schweren CMD, Typ-II-Lissencephalie, cerebellären und retinalen Malformationen ist die Diagnose eines WWS zu stellen. Das Vorhandensein einer occipitalen Encephalocèle ist in diesem Rahmen ein hinreichendes, jedoch nicht notwendiges Kriterium für die Diagnose des WWS.

Die Kriterien CMD, Typ-II-Lissencephalie und oculären Malformationen werden von allen 10 Patienten unserer Studie erfüllt. Bei 7 Patienten bedingt allein die zusätzlich bestehende Encephalocèle die Diagnosestellung eines WWS. Bei den anderen 3 Patienten war insbesondere die Schwere der Typ-II-Lissencephalie und des Hydrocephalus ausschlagend für die diagnostische Einordnung. Auch die ophthalmologischen Befunde waren bei den WWS-Patienten ausgeprägter als bei den MEBD-Patienten. So lag z.B. bei 6 der WWS- und keinem der MEBD- Patienten eine Mikrophthalmie vor. Defekte des vorderen Augenabschnittes lagen ebenfalls bei 6 der WWS- und keinem der MEBD-Patienten vor.

Muskeldystrophie und Einschränkung der motorischen Entwicklung waren bei den WWS- Patienten besonders stark ausgeprägt. Die CK-Werte der WWS-Patienten lagen über dem des MEBD-Patienten $9 (4980 \pm 2799 \text{ U/I})$ versus 631 U/I), was auch pathophysiologisch einen höhergradigen Funktionsverlust der betroffenen Glykane bzw. Enzyms vermuten lässt. In Bezug auf das erreichte Lebensalter gab es in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen den WWS- und MEBD- Patienten ($16,3 \pm 12,6$ Monate versus $11 \pm 5,7$ Monate).

Auch wenn die oben genannten Diagnosekriterien formal eine eindeutige Zuordnung des Syndroms erlauben, hängt diese von der z.T. subjektiv zu treffenden Bestimmung des Schweregrades von Lissencephalie und Hydrozephalus ab.

4.2 Genetische Befunde

4.2.1 Sequenzierung der Kandidatengene

Die Sequenzierung der Zielgene POMT1, POMT2, POMGnT1, Fukutin, FKR1P und LARGE erbrachte bei drei Patienten, also bei 30% des untersuchten Kollektivs, pathogenetisch relevante Mutationen. Bei den restlichen sieben Patienten wurden weder Mutationen der kodierenden Sequenz noch Transkriptvarianten, die auf Mutationen vorhandener oder kryptischer Splice-Sites hinweisen, identifiziert.

Der Anteil auffälliger genetischer Befunde war somit geringer als in der Studie von Bouchet et al., die bei 54% von 47 untersuchten Föten mit Typ II Lissenzephalie einen genetischen Defekt identifizierten (Bouchet et al. 2007). Auch bei Godfrey et al. lag der Anteil positiver genetischer Befunde mit 60% der untersuchten WWS-Patienten und 47% der untersuchten MEBD-Patienten höher (Godfrey et al. 2007). Currier et al. hatten demgegenüber lediglich bei 2 von 30 WWS-Patienten (7%) eine pathogenetisch relevante Mutation identifizieren können (Currier et al. 2005). Die starke Schwankungsbreite der Prozentzahl positiver Befunde lässt sich am ehesten durch die regionalen Verteilungsmuster, z.B. lokale Häufungen bestimmter genetischer Defekte durch Founder-Mechanismen, erklären.

Zu berücksichtigen ist, dass unsere Studie durch die Sequenzierung auf cDNA-Ebene ein umfassenderes Mutationsscreening als die mittels gDNA-Sequenzierung erfolgten oben genannten Studien erlaubte.

4.2.2 Real-Time PCR-Experimente

Zur weiteren Erforschung der Rolle der sechs Kandidatengene in der Pathogenese der α -Dystroglykanopathien bestimmten wir ihre Genexpression mittels Real-Time PCR. Aufgrund der niedrigen Zahl beschriebener Mutationen in den Kandidatengenen hatten wir die Hypothese, dass Mutationen übersehen würden, die regulatorische Funktionen aufweisen. Da diese sowohl in der 3' als auch 5' UTR der Gene liegen konnten und auch trans- und cis-aktive regulatorische Elemente in der Intronsequenz von Genen beschrieben sind, führten wir Expressionsanalysen durch, da so alle regulatorischen Einflüsse auf die Genexpression unabhängig von der Lokalisation oder Ursache aufgedeckt würden. Außer der Verringerung der POMT1-Expression bei dem 1. Patienten, welche, wie später näher erläutert wird, wahrscheinlich auf einen sekundären Effekt zurückzuführen ist, konnten in unserem Patientenkollektiv keine Abweichungen

der Expression die eine krankheitsverursachende Wirkung annehmen ließen, festgestellt werden. Somit ließen sich Defekte von Promotorregionen und Transkriptionsfaktoren der Expression der sechs Gene als Erkrankungsursache bei den zehn Patienten weitestgehend ausschließen.

Geringe Veränderungen der Expression, wie sie bei drei der sieben Patienten ohne Mutationsnachweis festgestellt wurden (Reduktion der FKRP-Expression bei Patient 3, Erhöhung der POMT2-Expression bei Patient 10, Reduktion sämtlicher Kandidatengene bis auf FKRP bei Patient 8) sind am ehesten als sekundäre Effekte zu werten und lassen übergeordnete Regulationsmechanismen und möglicherweise kompensatorische Effekte der tatsächlich bei den Patienten vorliegenden Mutationen vermuten, die durch Mutationen in anderen, noch nicht der Erkrankungsgruppe zugeordneten Genen verursacht sein könnten.

Ein weiteres Ziel der Real-Time-PCR-Experimente war es, die Auswirkungen der vorliegenden Mutationen auf die Expression aller sechs Gene zu erfassen und hierdurch Rückschlüsse auf die Wechselbeziehungen innerhalb des O-Mannosylierungs-Stoffwechsels zu ziehen. Diesbezüglich wurden bei allen drei Patienten, bei denen Mutationen vorlagen, Veränderungen der Expressionswerte festgestellt - insbesondere stets eine Verringerung der mRNA des die Mutation beherbergenden Gens.

Im Folgenden wird auf Befunde der einzelnen Patienten näher eingegangen.

4.3 Befunde von Patient 1

Die Mutation c.1540 C>T (p.R514X) des POMT1-Genes, die bei Patient 1 in homozygoter Konstellation bestand, war bereits, ebenfalls homozygot, bei einem türkischen WWS-Patienten beschrieben worden (Yis et al. 2007). Bei diesem männlichen Patienten bestand, genau wie bei unserem Kasus, ein ausgeprägter Hydrozephalus, der eine ventrikuloperitoneale Shunt-Anlage notwendig machte, eine Typ II-Lissenzephalie und eine pontozerebelläre Hypoplasie. Interessant ist, dass bei dem von Yis et al. untersuchten Patienten im Gegensatz zu unserem Fall keine Enzephalozele bestand. Hieraus lässt sich schließen, dass die homozygote Mutation p.R514X zwar eine schwere neuronale Migrationsstörung, nicht jedoch in jedem Fall eine Enzephalozele bedingt. Der augenärztliche Befund des vorbeschriebenen Patienten berichtet einen beidseitigen kongenitalen Katarakt und eine rechtsseitige Retinaablösung. Ersteres lag ebenfalls bei unserem Patienten vor, bei dem zusätzlich auch eine Mikrophthalmie diagnostiziert wurde. Die homozygote Mutation p.R514 scheint somit verschiedene Fehlbildungen des vorderen und hinteren Augenabschnittes zu bedingen, die einerseits bei beiden Patienten vorlagen (Katarakt), andererseits nur bei einem der beiden Patienten ausgeprägt waren (Retinaablösung, Mikrophthalmie). Die Creatinkinase war bei dem von Yis et al. beschriebenen Patienten ebenfalls deutlich erhöht (1850 U/l) und es bestand eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie. Das Lebensalter des Patienten wurde nicht angegeben. Abschließend ergibt der Vergleich der klinischen und radiologischen Befunde der beiden Patienten ein sehr ähnliches Bild, wobei die Fehlbildungen bei dem von uns untersuchten Patienten etwas stärker ausgeprägt scheinen.

Villanova et al beschrieben die Nonsense-Mutation p.R514X kombiniert heterozygot mit der Missens-Mutation p.Q590H bei einem italienischen Patienten mit einem verhältnismäßig milden klinischen Bild (Villanova et al. 2000). Bei diesem Kind lag eine ausgeprägte Muskeldystrophie vor, die mit einer Hypertrophie der Wadenmuskulatur einherging. Es bestanden zwar eine Mikrozephalie und eine mentale Retardierung, MR-tomographisch ergaben sich jedoch keine Zeichen einer Typ II-Lissenzephalie. Der ophthalmologische Befund war unauffällig. Der Vergleich dieses Phänotyps mit den beiden Fällen der homozygoten p.R514X- Mutation lässt darauf rückschließen, dass die Missens-Mutation p.Q590H die Funktion der Glykosyltransferase weniger stark beeinträchtigt als die Mutation p.R514X. Dies

erscheint durchaus plausibel, da die von uns beschriebene Mutation zu einem Verlust der 234 carboxy-terminalen Aminosäuren des Proteins führt – im Gegensatz zu einem einzigen Aminosäuren-Austausch, der durch die Mutation p.Q590H bewirkt wird.

Wirft man einen Blick auf die Proteinstruktur der POMT1, die als Mitglied der evolutionär konservierten Familie der Protein-O-Mannosyltransferasen einem Aufbau aus 7 transmembranen Domänen und einer katalytischen, hydrophilen MIR-Domäne zwischen der fünften und sechsten Transmembran-Domäne folgt, wird deutlich, dass es durch das PTC zu einem Verlust der beiden carboxy-terminalen Transmembran-domänen kommt (siehe Abbildung 21) (Strahl-Bolsinger und Scheinost 1999). Die vermutlich katalytische, nach den Anfangsbuchstaben der drei Enzymgruppen, bei denen sie beschrieben wurde, den Mannosyltransferasen, den Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptoren und den Ryanodin-Rezeptoren, benannte MIR-Domäne, bleibt dabei erhalten. Es muss jedoch vermutet werden, dass durch den Verlust von fast einem Drittel des Proteins eine ausgeprägte Veränderung der Tertiärstruktur und ein weitgehender Verlust der Proteinfunktion bewirkt wird.

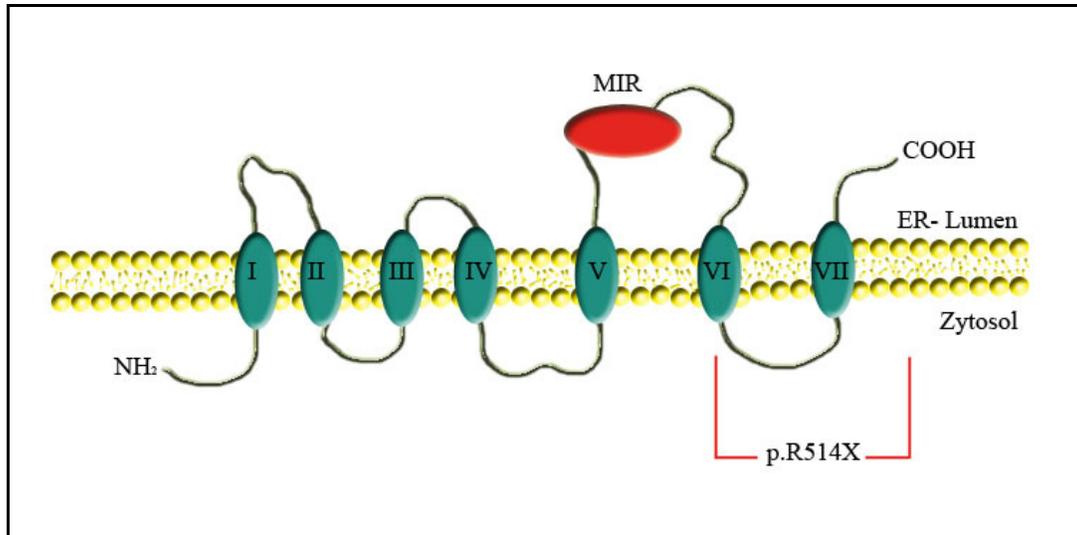


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der POMT1 mit Angabe der Lokalisation des Teils des Proteins, der durch das mutationsbedingte PTC p.R514X verloren geht (rote Klammer). Die Transmembran-Domänen sind von I bis VII durchnummeriert. Die vermutlich katalytische MIR-Domäne liegt zwischen den Transmembran-Domänen IV und V.

Die Real-Time PCRs aus Fibroblasten dieses Patienten erbrachten insbesondere aufgrund der deutlichen Reduktion der POMT1-Expression einen eindrücklichen Befund. Dieses Ergebnis lässt sich am besten durch den Einfluss des Nonsense-mediated mRNA-decay (NMD) erklären (Schell et al. 2002). Der Mechanismus des NMD bewirkt einen Abbau von mRNA, die ein PTC enthält, und verhindert hierdurch die Generierung von verkürzten, möglicherweise toxischen Proteinen. Die vorliegende Nonsense-Mutation erfüllt die Kriterien für den NMD-vermittelten mRNA-Abbau.

Bei den Real-Time PCRs zeigte sich zudem eine leichte Erhöhung der POMT2-Expression. Da POMT1 und POMT2 ein Heterodimer formen und da für die Glycosyltransferase-Aktivität die Koexpression beider Enzyme notwendig ist, ist zu vermuten, dass das beobachtete Expressionsmuster durch regulatorische, möglicherweise auch kompensatorische Mechanismen entstanden ist (Manya et al. 2004).

Für die Befunde des 1. Patienten ist zusammenfassend anzunehmen, dass das mutationsbedingte PTC einen deutlichen Funktionsdefekt der POMT1 mit der Folge einer ausgeprägten Hypoglykosylierung des α -Dystroglykans bewirkt und so zu dem schweren klinischen Bild von neuronaler Migrationsstörung und Muskeldystrophie des Patienten führt.

4.4 Befunde von Patient 2

Bei dem zweiten Patienten, bei dem ein schweres WWS bestand, lag die Kombination einer Missens-Mutation und einer Frameshift-Mutation: c.[808 C>A; c.811delT] p.(L270I;S271HfsX3) des POMT2-Gens vor, welche in der Generierung eines PTC resultiert. Die erstmals in dieser Studie beschriebene Sequenzveränderung ist möglicherweise durch einen Deletions-Insertions-Mechanismus entstanden, d.h. eine Deletion des Abschnittes „CTTT“ und eine Insertion von „ATT“. Lokalisiert ist sie, anders als die meisten bekannten POMT2-Mutationen, nahe dem N-Terminus.

Die Protein-O-Mannosyl-Transferase 2 (POMT2) formt ebenso wie die POMT1 eine helikale Struktur mit sieben Transmembran-Domänen. Auch für diese wird angenommen, dass eine MIR-Domäne in Form einer zentralen hydrophilen Schleife, die von fünf amino- und zwei carboxy-terminal gelegenen transmembranen Ketten flankiert wird, essentiell für die katalytische Funktion der Glykosyltransferase ist (Lommel et al 2008, Strahl-Bolsinger und Scheinost 1999, Willer et al. 2002). Durch das mutationsbedingte PTC wird das Protein amino-terminal der MIR-Domäne beschnitten, so dass davon auszugehen ist, dass das verkürzte Protein keine Glykosyltransferase-Aktivität mehr besitzt (siehe Abbildung 21). Bei der Analyse der POMT2-cDNA des Patienten zeigte sich jedoch vorwiegend ein Skipping der Exone 3 bis 6. Die ergänzend durchgeführten Real-Time PCRs ergaben, dass das die Mutation tragende Exon 6 bei über 80% der Transkripte herausgeschnitten wurde. Dieses alternative Splicing schneidet unter Beibehaltung des Leserahmens die Nonsense-Mutation heraus.

Das Überspringen der 4 Exone kann somit als Korrekturmechanismus interpretiert werden. Obwohl dem aus dem alternativen Splicing resultierende Protein Teile der amino-terminal gelegenen Transmembran-Domänen fehlen, ist die katalytische Domäne erhalten und eine residuale Enzym-Funktion theoretisch möglich.

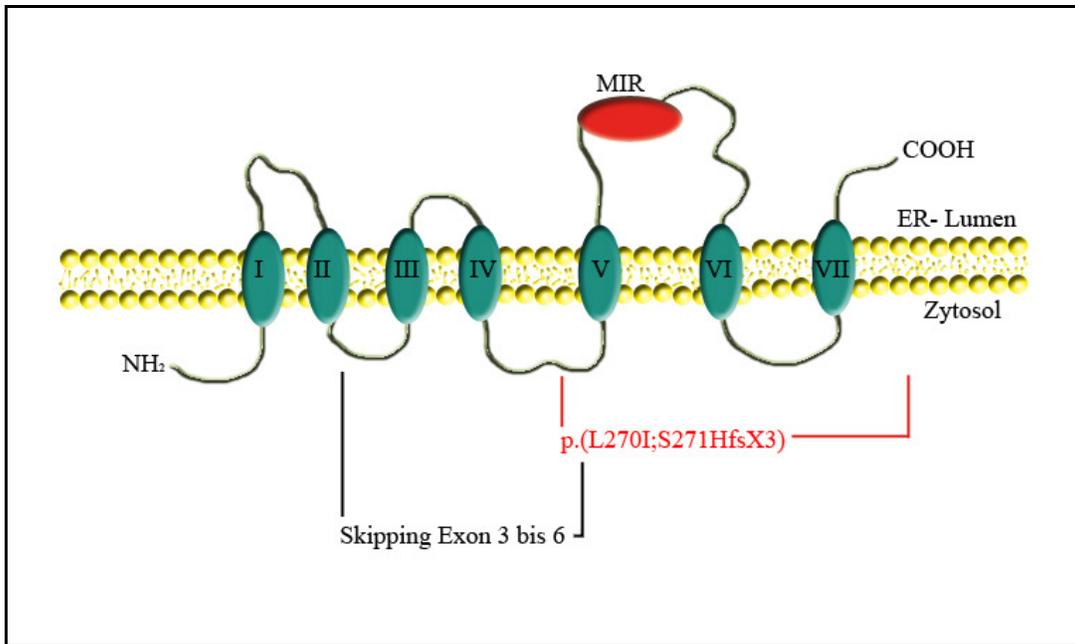


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der POMT2 mit Angabe der Lokalisation des Teils des Proteins, der durch das mutationsbedingte PTC verloren geht (rote Klammer) und dem Bereich, der durch das alternative Splicing geskippt wird (schwarze Klammer). Die Transmembran-Domänen sind von I bis VII durchnummeriert. Die vermutlich katalytische MIR-Domäne liegt carboxy-terminal der Mutation und wird als Folge des PTC abgeschnitten. Durch das Skipping der Exone 3 bis 6 wird die Mutation ausgeschnitten und die MIR-Domäne bleibt erhalten.

Durch welchen Mechanismus das Alternative Splicing-Muster hierbei entsteht, ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich. Weder eine Veränderung der bestehenden Consensus Splice-sites, noch die Generierung einer neuen Splice-site durch die Mutation konnte mittels des von Shapiro et al entwickelten Splice-scores festgestellt werden (Shapiro und Senapathy 1987). Anders geartete Einflüsse auf den Splicing-Mechanismus, wie z.B. die Generierung von Cis-acting exonic signals oder Veränderungen der Sekundärstruktur der pre-mRNA durch die Mutationen wurden jedoch nicht weiter geprüft (Buratti und Baralle 2004, Cooper und Mattox 1997).

Ebenso wie bei der Mutation des ersten Patienten sind auch in diesem Fall die Kriterien des NMDs erfüllt (Rehwinkel et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass NMD und/oder Nonsense-associated altered splicing, ein bislang nur wenig erforschter und letztlich nicht abschließend nachgewiesener Mechanismus des alternativen Splicings zur

Kompensation von Frameshift-Mutationen, die Herabregulation der langen, das PTC tragenden Transkripte bewirkt, während die Gesamt-POMT2-Expression und somit auch die Menge der verkürzten, PTC-freien Transkripte, erhöht wird (Liu et al. 2001, Wang et al. 2002).

Trotz der familiären Konsanguinität und der scheinbaren Homozygotie der Mutation c.[808 C>A; c.811delT] bei dem Patienten, konnten wir zeigen, dass die Sequenzveränderungen alleinig vom Vater vererbt wurden und aufgrund einer genomischen Deletion zumindest großer Teile des mütterlichen Allels in hemizygoter Konstellation vorlagen.

Die Real-Time PCRs zur Bestimmung der Expression der sechs Zielgene erbrachten bis auf die Halbierung der POMT2-Transkription normwertige Ergebnisse, insbesondere keine Hinweise auf eine kompensatorische Erhöhung der POMT1-Expression.

Der Vollständigkeit halber muss noch erwähnt werden, dass sowohl die Mutation c.[808 C>A; c.811delT] als auch die mütterliche Deletion in heterozygoter Form keine Erkrankung bedingt, da sowohl die Eltern als auch die Großeltern klinisch gesund sind. Die Kombination beider Genveränderungen bewirkt jedoch durch die ausgeprägte Einschränkung der POMT2-Funktion das bei dem Patienten vorliegende dramatische klinische Bild.

4.5 Befunde von Patient 9

Im Vergleich zu den beiden vorigen Patienten lag bei Patient 9 ein milderer Phänotyp vor, der als MEBD klassifiziert wurde. Die zugrunde liegende homozygote POMGnT1-Mutation c.1539+1 G>T, welche die konservierte GT-Donor-Splice-Site der Exon 17-Intron 17/18-Grenze betrifft und zu einem in-frame Skipping des 17. Exons führt, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben.

So wurde sie schon bei der ersten Veröffentlichung zur Genetik der MEBD bei zwei türkischen Patienten mit mittelschwerer Typ II-Lissenzephalie, Hydrozephalus, pontozerebellärer Hypoplasie, Fehlbildungen der vorderen Augenkammer und einer ausgeprägten Muskeldystrophie mit CK-Werten von 434 bzw. 42.271 U/l, somit einem mit unserem Patienten vergleichbaren klinischen Bild, geschildert (Yoshida et al. 2001). Mittels eines Enzymassays wurde die Aktivität des resultierenden Proteins in mit dem defekten POMGnT1-Gen transfizierten HEK293T-Zellen mit unter 1% der Wildtyp-Aktivität gemessen (Manya et al. 2003).

Taniguchi et al befassten sich eingehend mit der Genotyp-Phänotyp-Korrelation der über 23 bekannten POMGnT1-Mutationen und postulierten, dass Mutationen nahe des 5'-Terminus im Vergleich zu nahe dem 3'-Terminus gelegenen Mutationen relativ schwere, WWS-artige Symptome bedingen (Taniguchi et al. 2003). Für die Mutation c.1539+1 G>T beschreiben die Autoren mit einer mittleren Lage im Gen einen „klassischen“ MEBD-Phänotyp. Diesen et al bestätigten die oben genannte Genotyp-Phänotyp-Korrelation in ihrer Studie jedoch nicht (Diesen et al. 2004).

Die Protein O-Mannose-N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1) hat als Enzym des Golgi-Apparates einen anderen Aufbau als die beiden zuvor beschriebenen Enzyme POMT1 und POMT2. Computermodellen zufolge gliedert sich das aus 660 Aminosäuren bestehende Protein in einen amino-terminal gelegenen zytoplasmatischen Teil, eine Transmembran- und eine Stammdomäne. Die vermutlich katalytische UDP-GlcNAC- und Mn^{2+} -bindende Domäne umfasst die Aminosäuren 301 bis 530, woran sich carboxy-terminal eine Substratbindende Domäne anschließt (siehe Abbildung 23) (Taniguchi et al. 2003, Yoshida et al. 2001). Die durch das mutationsbedingte Skipping des 17.Exons bei Patient 9 entfallenden Aminosäuren 472 bis 513 liegen diesem Modell

zufolge innerhalb der katalytischen Domäne, sodass der weitgehende Verlust der POMGnT1- Enzymaktivität plausibel erscheint.

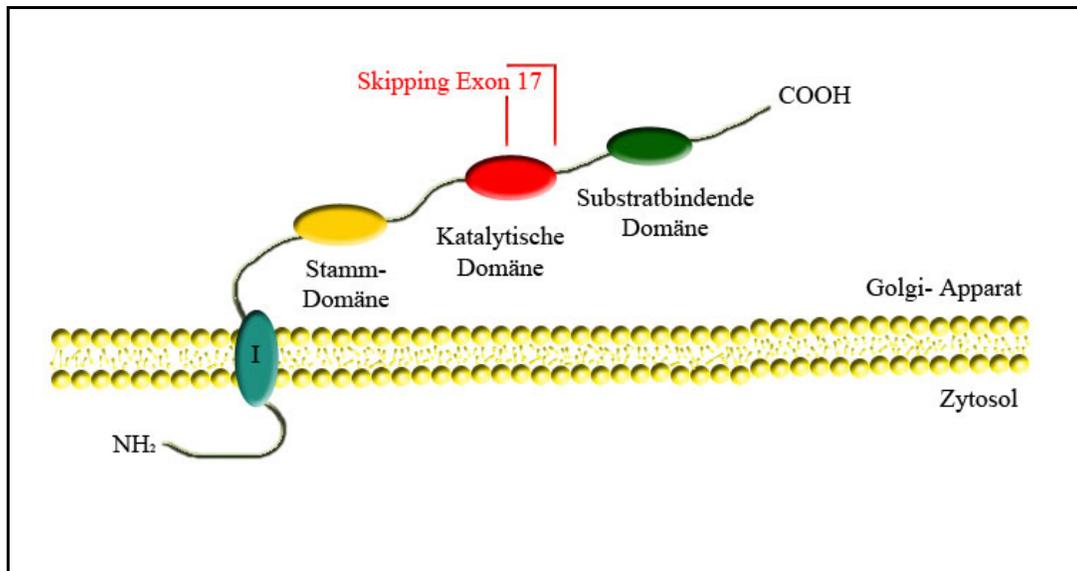


Abbildung 23: Schematischer Aufbau der POMGnT1 mit Angabe der Lokalisation des Teils des Proteins, der durch das mutationsbedingte Skipping des 17. Exons verloren geht. Die entfallenden Aminosäuren 472 bis 513 liegen innerhalb der katalytischen Domäne.

Die in der finnischen Population mit annähernd 99% häufigste POMGnT1-Founder-Mutation c.1539 + 1 G>A betrifft interessanterweise dasselbe Basenpaar wie die von uns beschriebene Mutation c.1539 + 1 G>T (Diesen et al. 2004). Anders als die G>T Mutation führt erstere zu einem read-through intronischer Sequenz, wodurch ein PTC generiert wird. Das klinische Bild der betroffenen Patienten ist mit dem der Mutation c.1539 + 1 G>T jedoch vergleichbar.

Die Real-Time PCR-Experimente zur Messung der Expression der sechs Kandidatengene ergaben bei Patient 9 eine Reduktion der POMGnT1-Transkription auf $58 \pm 11\%$ der Kontrollen. Da die verkürzte POMGnT1-mRNA nicht die Voraussetzungen für die Initiierung eines NMD erfüllt, kann die Herabregulation der Expression durch diesen Mechanismen nicht erklärt werden. Saredi et al bestimmten mittels Immunoblot bei 3 Patienten mit verschiedenen POMGnT1-Mutationen die POMGnT1-Protein-Expression im Muskel (Saredi et al. 2012). Bei einem Patienten war das Protein kaum nachweisbar, bei einem vermindert, beim dritten normwertig. Diese

Befunde korrelierten nicht mit der Schwere der Erkrankung und deuteten, wie in unserem Fall, auf bislang nicht erforschte, sekundäre bzw. regulatorische Mechanismen hin.

Bei unserem Patienten war die LARGE-Expression auf $1,75 \pm 0,55\%$ der Kontrollwerte erhöht. Barresi et al hatten bewiesen, dass eine Überexpression von LARGE die Glykosylierung von α -Dystroglykan in POMGnT1-defekten Fibroblasten wiederherstellt und schlugen daher für das LARGE-Protein eine regulatorische Funktion im O-Mannosylierungs-Stoffwechsel vor (Barresi et al. 2004). In diesem Kontext lässt sich die bei Patient 9 beobachtete Hochregulation von LARGE auch als Zeichen eines kompensatorischen Mechanismus werten.

In Zusammenschau der Befunde lässt sich das klinische Bild der Muscle-Eye-Brain Erkrankung des neunten Patienten auf den, durch das mutationsbedingte Skipping des 17.Exons bedingten, weitgehenden Verlust der Enzymaktivität der POMGnT1 zurückführen, wobei die klinische Ausprägung möglicherweise durch kompensatorische Mechanismen abgemildert wird.

4.6 Genotyp- Phänotyp-Korrelation

In unserem Patientenkollektiv waren POMT1- und POMT2-Mutationen mit dem klinischen Bild eines WWS, die POMGnT1- Mutation mit der MEBD assoziiert (siehe Abbildung 24). Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen losen Genotyp-Phänotyp- Korrelation der α -Dystroglykanopathien und es erscheint durchaus plausibel, dass Defekte des ersten Stoffwechselschrittes der O-Mannosylierung gravierendere Auswirkungen als Defekte des zweiten Syntheseschrittes haben (Endo 2004, Van Reeuwijk et al. 2005a).

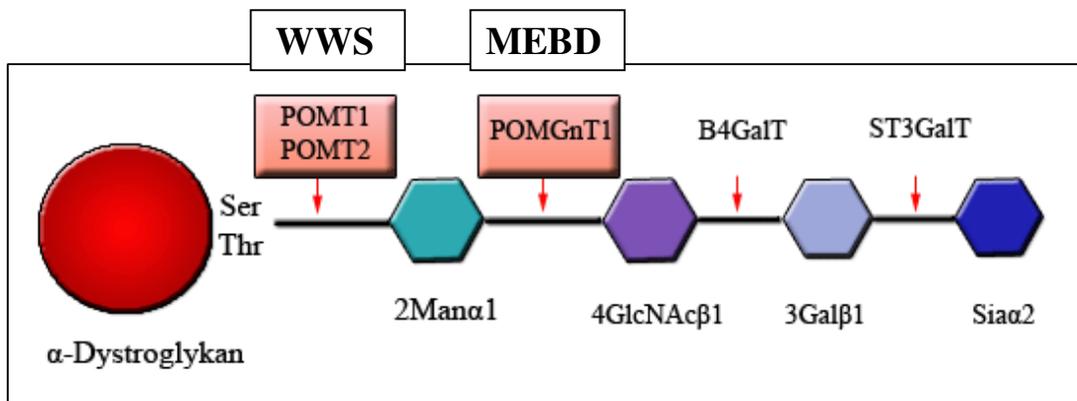


Abbildung 24: Grundstruktur der O- Mannose verknüpften Glykane mit Angabe der bei unseren Patienten identifizierten defekten Enzyme und Zuordnung zu den betreffenden klinischen Syndromen (modifiziert nach Beltran-Valero des Bernabe et al. 2002).

Je nach Art der Mutation und Auswirkung auf die Proteinstruktur sind jedoch für jedes der Kandidatengene von dieser Beziehung abweichende Konstellationen vorbeschrieben. So sind z.B. POMT1-Mutationen bekannt, die vermutlich eine Rest-Enzymaktivität zulassen und sehr milde, Gliedergürteldystrophie-artige Phänotypen ohne zerebrale Fehlbildungen bedingen (van Reeuwijk et al. 2006). Die klinischen Bilder der Patienten, bei denen bislang keine Mutation identifiziert werden konnte, sind dabei von denen der Patienten mit nachgewiesener Mutation nicht zu unterscheiden. Hieraus resultiert, dass die Unterteilung der α -Dystroglykanopathien in die jeweiligen Syndrome letztlich eine rein klinische Definition bleibt und die Abgrenzung der Krankheitsbilder nicht in jedem Fall möglich sein kann (Godfrey et al. 2007, van Reeuwijk et al. 2005a). Die verschiedenen Syndrome der α -Dystroglykanopathien sollten daher viel eher als Spektrum einer gemeinsamen molekulargenetischen Ursache verstanden werden, wobei die Ausprägung der Erkrankung von dem jeweils betroffenen

Gen, der Art der Mutation und der Auswirkung auf die Proteinfunktion abhängt. Auch die von Sparks und Ecsolar vorgeschlagene Klassifikation der muskulären Dystrophie- Dystroglykanopathien (MDDG) bietet keine für die klinische Anwendung befriedigende Lösung. Die Einteilung der klinischen Schweregrade erfolgt hier nur in äußerst groben Kategorien (kongenital mit Gehirn- und Augenfehlbildungen, kongenital mit mentaler Retardierung, Gliedergürtel-Typ) und für das Gros der Patienten ohne Mutationsnachweis bietet die Klassifikation keine Kategorie.

4.7 Zusammenschau und Ausblick

Die vorliegende Arbeit erbringt eine detaillierte Darstellung der klinischen und genetischen Befunde von zehn Patienten mit dem klinischen Bild eines Walker-Warburg Syndroms oder einer Muscle-Eye-Brain Erkrankung. Die Suche nach den molekulargenetischen Ursachen der Syndrome erfolgte auf mehreren Ebenen, die das Mutationsscreening auf Transkriptstufe, die Untersuchung von Splice-Varianten und die Messung der Expression der sechs Kandidatengene beinhalteten. Hierdurch wurde das übliche diagnostische Spektrum auf Defekte von Gentranskription und -expression erweitert. Bei drei Patienten des Studienkollektives wurde der zugrundeliegende Gendefekt identifiziert und seine Auswirkungen auf die Expression der Kandidatengene näher untersucht. Bei sieben Patienten des Studienkollektivs wurde weder eine pathogenetisch relevante Mutation, noch signifikante Auffälligkeiten der Transkriptsequenzen oder Hinweise auf regulatorische Mutationen gefunden. Anhand klinischer Kriterien ließen sich die drei Patienten, bei denen Mutationen nachgewiesen wurden, nicht von den restlichen sieben Patienten unterscheiden.

Insbesondere weil der zugrundeliegende Gendefekt vieler der am schwersten betroffenen Patienten bislang unbekannt ist, ist mit der weiteren Erforschung der molekularbiologische Grundlagen des O-Mannosylierungs-Stoffwechsels die Identifikation neuer Kandidatengene der α -Dystroglykanopathien von vorrangiger Bedeutung für die zukünftige Forschung. So muss man davon ausgehen, dass für die Synthese der O- Mannose- verknüpften Glykane wesentliche Proteine und Mechanismen bislang nicht bekannt sind. Zudem fehlen weiterhin genaue Kenntnisse über die Funktionen der Proteine Fukutin, FKRP, LARGE, ISPD, β 3GNT1, GTDC2, TMEM5 und 3GALNT2 und die Regulationsmechanismen innerhalb des O-Mannosylierungs-Stoffwechsels.

In diesem Kontext stellt die vorliegende Arbeit, insbesondere durch die detaillierte Analyse von Transkriptsequenzen und Genexpression sämtlicher zu Beginn der Studie bekannter Zielgene bei jedem der untersuchten Patienten, einen weiteren Baustein zum Verständnis der „orphan diseases“ Walker-Warburg Syndrom und Muscle-Eye-Brain Erkrankung dar.

5. Zusammenfassung

Das Walker-Warburg Syndrom (WWS) und die Muscle-Eye-Brain Erkrankung (MEBD) sind sehr seltene Erkrankungen aus der Gruppe der α -Dystroglykanopathien, bei denen der Aufbau der O-Mannose verknüpften Glykane am α -Dystroglykan gestört ist. Konsekutiv sind die neuronale Migration und die Integrität der Muskulatur gestört. Das klinische Bild der Patienten wird durch die Trias aus muskulärer Dystrophie, okulären und zerebralen Fehlbildungen bestimmt. Die Lebenserwartung der Patienten ist deutlich verkürzt. Bislang wurden bei den α -Dystroglykanopathien Mutationen in elf verschiedenen Genen beschrieben. Bei der Mehrzahl der WWS-Patienten ist der zugrunde liegende genetische Defekt jedoch bis heute nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit bietet eine detaillierte Untersuchung und Darstellung der klinischen und genetischen Befunde von zehn Patienten bei denen ein WWS oder eine MEBD diagnostiziert wurde. Hierfür erfolgte die Sequenzierung der Kandidatengene POMT1, POMT2, PomGnT1, Fukutin, FKR1P und LARGE auf cDNA-Ebene. Mittels Real-Time PCR wurde zudem die Expression der sechs Gene sowie das Auftreten bestimmter Splice-Varianten in Fibroblasten der Patienten analysiert.

Bei drei Patienten wurden Mutationen in den Kandidatengenen identifiziert: Bei jeweils einem Patienten eine homozygote Mutation der Gene der POMT1 (c.1540 C >T) und POMGnT1 (c.1539+1 G>T), sowie die Kombination der bislang nicht beschriebenen POMT2-Mutation c.[808 C>A, c.811delT] und einer genomischen Deletion des zweiten POMT2-Allels bei einem dritten Patienten. Bei sieben Patienten fanden sich in den untersuchten Genen keine Mutationen, wobei sich diese Patienten anhand klinischer Kriterien nicht von denen mit nachgewiesener Mutation unterscheiden ließen. Die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-Time PCR zeigte bei den drei beschriebenen Mutationen eine Verminderung der Expression des betroffenen Gens, im Falle der POMT1-Mutation zudem eine gesteigerte POMT2-Expression und im Falle der POMGnT1-Mutation eine Erhöhung der LARGE-Expression. Bei den übrigen sieben Patienten bestanden keine Hinweise auf Defekte von Promotoren oder Transkriptionsfaktoren. Mittels ergänzender Real-Time PCR-Experimente wurden die Auswirkungen der POMT2-Mutationen auf das Alternative Splicing charakterisiert sowie das Vorliegen der Hemizygotie der POMT2-Mutation bestätigt.

Dies ist die erste Studie, die neben der Sequenzanalyse auch die Expression und das Splicing der Kandidatengene der α -Dystroglykanopathien bestimmt und somit einen weiteren, neuen Baustein für ein besseres Verständnis der Regulation und Interaktion innerhalb des O-Mannosylierungs-Stoffwechsels darstellt.

6. Abkürzungsverzeichnis

β3GALNT2	β-1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase 2
β3GNT1	β-1-3-N-Acetylglucosaminyltransferase 1
CDG	Congenital disorders of glycosylation
cDNA	Complementary DNA
CK	Creatine kinase
CMD	Congenital muscular dystrophy
Ct	Cycle threshold
DAG1	Dystrophin-associated glycoprotein 1, Dystroglykan
DGC	Dystrophin- Glykoprotein- Komplex
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECM	Extracellular matrix
FKRP	Fukutin related protein
gDNA	Genomic desoxyribonucleic acid
GTDC2	Glycosyltransferase-like domaine-containing protein 2
ISPD	Isoprenoid synthase domain-containing gene
LGMD	Limb-girdle muscular dystrophy
MDC	Muscular dystrophy, congenital
MDDG	Muskuläre Dystrophie-Dystroglykanopathien mit Gehirn- und Augenfehlbildungen
MEBD	Muscle-Eye-Brain Disease
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NMD	Nonsense mediated decay
PCR	Polymerase chain reaction
POMGnT	Protein O-Mannose-N-Acetylglucosaminyltransferase
POMT	Protein-O-Mannosyltransferase
PTC	Premature termination codon
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcriptase
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
TMEM5	Transmembrane protein 5
UTR	Untranslated region
WWS	Walker-Warburg Syndrom

7. Literaturverzeichnis

1. Akasaka-Manyá K., Manyá H., Nakajima A., Kawakita M., Endo T. (2006) Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem.* 281(28): p. 19339-45.
2. Barresi R., Campbell K. P. (2006), Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* 119(Pt 2): p. 199-207.
3. Barresi R., Michele D. E., Kanagawa M., Harper H. A., Dovico S. A., Satz J. S., Moore S. A., Zhang W., Schachter H., Dumanski J. P., Cohn R. D., Nishino I., Campbell K. P. (2004) LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med.* 10(7): p. 696-703.
4. Beltran-Valero de Bernabe D., Currier S., Steinbrecher A., Celli J., van Beusekom E., van der Zwaag B., Kayserili H., Merlini L., Chitayat D., Dobyns W.B., Cormand B., Lehesjoki A. E., Cruces J., Voit T., Walsh C. A., van Bokhoven H., Brunner H. G. (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet.* 71(5): p. 1033-43.
5. Beltran-Valero de Bernabe DB., van Bokhoven H., van Beusekom E., Van den Akker W., Kant S., Dobyns W. B., Cormand B., Currier S., Hamel B., Talim B., Topaloglu H., Brunner H. G. (2003) A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet.* 40(11): p. 845-8.
6. Beltran-Valero de Bernabe D., Voit T., Longman C., Steinbrecher A., Straub V., Yuva Y., Herrmann R., Sperner J., Korenke C., Diesen C., Dobyns W. B., Brunner H. G., van Bokhoven H., Brockington M., Muntoni F. (2004) Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet.* 41(5): p. e61.
7. Bethesda MD. (2002) National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> [Stand: 01.01.2009]
8. Biancheri R., Falace A., Tessa A., Pedemonte M., Scapolan S., Cassandrini D., Aiello C., Rossi A., Broda P., Zara F., Santorelli F. M., Minetti C., Bruno C. (2007) POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(4): p. 1033-7.

9. Bouchet C., Gonzales M., Vuillaumier-Barrot S., Devisme L., Lebizec C., Alanio E., Bazin A., Bessieres-Grattagliano B., Bigi N., Blanchet P., Bonneau D., Bonnieres M., Carles D., Delahaye S., Fallet-Bianco C., Figarella-Branger D., Gaillard D., Gasser B., Guimiot F., Joubert M., Laurent N., Liprandi A., Loget P., Marcorelles P., Martinovic J., Menez F., Patrier S., Pelluard-Nehme F., Perez M.J., Rouleau-Dubois C., Triau S., Laquerriere A., Encha-Razavi F., Seta N. (2007) Molecular heterogeneity in fetal forms of type II lissencephaly. *Hum Mutat.* 28(10): p. 1020-7.
10. Brockington M., Blake D. J., Prandini P., Brown S. C., Torelli S., Benson M. A., Ponting C. P., Estournet B., Romero N. B., Mercuri E., Voit T., Sewry C. A., Guicheney P., Muntoni F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet.* 10(25): p. 2851-9.
11. Brockington M., Blake D. J., Brown S. C., Muntoni F. (2002) The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord.* 12(3): p. 233-4.
12. Buratti E., Baralle F.E. (2004) Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol.* 24(24): p. 10505-14.
13. Buysee K., Riemersma M., Powell G., van Reeuwijk J., Chitayat D., Roscioli T., Kamsteeg E.-J., van den Elzen C., van Beusekom E., Blaser S., Babul-Hirji R., Halliday W., Wright G., Derek L., Yung-Yao L., Lefebvre D.L., van Bokhoven H. (2013) Missense mutations in β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 22:p.1746–1754.
14. Clement E.M., Godfrey C., Tan J., Brockington M., Torelli S., Feng L., Brown S.C., Jimenez-Mallebrera C., Sewry C.A., Longman C., Mein R., Abbs S., Vajsar J., Schachter H., Muntoni F. (2008) Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol.* 65(1):137-41.
15. Cooper T.A., Mattox W. (1997) The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am J Hum Genet.* 61(2): p. 259-66.
16. Currier S. C., Lee C. K., Chang B. S., Bodell A. L., Pai G. S., Job L., Lagae L. G., Al-Gazali L. I., Eyaid W. M., Enns G., Dobyns W. B., Walsh C. A.

- (2005) Mutations in POMT1 are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet A*. 133(1): p. 53-7.
17. Devisme L., Bouchet C., Gonzalès M., Alanio E., Bazin A., Bessières B., Bigi N., Blanchet P., Bonneau D., Bonnières M., Bucourt M., Carles D., Clarisse B., Delahaye S., Fallet-Bianco C., Figarella-Branger D., Gaillard D., Gasser B., Delezoide A.L., Guimiot F., Joubert M., Laurent N., Laquerrière A., Liprandi A., Loget P., Marcorelles P., Martinovic J., Menez F., Patrier S., Pelluard F., Perez M.J., Rouleau C., Triau S., Attié-Bitach T., Vuillaumier-Barrot S., Seta N., Encha-Razavi F. (2012) Cobblestone lissencephaly: neuropathological subtypes and correlations with genes of dystroglycanopathies. *Brain*.135(Pt 2):469-82
 18. Diesen C., Saarinen A., Pihko H., Rosenlew C., Cormand B., Dobyns W. B., Dieguez J., Valanne L., Joensuu T., Lehesjoki A. E. (2004) POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet*. 41(10): p. e115.
 19. Dobyns W. B., Stratton R. F., Greenberg F. (1985) Syndromes with lissencephaly. II: Walker-Warburg and cerebro-oculo-muscular syndromes and a new syndrome with type II lissencephaly. *Am J Med Genet*. 22(1): p. 157-95.
 20. Dobyns W. B., Pagon R. A., Armstrong D., Curry C. J., Greenberg F., Grix A., Holmes L. B., Laxova R., Michels V. V., Robinow M.(1989) Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet*. 32(2): p. 195-210.
 21. Dobyns W.B., Truwit C.L. (1995) Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update. *Neuropediatrics*. 26(3): p. 132-47.
 22. Den Dunnen J.T., Antonarakis S.E. (2000) Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Human.Mutat*.15:7-12 URL: <http://www.hgvs.org/mutnomen> [Stand: 01.02.2009]
 23. Endo T. (2004) Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J*. 21(1-2): p. 3-7.
 24. Ervasti J.M., Campbell K.P. (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*. 122(4): p. 809-23.
 25. Fukuyama, Y., Kawazura, M., Haruna, H. (1960) A peculiar form of congenital muscular dystrophy in the history of medicine. report of fifteen cases. *Pediatr Univ Tokyo*. 4: p. 5-8.

26. Godfrey C., Clement E., Mein R., Brockington M., Smith J., Talim B., Straub V., Robb S., Quinlivan R., Feng L., Jimenez-Mallebrera C., Mercuri E., Manzur A. Y., Kinali M., Torelli S., Brown S. C., Sewry C. A., Bushby K., Topaloglu H., North K., Abbs S., Muntoni F. (2007) Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 130(Pt 10): p. 2725-35.
27. Griffin A. E., Cobb B. R., Anderson P. D., Claassen D. A., Helip-Wooley A., Huizing M., Gahl W. A. (2005) Detection of hemizygoty in Hermansky-Pudlak syndrome by quantitative real-time PCR. *Clin Genet*. 68(1): p. 23-30.
28. Holt K.H., Crosbie R.H., Venzke D.P., Campbell K.P. (2000) Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett*. 468(1): p. 79-83.
29. Jimenez-Mallebrera C., Torelli S., Brown S. C., Feng L., Brockington M., Sewry C. A., Beltran-Valero De Bernabe D., Muntoni F. (2003) Profound skeletal muscle depletion of alpha-dystroglycan in Walker-Warburg syndrome. *Eur J Paediatr Neurol*. 7(3): p. 129-37.
30. Jurado L.A., Coloma A., Cruces J. (1999) Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics*. 58(2): p. 171-80.
31. Kato R., Kawamura J., Sugawara H., Niikawa N., Matsumoto N. (2004) A rapid diagnostic method for a retrotransposal insertional mutation into the FCMD gene in Japanese patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet A*. 127(1): p. 54-7.
32. Kobayashi K., Nakahori Y., Miyake M., Matsumura K., Kondo-Iida E., Nomura Y., Segawa M., Yoshioka M., Saito K., Osawa M., Hamano K., Sakakihara Y., Nonaka I., Nakagome Y., Kanazawa I., Nakamura Y., Tokunaga K., Toda T. (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*. 394(6691): p. 388-92.
33. Liu H. X., Cartegni L., Zhang M. Q., Krainer A. R. (2001) A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet*. 27(1): p. 55-8.
34. Lommel M., Willer T., Strahl S. (2008) POMT2, a key enzyme in Walker-Warburg syndrome: somatic sPOMT2, but not testis-specific tPOMT2, is crucial for mannosyltransferase activity in vivo. *Glycobiology*. 18(8): p. 615-25.

35. Longman C., Brockington M., Torelli S., Jimenez-Mallebrera C., Kennedy C., Khalil N., Feng L., Saran R. K., Voit T., Merlini L., Sewry C. A., Brown S. C., Muntoni F. (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 12(21): p. 2853-61.
36. Manya H., Sakai K., Kobayashi K., Taniguchi K., Kawakita M., Toda T., Endo T. (2003) Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 306(1): p. 93-7.
37. Manya H., Chiba A., Yoshida A., Wang X., Chiba Y., Jigami Y., Margolis R. U., Endo T. (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(2): p. 500-5.
38. Manzini M.C., Tambunan D.E., Hill R.S., Yu T.M., Maynard T.M., Heinzen E.L., Shianna K.V., Stevens C.R., Partlow J.N., Barry B.J., Rodriguez J., Gupta V.A., Al-Qudah A.-K., Eyaid W.M., Friedman J.M., Salih M.A., Clark R., Moron I., Mora M., Beggs A.H., Gabriel S.B., Walsh C.A. (2012) Exome Sequencing and Functional Validation in Zebrafish Identify *GTDC2* Mutations as a Cause of Walker-Warburg Syndrome. *Am J Hum Genet.* 7; 91(3): p.541–547.
39. Marshall, O.J. (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 20(15): p. 2471-2. URL: <http://perlprimer.sourceforge.net/> [Stand: 01.03.2008]
40. Mercuri E., D'Amico A., Tessa A., Berardinelli A., Pane M., Messina S., van Reeuwijk J., Bertini E., Muntoni F., Santorelli F.M. (2006) POMT2 mutation in a patient with 'MEB-like' phenotype. *Neuromuscul Disord.* 16(7): p. 446-8.
41. Michele D. E., Barresi R., Kanagawa M., Saito F., Cohn R. D., Satz J. S., Dollar J., Nishino I., Kelley R. I., Somer H., Straub V., Mathews K. D., Moore S.A., Campbell K. P. (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature.* 418(6896): p. 417-22.
42. Moore S. A., Saito F., Chen J., Michele D. E., Henry M. D., Messing A., Cohn R. D., Ross-Barta S. E., Westra S., Williamson R. A., Hoshi T., Campbell K. P. (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature.* 418(6896): p. 422-5.

43. Mostacciuolo M.L., Miorin M., Martinello F., Angelini C., Perini P., Trevisan C.P. (1996) Genetic epidemiology of congenital muscular dystrophy in a sample from north-east Italy. *Hum Genet.* 97(3): p. 277-9.
44. Norio R., Löytönen M. (2002) The Finnish disease heritage. *Fennia* 180: 1–2, pp. 177–182.
45. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): p. e45.
46. Raducu M., Baets J., Fano O., Van Coster R., Cruces J.(2012) Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 2O. 1. *Eur J Hum Genet.* 20(9):945-52. 14.
47. Raitta C., Lamminen M., Santavuori P., Leisti J. (1978) Ophthalmological findings in a new syndrome with muscle, eye and brain involvement. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 56(3): p. 465-72.
48. van Reeuwijk J., Brunner H.G., van Bokhoven H. (2005) Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet.* 67(4): p. 281-9
49. van Reeuwijk J., Janssen M., van den Elzen C., Beltran-Valero de Bernabe D., Sabatelli P., Merlini L., Boon M., Scheffer H., Brockington M., Muntoni F., Huynen M. A., Verrips A., Walsh C. A., Barth P. G., Brunner H. G., van Bokhoven H. (2005) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet.* 42(12): p. 907
50. van Reeuwijk J., Maugenre S., van den Elzen C., Verrips A., Bertini E., Muntoni F., Merlini L., Scheffer H., Brunner H. G., Guicheney P., van Bokhoven H. (2006) The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat.* 27(5): p. 453-9.
51. van Reeuwijk J., Grewal P. K., Salih M. A., Beltran-Valero de Bernabe D., McLaughlan J. M., Michielse C. B., Herrmann R., Hewitt J. E., Steinbrecher A., Seidahmed M. Z., Shaheed M. M., Abomelha A., Brunner H. G., van Bokhoven H., Voit T. (2007) Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet.* 121(6): p. 685-90.
52. Rehwinkel J., Raes J., Izaurralde E. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci.* 31(11): p. 639-46.

53. Roscioli T., Kamsteeg E.J., Buysse K., Maystadt I., van Reeuwijk J., van den Elzen C., van Beusekom E., Riemersma M., Pfundt R., Vissers L.E., Schraders M., Altunoglu U., Buckley M.F., Brunner H.G., Grisart B., Zhou H., Veltman J.A., Gilissen C., Mancini G.M., Delrée P., Willemsen M.A., Ramadža D.P., Chitayat D., Bennett C., Sheridan E., Peeters E.A., Tan-Sindhunata G.M., de Smulders C.E., Devriendt K., Kayserili H., El-Hashash O.A., Stemple D.L., Lefeber D.J., Lin Y.Y., van Bokhoven H. (2012) Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Nat Genet.* 2012 May;44(5):581-5.
54. Sabatelli P., Columbaro M., Mura I., Capanni C., Lattanzi G., Maraldi N. M., Beltran-Valero de Barnabe D., van Bokoven H., Squarzone S., Merlini L. (2003) Extracellular matrix and nuclear abnormalities in skeletal muscle of a patient with Walker-Warburg syndrome caused by POMT1 mutation. *Biochim Biophys Acta.* 1638(1): p. 57-62.
55. Saredi S., Ardisson A., Ruggieri A., Mottarelli E., Farina L., Rinaldi R., Silvestri E., Gandioli C., D'Arrigo S., Salerno F., Morandi L., Grammatico P., Pantaleoni C., Moroni I., Mora M. (2012) Novel POMGNT1 point mutations and intragenic rearrangements associated with muscle-eye-brain disease. *J Neurol Sci.* 15;318(1-2):45-50.
56. Schachter H., Vajsar J., Zhang W. (2004) The role of defective glycosylation in congenital muscular dystrophy. *Glycoconj J.* 20(5): p. 291-300.
57. Schell T., Kulozik A.E., Hentze M.W. (2002) Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biol.* 3(3): p. REVIEWS1006.
58. Sciandra F., Gawlik K. I., Brancaccio A., Durbejj M. (2007) Dystroglycan: a possible mediator for reducing congenital muscular dystrophy? *Trends Biotechnol.* 25(6):p.262-8.
59. Shapiro M.B., Senapathy P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 15(17): p. 7155-74.
60. Sparks S.E., Escolar D.M. (2011) Congenital muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol.* 101: p. 47-79.

61. Spiro R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 12(4): p. 43R-56R.
62. Stevens E., Carss K.J., Cirak S., Foley A.R., Torelli S., Willer T., Tambunan D.E., Yau S., Brodd L., Sewry C.A., Feng L., Haliloglu G., Orhan D., Dobyns W.B., Enns G.M., Manning M., Krause A., Salih M.A., Walsh C.A., Hurles M., Campbell K.P., Manzini M.C., UK10K Consortium, Stemple D., Lin Y.-Y., Muntoni F. (2013) Mutations in *B3GALNT2* Cause Congenital Muscular Dystrophy and Hypoglycosylation of α -Dystroglycan. *Am J Hum Genet*. 92(3): 354–365.
63. Stothard P. (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104. URL: http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/rev_comp.html [Stand: 01.03.2008]
64. Strahl-Bolsinger S., Scheinost A. (1999) Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem*. 274(13): p. 9068-75.
65. Sunada Y., Campbell K.P. (1995) Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr Opin Neurol*. 8(5): p. 379-84.
66. Taniguchi K., Kobayashi K., Saito K., Yamanouchi H., Ohnuma A., Hayashi Y. K., Manya H., Jin D. K., Lee M., Parano E., Falsaperla R., Pavone P., Van Coster R., Talim B., Steinbrecher A., Straub V., Nishino I., Topaloglu H., Voit T., Endo T., Toda T. (2003) Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet*. 12(5): p. 527-34.
67. Vajsar J., Ackerley C., Chitayat D., Becker L. E. (2000) Basal lamina abnormality in the skeletal muscle of Walker-Warburg syndrome. *Pediatr Neurol*. 22(2): p. 139-43.
68. Varki A.C.R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J., *Essentials of Glycobiology*, 1999.
69. Villanova M., Mercuri E., Bertini E., Sabatelli P., Morandi L., Mora M., Sewry C., Brockington M., Brown S. C., Ferreira A., Maraldi N. M., Toda T., Guicheney P., Merlini L., Muntoni F.(2000) Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in

- three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord.* 10(8): p. 541-7.
70. Vuillaumier-Barrot S., Bouchet-Seraphin C., Chelbi M., Eude-Caye A., Charluteau E., Besson C., Quentin S., Devisme L., Le Bizec C., Landrieu P., Goldenberg A., Maincent K., Loget P., Boute O., Gilbert-Dussardier B., Encha-Razavi F., Gonzales M., Grandchamp B., Seta N. (2011) Intragenic rearrangements in *LARGE* and *POMGNT1* genes in severe dystroglycanopathies. *Neuromuscul Disord.* 21(11):782-90.
 71. Vuillaumier-Barrot S., Bouchet-S raphin C., Chelbi M., Devisme L., Quentin S., Gazal S., Laquerri re A., Fallet-Bianco C., Loget P., Odent S., Carles D., Bazin A., Aziza J., Clemenson A., Guimiot F., Bonni re M., Monnot S., Bole-Feysot C., Bernard J.-P., Loeuillet L., Gonzales M., Socha K., Grandchamp B., Atti -Bitach T., Encha-Razavi F., Seta N. (2012) Identification of Mutations in *TMEM5* and *ISPD* as a Cause of Severe Cobblestone Lissencephaly. *Am J Hum Genet.* 91(6): p.1135–1143
 72. Wang J., Chang Y. F., Hamilton J. I., Wilkinson M. F. (2002) Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell.* 10(4): p. 951-7.
 73. Wilke K., Duman B., Horst J. (2000) Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat* 16(5): p. 431-6.
 74. Willer T., Amselgruber W., Deutzmann R., Strahl S. (2002) Characterization of *POMT2*, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology.* 12(11): p. 771-83.
 75. Willer T., Lee H., Lommel M., Yoshida-Moriguchi T., de Bernabe D.B., Venzke D., Cirak S., Schachter H., Vajsar J., Voit T., Muntoni F., Loder A.S., Dobyns W.B., Winder T.L., Strahl S., Mathews K.D., Nelson S.F., Moore S.A., Campbell K.P.(2012) *ISPD* loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet.*;44(5):575-80.
 76. Yis U., Uyanik G., Kurul S., Dirik E., Ozer E., Gross C., Hehr U. (2007) A case of Walker-Warburg syndrome resulting from a homozygous *POMT1* mutation. *Eur J Paediatr Neurol.* 11(1): p. 46-9.

77. Yoshida A., Kobayashi K., Manya H., Taniguchi K., Kano H., Mizuno M., Inazu T., Mitsuhashi H., Takahashi S., Takeuchi M., Herrmann R., Straub V., Talim B., Voit T., Topaloglu H., Toda T., Endo T. (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell.* 1(5): p. 717-24.
78. Yuji Hara Y., Balci-Hayta B., Yoshida-Moriguchi T., Kanagawa M., Beltrán-Valero de Bernabé D., Gündeşli H., Willer T., Satz J.S., Crawford R.W., Burden S.J., Kunz S., Oldstone M.B., Accardi A., Talim B., Muntoni F., Topaloğlu H., Dinçer P., Campbell K.P. (2011) A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 364(10):939-46.
79. Xiong H., Kobayashi K., Tachikawa M., Manya H., Takeda S., Chiyonobu T., Fujikake N., Wang F., Nishimoto A., Morris G. E., Nagai Y., Kanagawa M., Endo T., Toda T. (2006) Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun.* 350(4): p. 935-41.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei all den Personen bedanken, die mich bei der Dissertation unterstützt haben. Zuallererst steht natürlich PD Dr. Jonas Denecke, der in mir die Begeisterung für die medizinische Forschung im Allgemeinen und die Genetik der Dystroglykanopathien im Speziellen geweckt und immer wieder befeuert hat, der mir menschlich und fachlich kompetent zur Seite stand und ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe des Stoffwechsellabors der Uniklinik Münster, hierunter besonders Prof. Dr. Thorsten Marquardt und Dr. Christian Kranz für die gute Einarbeitung und die fantastische gemeinsame Arbeit an CDG-Im. Zudem danke ich Dr. Bettina Reulecke, Dr. Torsten Stölting und Janine Reunert für die schöne gemeinsame Zeit im Labor. Spezieller Dank gilt meinem Mitdoktoranden Christoph für die aufmunternden Worte, wenn die PCR mal wieder nicht funktioniert hat. Danken möchte ich zudem Karin für die gute Einarbeitung rund um Real-time PCRs. Ich danke meiner Mutter für die Korrektur der Arbeit sowie Frank und meiner ganzen Familie für die liebe Unterstützung während aller Phasen der Promotion.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: