

Aus der Abteilung für Medizinische Genetik
im Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Leiter: Professor Dr. med. T. Grimm

**Rekombinationshäufigkeit in Abhängigkeit vom Entbindungsalter der Mütter für
das DMD-Gen (Xp 21.2)**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Antje Rudorf
aus Gera

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Prof. Dr. med Tiemo Grimm

Koreferent: Prof. Dr. med. Holger Höhn

Dekan: Prof. Dr. med Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 2006

Die Promovendin ist Ärztin

In Liebe gewidmet F.C.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Muskeldystrophie	2
2.1 Duchenne Muskeldystrophie (DMD)	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Verlauf	3
2.1.3 Klinik	3
2.1.4 Diagnostik	6
2.1.5 Genetik	10
2.1.6 Pathogenese	13
2.1.7 Therapie	13
2.2. Becker Muskeldystrophie (BMD)	17
2.2.1 Epidemiologie	17
2.2.2 Verlauf	18
2.2.3 Klinik	18
2.2.4 Diagnostik	19
2.2.5 Differentialdiagnose	20
2.2.6 Genetik	20
3. Mutationen	20
3.1 Punktmutationen	21
3.2 Chromosomenmutationen	21
3.3 Genommutationen	23
3.4 Rekombinationsfrequenz	23
3.5 Neumutationen	24

	Seite
4. Vorgehensweise	25
4.1 Untersuchungsmaterial	25
4.2 Methoden	25
4.3 Statistische Berechnung	28
5. Ergebnisse	29
5.1 Ergebnisübersicht	29
5.2 Berechnung	30
6. Diskussion	31
7. Zusammenfassung	32
8. Literaturverzeichnis	35

1. Einleitung und Zielsetzung

Ausgangspunkt meiner Untersuchung war die Beschreibung von altersabhängiger reduzierter Rekombinationsrate bei Trisomie 21 durch Sherman et al (1994). Es wurde gezeigt, dass die reduzierte genetische Rekombination mit einer erhöhten mütterlichen Nondisjunktion in der Meiose I einhergeht (131).

Eine altersabhängig reduzierte Rekombination fand sich auch bei Trisomie 16 und 18 (132,133).

Schon Mitte der 70er Jahre fanden sich erste Hinweise auf eine altersabhängige Zunahme von strukturellen Veränderungen im X-Chromosom mit daraus folgender chromosomaler Instabilität (138).

Mit der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang zwischen Alter und Rekombinationsfrequenz für das X-Chromosom, speziell für den Genabschnitt Xp21.2 festgestellt werden. Veränderungen in diesem Bereich der DNA-Sequenz führen zu Muskeldystrophien. Aufgrund von fehlender oder falscher Produktion des Genproduktes Dystrophin, werden die Muskelzellen mit zunehmenden Alter um- und abgebaut, was bei der Duchenne Muskeldystrophie nach 2 Jahrzehnten zum Tod führt. Die Becker Muskeldystrophie ist nicht so progressiv ausgeprägt. Die Lebenserwartung liegt nur geringfügig unter der der Normalbevölkerung. Aus diesem Grund spielt die genetische Beratung eine entscheidende Rolle. Durch zunehmendes Verständnis der molekularen Vorgänge und Zusammenhänge kann diese weiter präzisiert werden und betroffenen Familien eine Entscheidungshilfe bieten.

2. Muskeldystrophie

Muskeldystrophien sind genetisch determinierte degenerative Myopathien mit progressivem Verlauf (2). Sie bilden eine heterogene Untergruppe der primären Myopathien. Ihr Name verweist auf das „dystrophe“ histologische Bild mit gestörter Gewebearchitektur und mesenchymaler Proliferation (Duchenne 1868, Erb 1884)(3).

2.1 Duchenne Muskeldystrophie (DMD)

Der Name der progressiven Muskeldystrophie geht auf den französischen Arzt Guillaume Duchenne zurück, der 1861 seinen ersten Fall beschrieb. Abgesehen davon schilderten aber schon davor der Italiener Conte und der Brite Meryon eigene Fälle von Muskeldystrophie, die erst später mit der Duchenne'schen gleichgesetzt wurden (120).

1879 beobachtete Gowers die ungewöhnliche Art der betroffenen Jungen vom Fußboden aufzustehen, indem sie sich mit den Händen an den Beinen abstützend an sich selbst hochklettern. Dieses Merkmal wurde nach ihm als Gower's Zeichen benannt (120).

2.1.1 Epidemiologie

Von der DMD werden in aller Regel nur Jungen betroffen. Die Inzidenz liegt bei 1 auf 3500 (93) bzw. 4000 (3), während die Prävalenz bei 3-5 Erkrankten pro 100000 Einwohnern liegt (1,6).

Eine Studie aus Dänemark konnte zeigen, dass dort die Inzidenz bei 1 von 5000 über 24 Jahre blieb, während die Prävalenz von 3,1 auf 5,5 stieg, wie gleichermaßen die Mortalität von 4,7 auf 2,6 sank. Dieser Anstieg der Überlebensrate könnte mit der zunehmenden Möglichkeit der Beatmung auch zu Hause zusammenhängen (16; s. S. 13: 2.1.7 Therapie)

2.1.2 Verlauf

Die Erkrankung beginnt durchschnittlich im 3. Lebensjahr (1,120). Zwischen dem 7. und 12. Lebensjahr sind die meisten Patienten nicht mehr gehfähig; oft kommen auch frühzeitig Kontrakturen hinzu (1,3,120).

Häufig versterben die Patienten Ende des 1. oder Anfang des 2. Lebensjahrzehntes an Infekten der Atmungsorgane begünstigt durch die schwache Interkostalmuskulatur und Kyphoskoliose, seltener an Herzversagen und Marasmus (1,2).

2.1.3 Klinik

Muskulatur

Die Knaben fallen durch eine verzögerte, später stillstehende motorische Entwicklung auf. Dies ist bedingt durch die Paresen der Beckengürtel- und später auch Rückenmuskeln, welche zur Hyperlordose der Lendenwirbelsäule führt. Der Watschelgang ist durch eine Schwäche des M. gluteus medius mit darausfolgendem positiven doppelten Trendelenburg-Zeichen bedingt. Die schwache Oberschenkelmuskulatur erschwert das Treppensteigen und Fahrradfahren und verursacht zusammen mit einer M. iliopsoas-Schwäche das Gowers-Zeichen (s. S. 2: 2.1).

Durch paretische Bauchdecken und dem darausfolgendem Hervortreten des Unterbauches kommt es zum Erscheinungsbild einer Wespentaille.

Die Gnomonwaden entstehen aufgrund einer Pseudohypertrophie mit Fett und Bindegewebeeinlagerung im M. gastrocnemicus; Beinkontrakturen führen zu Spitzfußstellung, später Streckhemmung in Knie und Hüfte.

Schultern und Arme sind meist erst im späteren Verlauf betroffen. Hier führt eine Schwäche zu Scapulae alatae. Erstaunlicherweise sind Hals-, Gesicht- und distale Muskeln sowie die Spinkternen auch in den letzten Jahren noch kräftig (1,2,3,120). Einige Patienten klagen über Muskelschmerzen (120).

Im Tiermodell wurde eine erhöhte Empfindlichkeit von dystrophen Muskeln gegenüber hohen mechanischen Kräften gefunden, obwohl es Anhaltspunkte gibt, dass sich auch kranker Muskel an mechanischen Stress anpassen und darauf reagieren kann. Die schädigenden Effekte traten v.a. bei älteren Tieren mit fortgeschrittenen Muskel-

faserdegenerationen auf (14). Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Dystrophin eine schützende Funktion bei mechanischem Stress hat (78,79,80).

Herz

Bei sorgfältigen Untersuchungen kann man bei bis zu 90% der DMD-Patienten eine Beteiligung des Herzmuskels finden (1,106).

Die Bedeutung von Dystrophin für das Entstehen einer dilatativen Kardiomyopathie ergibt sich durch die Interaktion dieses Proteins mit anderen Matrixproteinen. Dystrophin ist ein Protein des Zytoskeletts, welches in allen Muskeltypen exprimiert wird, so auch in den T-Tubuli der kardialen Myofibrillen. Es entsteht eine transmurale fibrotische Umwandlung des linken Ventrikels v.a. in der posterolateralen und lateralen linksventrikulären Wand (2,3,120). Ebenso davon betroffen ist das Reizleitungssystem, was zu inadäquater Sinustachykardie und Galopprrhythmen führen kann (2,3). Diese können durch eine beschleunigte AV-Überleitung bedingt sein, welche bei 50% der Patienten gefunden wurden (107).

Das EKG ist bereits in der Kindheit pathologisch. Es finden sich rechts präkordial abnorm hohe R-Zacken, eine erhöhter R/S Quotient und tiefe Q-Zacken in Ia,VL,V5-6 (2,3,108,109,110) sowie eine QT-Verlängerung auf 54 ms im Mittel und darausfolgend ventrikuläre Arrhythmien vom Lown Grad III oder höher (11).

Ein Cor pulmonale kann durch die unzureichende respiratorische Funktion und Skoliose entstehen (3).

Magen-Darm-Trakt

Wegen der Beteiligung der glatten Muskulatur kann es zu Magenentleerungsstörungen kommen (111). Außerdem klagen DMD-Patienten häufiger über gastrointestinalen Dysfunktionen wie Dysphagie, Erbrechen und Würgeiz (5), welche wiederum Ernährungsstörungen begünstigen.

Intelligenz

Die geistige Retardierung wurde schon frühzeitig im Zusammenhang mit DMD festgestellt. Bei 30% (2,67) wurde ein Wechsler-IQ von unter 75 festgestellt (7). Der Durchschnitts-IQ wurde durch zahlreiche Studien bei 85 bestätigt (120).

Es fand sich ein Zusammenhang zwischen der geistigen Beeinträchtigung und Mutationen. Dabei zeigten 39% der DMD- und 12% der BMD-Patienten eine mentale Retardierung sowie in einigen Fällen Autismus. Alle Patienten mit Deletionen aufwärts von 5' waren jedoch mental normal, während alle mit Deletionen die das 3' Ende einschlossen Störungen aufwiesen. Jedoch fanden sich phänotypische Unterschiede bei genotypisch identischen Deletionen bei Zwillingen, die auf eine Interaktion des Dystrophins mit andern nukleären Genen hinweist (13).

Anästhesiezwischenfälle

Im Zusammenhang mit Succinylcholingabe bei Routineoperationen traten bei undiagnostizierten Kindern akut lebensgefährliche Herzprobleme, wie Tachyarrhythmien mit Hypotension oder Asystolie auf (9,17,18).

Ursächlich wird eine Hyperkaliämie aufgrund einer Succinylcholin induzierten Rhabdomyolyse angenommen. Bei späteren Untersuchungen dieser Kinder fanden sich sowohl DMD-Patienten als auch BMD-Patienten (9).

Therapiebedingte Symptome

Aufgrund von Steroidtherapien sind DMD-Patienten frakturgefährdet. 40 Monate nach der Therapie zeigten die ersten von 33 Probanden Vertebralfrakturen, nach 100 Monaten waren es bereits 75% (15). In diesem Zusammenhang, aber auch unabhängig davon wurden häufiger hormonelle Störungen, wie Adipositas, Hypogonadismus und Nebennierenrindeninsuffizienz gefunden (1,2).

2.1.4 Diagnostik

Klinische Untersuchung

Die Anamneseerhebung stellt einen wichtigen Schritt in Richtung Diagnosefindung dar. Durch genaue Befragung und Untersuchungen können auch schon unspezifische Zeichen, wie Müdigkeit, Myalgien oder mangelnde Ausdauer erkannt werden. Rückblickend können Eltern häufig von einer Verzögerung der motorischen Entwicklung berichten (3,120).

Um die Diagnose zu sichern eignet sich eines der nachfolgenden Verfahren, ggf. auch die Kombination aus mehreren.

Blutwerte

Vor allem vor der Zeit der Genanalyse war die Bestimmung der Creatinkinase im Serum von großer Bedeutung. Bei DMD-Patienten sind die Werte massiv erhöht; es sind 5000 –10000 U/dl möglich demgegenüber 5 – 80 U/dl normal sind (1,2,120). Erhöhte Werte finden sich bereits bei Geburt und nehmen im Verlauf der Erkrankung mit zunehmenden muskulären Abbau ab. Bei 70% der Konduktorinnen fanden sich ebenfalls erhöhte CK-Werte (2).

Ende der 80er Jahre zeigte ein Screening bei Neugeborenen mittels Analyse des Kreatinkinase-Gehaltes im Blut auf Filterpapier gute Ergebnisse. Kinder mit erhöhter CK und deren Mütter konnten dann gezielt auf Deletionen/Duplikationen untersucht werden (81).

Elektromyogramm (EMG)

Im EMG zeigt sich der myopatische Charakter der Erkrankung durch verkürzte Dauer und herabgesetzte Amplitude der Einzelpotentiale sowie ein relativ dichtes Aktivitätsmuster schon bei schwacher Anspannung (1,2,120). In degenerativ umgeformten Muskeln ist keine Aktivität mehr ableitbar (silent area) (2).

Muskelbiopsie

Makroskopisch imponiert der dystrophe Muskel blasgelb, verschmächtigt und fettig umgewandelt.

Histologisch finden sich zu Beginn der Erkrankung große Unregelmäßigkeiten - atrophische neben kompensatorisch hypertrophen Fasern mit vermehrten, zentralen Sarkolemmkernen, eine Zunahme des interstitiellen Bindegewebes und Fasereosinophilie. Im Querschnitt finden sich 1,5 – 3,5% meist einzeln stehende, nekrotische Fasersegmente, denen eine Erhöhung des intrazellulären Calciums voraus geht. Spärliche Leukozyteninfiltrate folgen.

Im Laufe der DMD finden sich später schollige Faserdegenerationen, die im Endstadium durch eine erhebliche, unregelmäßige Fettgewebsvermehrung ersetzt werden (1,3). Die Faserquerschnitte werden variabler und die Proliferation von Bindegewebe nimmt zu (3). Eine immunhistochemische Anfärbung für Dystrophin gelingt nicht, da Dystrophin fehlt oder auf weniger als 3% der Norm reduziert ist (1,2). Bei Konduktorinnen zeigt sich ein Mosaik aus dystrophinpositiven und -negativen Fasern (3).

Histopathologisch kann man die DMD gut diagnostizieren, die Unterscheidung zwischen BMD und anderen Muskelerkrankungen ist jedoch schwieriger (20).

Pränatale Muskelbiopsie unter sonographischer Kontrolle und folgender Immunofluoreszenzdarstellung des Dystrophins fanden zu Beginn der 90er Jahre Anwendung (19).

Durch Western-Blot kann eine quantitative Dystrophin-Bestimmung erfolgen (4, 20).

In der heutigen Zeit der Nukleinsäureanalyse wird die Muskelbiopsie jedoch immer seltener nötig.

Nucleinsäureanalyse

direkte DNA-Analyse

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine gute Möglichkeit um Genmutationen zu entdecken und Mutationsträger zu screenen (83). Besonders geeignet ist die PCR bei Deletionen, da hier die Bande auf der Gelplatte fehlt, während es bei Insertionen und Duplikationen zu quantitativer Vermehrung und folglich zu einer Verbreiterung der

Bande kommt, welche jedoch schwieriger auszuwerten ist. Für den Southern-Blot gilt das selbe (3).

Inzwischen ist es gelungen über 98% der zu 70% auftretenden Deletionen mittels multiplex PCR zu identifizieren (97,98). Das restliche Drittel an Punktmutationen kann durch die von Roberts et al 1991 beschriebene Technik aus Lymphozyten-RNA erkannt werden (99).

Mit Metaphase- und Interphase- FISH (fluorescence in situ hybridization) von peripheren Blutlymphozyten lassen sich heterozygote Deletionen gut erkennen. Diese Methode eignet sich damit zum Screening von Deletionsträgern und zukünftig vielleicht auch zur Diagnostik fetaler Carrier (84).

Punktmutationen zu finden ist weitaus schwieriger als Deletionen. Bennett et al, 2001 entwickelten das DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)-Screening sowie die direkte Sequenzierung und fanden bei 6 von 8 DMD-Patienten mit negativer PCR-Suche nach großen DNA-Veränderungen Punktmutationen die krankheitsursächlich sein könnten. Damit wurde gezeigt, dass klinische Labors mit der Suche nach Punktmutationen und Deletionen ihre Diagnose-Rate auf 92% erhöhen können (22).

White et al, 2002 nutzten eine adaptierte Technik – MAPH (multiplex ampifiable probe hybridization) – um jedes der 79 Exons zu analysieren und fanden so eine Duplikationsrate von 6% in DMD-Patienten (82).

indirekte DNA-Analyse

Die Kopplungsanalyse eignet sich, wenn die direkte DNA-Analyse nicht möglich ist. Dazu werden z.B. RFLP's (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) + Southern-Blot oder Dinukleotidwiederholungen + PCR genutzt. Das Problem bei dieser Technik stellt die Entkopplung durch Rekombinationen dar, weswegen hier ein höheres Wissen um Rekombination bei der Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein kann.

RNA-Analyse

Mit der reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) kann man aus Muskel gewonnene mRNA und nach deren Umschreibung in cDNA, diese amplifizieren und gelelektrophoretisch auftrennen. Das Problem hierbei stellen Keimzellmosaike dar, wobei die Mutationen weder in der Muskel mRNA noch in der Blutzell-DNA vorhanden sind (3). In diesen Fällen kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen.

Diagnostik von Konduktorinnen

Die Bestimmung der CK zeigt nur bei 70% der DMD-Konduktorinnen Erfolg und noch seltener bei BMD-Konduktorinnen. Weitere Möglichkeiten sind die Nukleinsäureanalyse und die Muskelbiopsie (3,120).

Die Carrier-Diagnostik ist deswegen problematischer, da hier noch ein intaktes X-Chromosom vorhanden ist. Die Untersuchung wird zusätzlich erschwert, wenn ein Mutationsnachweis auf DNA-Ebene für den Bezugspatienten nicht möglich ist. Für diese Fälle eignet sich v.a. die Kopplungsanalyse, als indirektes Nachweisverfahren (3,21).

2003 gelang eine Präimplantationsdiagnostik durch Amplifikation von 4 Exons des DMD-Genes bei einer heterozygoten Frau (85).

Die Diagnose einer DMD oder BMD stützt sich nicht allein auf die DNA-Analyse, sondern auch auf die Analyse der mRNA, des Proteins und klinischer Parameter. Ebenso sollten molekulare Veränderungen im Zusammenhang mit dem klinischen Phänotyp (Muskulatur, Herz, Intelligenz) betrachtet werden (21).

2.1.5 Genetik

Überblick

Die DMD ist eine X-Chromosomale Erkrankung

Das DMD-Gen befindet sich auf dem kurzem Arm vom X-Chromosom (Xp21.2). Es ist mit 2.4 Mbp eines der größten Gene, jedoch machen die 79 Exons davon nur 0,6% aus. Zusätzlich ist die durchschnittliche Größe eines DMD-Exons mit 80 bp nur halb so groß wie die durchschnittliche Größe von Exons im allgemeinen (170bp). Daran lässt sich erkennen, dass der Gehalt an Introns und deren Größe relativ hoch ist. Xp21.2 kodiert für das Protein Dystrophin, welches ein Molekulargewicht von ungefähr 427 kd hat (121). Neben dem Muskel-Dystrophin wurden noch andere Isoformen entdeckt, z.B. im Gehirn, im Auge, in den Nieren (102,103,104).

Ungefähr 2/3 der Fälle liegen genetisch in Deletionen begründet, der Rest sind Duplikationen und Punktmutationen (71,105).

Nach dem Haldane-Gleichgewicht sind, unter der Annahme, daß die Mutationsraten in beiden Geschlechtern gleich sind, $\frac{1}{3}$ aller Neugeborenen mit DMD durch Neumutationen bedingt. Abgesehen von Keimzellmosaikern bleiben noch 23% sporadischer Fälle (113). Diese Mutationshäufigkeit wird z.T. auf die Ungewöhnliche Größe des Gens zurückgeführt (3).

Geschichtliche Entwicklung

Aufgrund der Analyse von Stammbäumen war schon früh erkannt worden, dass die ursächliche Mutation für DMD auf dem X-Chromosom liegen musste. Es begann die Suche nach dem genauen Ort.

Bereits zu Beginn der 80er Jahre zeigten sich erste Erfolge. Man fand Hinweise, dass sich das betreffende Gen zwischen Xp 223 und Xp 110 befinden muss (50). Untersuchungen weiblicher DMD-Patienten, die alle durch eine X/Autosomen-Translokation bedingt waren, zeigten einen gemeinsamen Bruchpunkt bei Xp21 (51,101), welcher die vorherigen Untersuchungen bestätigte und die Lokalisation noch mehr eingrenzte. Gleichzeitig fanden Untersuchungen zum genetischen Ursprung von BMD statt. Auch BMD konnte mittels Kopplungsanalyse in Xp21 ausgemacht werden

(52,53,54) und es wurden erste Vermutungen angestellt, dass beide Erkrankungen Allele seien (54).

Mit Hilfe der X/Autosomen-Translokationen und der DNA-Probe eines DMD-Patienten mit einer sehr großen Deletion (57,58,59) gelang es, das betreffende Gen genauer zu untersuchen. Es fanden sich zahlreiche Deletionen, wovon die meisten innerhalb von nur 2 kb des Gen-Transkriptes lagen (56).

Damit zeigten sich erste Hot-spots für Deletionen, z.B. DXS 164 (55).

Es gelang die komplette Klonierung der cDNA, wobei mindestens 60 der heute bekannten Exons gefunden wurden und die Dystrophin m-RNA identifiziert werden konnte (56,57).

Hoffman et al fanden 1987 das dadurch codierte Protein über polyklonale Antikörper, sie schätzten ein Molekulargewicht von 400 kd und einen Anteil von 0,002 % im quergestreiften Muskel. Ebenso fanden sie das Protein im glatten Muskel. Bei Untersuchungen an DMD-Patienten und mdx-Mäusen (welche als Tiermodell erkannt wurden) fehlte dieses Protein, woraus Hoffman et al schlossen, dass diese beiden Störungen homolog wären und dem Protein den Namen Dystrophin gab (60). Koenig et al ermittelten 1988 den Aufbau von Dystrophin aus vier Domänen und zeigte Ähnlichkeiten mit Spectrin und alpha-actinin (63).

Die Entdeckung weitere Deletionen und ihrer Hot-Spots schritt voran (61,62). 53% der Deletionen befanden sich in einem 2,4 kb großen Abschnitt (62). Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Größe und Lage der Deletion und der Klinik (68).

Monaco et al stellten 1988 die Hypothese vom offenen Leserahmen auf. Diese besagt, dass alle Deletionen, die kein Vielfaches von 3 sind zwangsläufig zu Stoppkodons führen, wodurch kein Dystrophin gebildet werden kann (out-of-frame). So entsteht die DMD, während bei der BMD der Leserahmen erhalten bleibt und nur ein Teil des Proteins fehlt (in-frame) (69).

In weiteren Untersuchungen zeigten Hoffman et al 1988 dass DMD-Patienten kein oder weniger als 3% des normalen Anteils an Dystrophin hatten, während BMD-Patienten ein abnormales Molekulargewicht aufwiesen. Wenige DMD-Patienten zeigten etwas höhere, gegenüber dem Gesunden jedoch zu niedrige Werte, welche Hoffman et al als intermediären Phänotyp (Outlier) einstufte (64).

Jedoch gibt es auch hier Ausnahmen. Prior et al. 1997, fanden Patienten mit milder Verlaufsform ohne nachweisbares Dystrophin aber auch DMD-Patienten mit Dystrophin (91, ebenso 95,96).

Forschungen ergaben, dass Dystrophin mit dem Sarkolemm verbunden war und dieses durch Verankerung von Elementen des inneren Zytoskeletts verstärkt (65). Bei DMD-Patienten fehlte das Dystrophin im Sarkolemm, was frühere Studien bestätigte und es kam zu weiteren strukturellen und funktionellen Störungen (66).

Nachdem Hoffman et al 1987 Dystrophin auch im glatten Muskel entdeckten, fanden Nudel et al 1989 Dystrophin ebenfalls im Herzmuskel und Gehirn. Ursächlich waren verschiedene Promotoren, die für die verschiedenen Dystrophinarten verantwortlich sind (67).

1989 bestätigten Koenig et al die Hypothese vom offenen Leserahmen in 92% ihrer Fälle (70). Ähnliche Ergebnisse lieferte auch Bushby 1992 (71).

Die Deletionen fanden sich häufig in Hot-spots auf dem Gen. Dabei stellten sich zwei besonders häufige Lokalisationen heraus, einmal ein Bereich um Exon 44 bis 52 (71-76) sowie 3-19 (74,75,76).

Bei großen in-frame-Deletionen fanden sich DMD-ähnliche klinische Symptome, weswegen die Entscheidung zwischen Duchenne'scher und Becker'scher Dystrophie nicht allein anhand der DNA-Ergebnisse geschehen sollte (77).

Aufbau von Dystrophin

Dystrophin macht ungefähr 5% des gesamten subsarkolemmalen Zytoskeletts der gestreiften Muskulatur aus (88).

Das zytoskeletale Protein ist über seinen C-Term mit Glycoproteinen im inneren Plasmalemm verbunden ist (78,89). Es verstärkt die mechanische Stabilität gegenüber normalen Stress bzw. Muskelkontraktionen, so dass es zu keinen Muskelfaserrupturen kommt (78,79,80). Bei Mangel an Dystrophin in den Muskelfasern beeinflusst die Größe des Stresses das Ausmaß der Schäden (79).

Dystrophin besteht aus vier Domänen, aminoterminaler, mittlerer (Stabdome), cysteinreicher und karboxyterminaler Bereich (C-Term) (3).

Nur der aminoterminaler Bereich, N-Term, ist in der Lage Aktin zu binden (90).

2.1.6 Pathogenese

Das submembranös lokalisierte Dystrophin, welches mit dem intrazellulärem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix verbunden ist, bildet ein Netzwerk (114). Dadurch lässt sich die membranstabilisierende Wirkung (115) bzw. die erhöhte mechanische Sensibilität erklären (78,79,80).

Die Calcium-Hypothese besagt, dass Dystrophin-Mangel zu einer erhöhten aber insuffizienten Ca-ATPase führt, wodurch das Calcium intrazellulär ansteigt (86,116) und Hyperkontraktionen, Rupturen und Nekrosen auftreten könnten (86). Diese Fehlregulation wird durch überaktive mechanosensitive Calciumkanäle verursacht (117,118). Dies kann das Auftreten von Muskelnekrosen bei Dystrophinmangel erklären (27).

2.1.7 Therapie

symptomatische Therapie

Hierunter fällt in erster Linie die rechtzeitige Versorgung mit Hilfsmitteln (Rollstuhl, Kommunikationshilfen) (1). Um die Gehfähigkeit und Atmung so lange wie möglich zu erhalten wird Krankengymnastik eingesetzt (1,3).

Im Spätstadium, wenn auch die Atemmuskulatur geschwächt ist, kann Heimbeatmung anfangs nur nachts, später auch zur ganztägigen Unterstützung eingesetzt werden (1,3).

Weiter sinnvoll sind eiweißreiche Ernährung, psychologische Hilfe und psychosoziale Betreuung, welche auch die Familie erhalten sollte (3).

Operative Maßnahmen (z.B. zur Achillsehnenverlängerung bilaterale Faszia lata Resektion) helfen nur vorübergehend und wenn sie früh erfolgen (120).

Zur Entwicklung von Therapiestrategien haben sich das Maus-Model (mdx) und das Hundemodell (xmd) als geeignet gezeigt.

Steroidtherapie

Die Therapie mit Prednison erwies sich in vielen Fällen als günstig, da dadurch das Fortschreiten der Muskelschwäche und der Funktionsverlust signifikant verlangsamt, sowie die Muskelfunktion verbessert werden konnte (23,24,25). 0,75 mg Prednison/kg KG/d erwies sich als optimale Dosis (23,24) mit der die Gehfähigkeit um mindestens 3 Jahre verlängert werden konnte (23).

Jedoch zeigte das Mausmodell, dass Prednison keinen schützenden Effekt bei kontraktionsbedingten Verletzungen hat (26). Ein Teil des Erfolges lässt sich durch die Unterdrückung des Immunsystems erklären (94).

2002 wurde gezeigt, dass Glucokortikoide die Produktion von Utrophin – einem Dystrophin-Homologa – induzieren können (46; s.S. 16: Gentransfer über Vektoren).

Steroide ändern aber nichts am eigentlichen Gendefekt. Deswegen wurden bereits Ende der 80er Jahre erste Versuche auf dem Gebiet der Genterapie gestartet. Hierbei erwiesen sich die Tiermodelle, insbesondere mdx-Maus (mdx) und Golden Retriever (xmd) als hilfreich.

Es entwickelten sich zwei verschiedene Methoden, zum einem der Myoblasten-Transfer von gesunden Spenderzellen und der Transfer von Genen in geeigneten Vektoren, wie Adenoviren. Beiden gemeinsam ist das Ziel, dass defekte Gen durch ein intaktes zu ersetzen, welches dann die Produktion von Dystrophin startet.

Kausale Therapieansätze

A - Myoblasten-Transfer

Muskel-precursor-Zellen (Myoblasten) von gesunden Spendertieren wurden in dystrophe Muskeln von mdx-Mäuse injiziert. Es folgte eine Fusion mit bereits existierenden oder regenerierenden dystrophen Muskelfasern und Umwandlung in dystrophinpositive Fasern (27).

Karpati et al 1989 wiesen in gleichen Versuchen eine Mosaikbildung mit dystrophin-positiven und –negativen Muskelfasern nach, die ebenso die Nekrose verhindern (28).

Einer der ersten Versuche den Myoblasten-Transfer am Menschen zu testen, unternahm Karpati et al 1993. Sie benutzten Spender-Myoblasten der jeweiligen Väter der DMD-Patienten und verabreichten zusätzlich Cyclophosphamid zur Immunsuppression für 6 oder 12 Monate. Es traten keine Komplikationen auf, jedoch auch kein Erfolg ein. Spender DNA und mRNA konnten nicht nachgewiesen werden. Karpati et al vermuteten, dass jüngere Zellen und die Injektion von zusätzlichen Faktoren die Resultate verbessern könnten (30). Weitere Versuche von anderen Arbeitsgruppen zeigten auch keinen oder nur geringe Erfolge (31,32,37), so dass es sich als schwierig erwies, den Erfolg bei mdx-Mäusen auf den Menschen zu übertragen.

Wenige Monate später stellten Kapatı et al fest, dass erwachsene Mäuse weniger von rekombinaten Adenovirus-Injektionen profitierten als sehr junge Mäuse (31), was möglicherweise mit dem unausgereiften Immunsystem zusammenhängt. Diese Ergebnisse wurden bestätigt und Acsadi et al 1996 fanden, dass Mäuse mit humoralen und zellulären Immunmangel noch etwas besser auf die Injektionen reagieren (33). Diese Entdeckung passt mit der Beobachtung von Antikörperproduktion gegen Dystrophin nach einer Herztrans-plantation bei einem BMD-Patienten zusammen (92).

Weitere Versuche zeigten, dass dystropher Muskel 3 mal besser auf einen Myoblasten-Transfer anspricht als normaler Muskel und eine Unterdrückung des Immunsystems, insbesondere der T-Zellen vor allem für den Langzeiterfolg nützlich ist (38). So ist die Erfolgsrate bei gleichzeitiger Gabe von LIF (leukemia inhibitory factor) besser; die dystrophen Fasern produzieren mehr Dystrophin und die Regenerationrate ist erhöht (39).

Insgesamt reichen die Ergebnisse aber noch nicht aus, um nach einer Therapie von einer Verbesserung der Lebenssituation zu sprechen. Die dargestellten Erfolge, wie Schutz vor Nekrose und funktionale Vorteile beschränken sich auf eine kleine Region nahe der Einstichstelle (40). Um bessere Ergebnisse zu erzielen, ist die Entwicklung von Muskel-Stammzellen eine Möglichkeit (87).

B - Gentransfer über Vektoren

Ragot et al 1993 zeigten, dass es neben dem Myoblasten-Transfer auch die Möglichkeit des Einsatzes von Adenoviren mit rekombinierten Plasmiden mit einem 6,3 kb Minigen (von Acsadi et al 1991 (100)), welche für Dystrophin codieren gibt. Bei ersten Versuchen wiesen 50% der behandelten Muskelfasern das codierte Minidystrophin auf (29).

Es wurde festgestellt, dass es günstiger ist Minigene um 5kb in den Vektor einzuschleusen, als die wesentlich größere Dystrophin cDNA mit 14 kb. Damit wurden bessere Ergebnisse bezüglich Effizienz und Stabilität der Expression sowie eine Verbesserung der Pathologie in Richtung normaler Muskelfasermorphologie, -histologie und Zell-membranstabilität erreicht (41,42).

Utrophin ist ein dem Dystrophin homologes Protein, beide gehören zur Spectrinfamilie, weswegen Utrophin Dystrophin ersetzen kann (43).

Utrophin findet sich auch im DMD-Muskel und die Überproduktion nach dem Transfer zeigte bei jungen Mäusen wiederholt Erfolge. Muskelnekrosen waren weniger häufiger und der Muskel war resistenter gegenüber Verletzungen durch mechanischen Stress. Die Erfolge bei alten Mäusen waren hier, wie auch bei Dystrophin-Transfer aufgrund der Immunantwort geringer (34,35,36, 44).

Die Ergebnisse vom Mausmodell lassen sich jedoch nicht so gut auf dem Menschen übertragen, wie Untersuchungen beim Hund, da das Hundemodell für Muskeldystrophie klinisch dem Menschen ähnlicher ist. Aber auch hier zeigten sich nach einem Utrophin-Gentransfer mit Adenoviren und zusätzlicher Gabe von Cyclosporin erste kleine Erfolge. Das injizierte Utrophin war für mindestens 60 Tage stabil und führte zu einer reduzierten Fibrose und zu einem Anstieg der Produktion von Dystrophin-assozierten Proteinen (47).

Utrophintransfere erzielen im Vergleich zu Dystrophintransferen bessere Ergebnisse, da sich Utrophin auch im dystrophen Muskel befindet, während Dystrophin vom Immunsystem als fremd erkannt und angegriffen wird. Abgesehen davon kann Utrophin einen

Dystrophinmangel bei Überexpression kompensieren und schützt damit genauso vor Muskelnekrosen und –schwächen (44).

Die Überproduktion kann erfolgen durch eine Aktivierung von Promotern, wodurch die Transkriptionsrate erhöht wird (43) oder über Mechanismen nach der Transkription, die für die Regulation von Utrophin wichtig sind (45).

Interessanterweise zeigte eine Studie, dass 5-7 Tage nach Glucokorticoidegabe die Utrophinwerte bei 40% der Probanden stiegen. Es fand sich, dass Glucokortikoide das Promotor A Fragment für Utrophin aktivieren, jedoch war die mRNA nicht im gleichem Masse vermehrt, was wiederum auf einen post-transkriptionalen Mechanismus zur vermehrten Expression von Utrophin schließen lässt (46).

Trotz aller Fortschritte gibt es auch hier noch keine effektive Therapie (42).

Hoffnung für die Zukunft macht ein murine dystrophin Gentransfer mit einem speziellen Adenovirus (fully deleted helper-dependent adenovirus – HDCBDysM), welcher bei Mäusen einen guten Effekt - geringere Muskelhypertrophie, gesteigerte Muskel- und Widerstandskraft - auch noch nach einem Jahr zeigte. Obwohl es auch hier Probleme mit der Autoimmunreaktion gab, scheint dies ein vielversprechender Weg zu sein (48,49).

2.2 Becker Muskeldystrophie (BMD)

Die BMD wurde erstmals 1955 von Becker und Kiener an Mitglieder von Kieners Familie beschrieben (3) und 1962 bei weiteren Familien durch Becker (120).

Da sich die DMD und die BMD sehr ähneln, werde ich hier nur die Unterschiede beschrieben.

2.2.1 Epidemiologie

Auch von der BMD werden fast nur Jungen betroffen, jedoch ist die Erkrankung 10 mal seltener als die DMD (3). Die Inzidenz liegt bei 1 auf 20000 männliche Geburten (1,6), die Prävalenz bei 3 auf 100000 (6).

Die epidemiologischen Zahlen schwanken, da die milde Verlaufsform je nach Studie zu einer unterschiedlichen Anzahl undiagnostizierter BMD-Patienten führt.

2.2.2 Verlauf

Die Erkrankung beginnt im Durchschnitt im 11. (2 ½ bis 21) Lebensjahr (1,120). Sie verläuft gutartiger als die DMD (2), schreitet aber dennoch voran, so dass die Lebenserwartung dieser Patienten verkürzt ist (60 Jahre) (1). BMD-Patienten versterben häufiger herzbedingt, seltener pulmonal wie DMD-Patienten (8). Die Gehfähigkeit kann manchmal bis zum 50. Lebensjahr erhalten bleiben.

2.2.3 Klinik

Muskulatur

Bei BMD-Patienten ist eine vom Beckengürtel aufsteigende Schwäche vom 5. bis 15. Lebensjahr erkennbar, diese kann aber auch erst mit 30 oder 40 Jahren symptomatisch werden.

Pseudohypertrophien treten regelmäßig, Kontrakturen selten auf

Herz

Die kardiale Beteiligung bei BMD-Patienten ist seltener als bei DMD-Patienten. Es wurden isolierte Kardiomyopathien gefunden (119).

Alle vier Herzkammern können betroffen sein. Die Ventrikel sind häufig dilatiert und insuffizient. Dies führt zu einer Veränderung im His-Bündel und der infranodalen Überleitung mit faszikulärem Block oder auch kompletten AV-Block (122,123).

Typische EKG-Veränderungen fehlen jedoch, es finden sich ähnliche Pathologien wie bei DMD-Patienten, diese sind insgesamt aber seltener (1).

In Untersuchungen fanden sich ein prominentes Q in II, III, aVF, V6; ein großes R in V1 wahrscheinlich bedingt durch eine Verletzung an der posteroinferior und lateralen Wand (8).

Mit dem Alter nimmt die Links-Herz-Dilatation immer mehr zu, während sich die Ejections-Fraktion im Vergleich mit DMD verringerte (8).

Manchmal fällt die Diagnose BMD erst nach langjährigen Herzproblemen oder sogar Herztransplantationen. In diesen Fällen geht die Kardiomyopathie der neuromuskulären Erkrankung voraus (12). Im Zusammenhang mit Herztransplantationen fiel ein Patient auf, welcher Antikörper gegen Dystrophin entwickelte. Dies ist eines der großen Probleme beim Myoblastentransfer als Therapieoption (92; s.S. 15: Myoblastentransfer).

Epilepsie

Bei den Muskeldystrophien fanden sich eine zunehmende Frequenz von Epilepsie (14% gesamt)(3) sowohl bei DMD (1,99%) als auch bei BMD (7,54%). Jedoch war sie nur bei der BMD mit $p > 0.007$, signifikant erhöht (10).

Intelligenz

Die mentale Retardierung ist mit 12% seltener als bei DMD-Patienten (3,13).

Symptome subklinischer Fälle

Da die BMD aufgrund ihres milden Verlaufes auch unerkannt bleiben kann, sind subklinische Formen möglich. Diese können sich durch Myoglobinurie, Myalgie und Hyperkreatinämie äußern (124).

2.2.4 Diagnostik

Die diagnostischen Methoden sind die selben wie bei der DMD, unterschiedlich sind nur die Ergebnisse.

Blutwerte

Die CK ist mit >1000 U/dl gegenüber Gesunden deutlich erhöht, jedoch nicht so hoch, wie bei DMD-Patienten (1,2,112).

EMG

Im EMG findet sich ebenfalls ein myopathisches Muster wie bei der DMD (1,2).

Muskelbiopsie

Histologisch zeigt sich eine partielle Anfärbung, da noch geringe Mengen Dystrophin vorhanden sind (2,3). Teilweise finden sich Stellen mit atrophischen Fasern (120).

Im Western-Blot findet man meist ein Dystrophin mit verkleinertem Molekulargewicht, bei Duplikationen ist es gelegentlich vergrößert (2).

2.2.5 Differentialdiagnose

Hierbei muss an die Gliedergürteldystrophie gedacht werden, da beide mit einer CK-Erhöhung einher gehen, sowie klinisch ähnliche Symptome aufweisen. Mittels Deletionsnachweis sind aber 70% differenzierbar (120).

2.2.6 Genetik

Die BMD ist eine X-chromosomale Erkrankung auf Xp 21.2. Sie basiert auf einer in-frame-shift Mutation (s.S. 11). Die Klinik hängt mehr vom Deletionsort ab, als bei DMD, dabei zeigt sich die beste Prognose bei Deletion im zentralen gefalteten Teil des Dystrophins.

3. Mutationen

Durch zufallsgemäße Verteilung der homologen Chromosomen ergibt sich bei einem haploiden Chromosomensatz von 23 Chromosomen $2^{23} = 8\,388\,608$ Kombinationsmöglichkeiten, in der Zygote mit männlichen und weiblichen Chromosomen erhöht sich diese Zahl auf 2^{46} . Durch Mutationen können die Möglichkeiten der Merkmalsausprägung wiederum erhöht, was für die Evolution von grundlegender Bedeutung ist.

Dabei ergeben sich sowohl Mutationen mit Vorteilen als auch mit Nachteilen; sie sind demnach ungerichtet.

Nach ihrer DNA-Auswirkung lassen sich Mutationen unterteilen in Punkt-, Chromosomen- und Genommutationen (126,127).

3.1 Punktmutationen

Hier kommt es zum Austausch einer Base. Die Auswirkung hängt von der Lage dieser Base innerhalb des Triplets und der Lage des Triplets innerhalb des Proteins ab. Ebenso kann die betroffene Stelle innerhalb eines Introns (nicht-kodierender Bereich) oder eines Exons (kodierender Bereich) liegen. Häufig kann noch ein ähnliches Protein gebildet werden und die Auswirkungen sind dann weniger auffällig.

Für meine Untersuchungen spielen Punktmutationen dahingehend eine Rolle, dass es diagnostisch schwerer ist diese zu entdecken, als beispielsweise Deletionen. Die Auswirkungen können bei beiden jedoch gleich sein (126,127).

3.2 Chromosomenmutationen

Zu den Chromosomenmutationen zählen die Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen, welche sich durch Rekombinationsprozesse erklären lassen.

Es gibt verschiedene Rekombinationsmodelle (Copy-choice-Modell, Breakage and Reunion, Holliday-Modell, Doppelstrangbruch-Modell), die sich alle geringfügig unterscheiden.

Der grundlegende molekulare Mechanismus besteht aus einem Schnitt oder Bruch und anschließende Verknüpfung von DNA-Moleküle. Dabei unterscheidet man die homologe und die nicht-homologe Rekombination, welche wiederum in sequenzspezifisch und unspezifisch/illegitim unterteilt wird (126,127).

Die homologe Rekombination

Die Rekombination findet v.a. in der Meiose I statt. Nur ein geringer Bruchteil wurde in der mitotischen Meiose II beobachtet.

Im Zygotän richten sich die homologen Chromosomen paarweise in der Äquatorial-ebene aus. Es bildet sich ein synaptonemaler Komplex, der Rekombinationen ermöglicht. Im folgenden Pachytän werden homologe Nichtschwester-Chromatiden auf gleicher Höhe durchtrennt und kreuzweise wieder zusammengefügt. Als Folge dieses cross-over kann man im Diplotän vorübergehend Chiasmata sehen.

Für diese Vorgänge sind verschiedene Enzyme bzw. Proteine nötig, wovon heute schon einige gefunden worden sind (126,127,137).

Die nicht-homologe Rekombination - sequenzspezifisch

Hierfür werden nur sehr kurze homologe DNA-Frequenzen benötigt.

Bei der Inversion kommt es durch Bildung einer Haarnadelschleife zum Austausch sich gegenüberliegender, gegenläufiger Bereiche, wodurch diese ihre Lokalisation innerhalb des DNA-Abschnittes tauschen.

Bei der Deletion liegen die DNA-Abschnitte in gleicher Richtung und es wird durch Schlaufenbildung ein Teil herausgeschnitten. Es bildet sich ein zirkuläres separates Molekül, welches durch Integration wieder in die DNA aufgenommen werden kann, ansonsten aber verloren geht. Beim Menschen findet die sequenzspezifische nicht-homologe Rekombination z.B. beim Rearrangement von Immunglobulin-Genen statt (126,127).

Deletionen machen den Großteil ($\frac{2}{3}$) der chromosomalen Veränderungen bei DMD-Patienten aus (71,105). Dabei muss unterschieden werden zwischen Mutationen, die das Leseraster verschieben (Frame-shift-Mutationen, die Anzahl der deletierten Basenpaare ist kein Vielfaches von 3) und solchen, die es beibehalten. Die unterschiedliche Auswirkung ist bei den Muskeldystrophien eindrücklich erkennbar (s.S.11).

Bei der Duplikation kommt es zur Verdopplung eines Chromosomenabschnittes, der entweder in gleicher oder umgekehrter Richtung erfolgen kann (126). Sie treten bei DMD Patienten zu 6% auf (82).

Die nicht-homologe Rekombination - sequenzunspezifisch

Die illegitime Rekombination wird als Transposition, die davon betroffenen Gene als Transposons bezeichnet. Gegenüber den anderen Rekombinationen ist hier die DNA für

die Funktion wichtig. Transposons benötigen relativ kurze invertierte Wiederholungen an ihrem Ende (126,127).

Für die folgenden Ergebnisse ist jedoch nur die homologe Rekombination ausschlaggebend.

3.3 Genommutationen

Aufgrund einer zahlenmäßigen Veränderung des Chromosomensatzes kann es zu Haploidie, Polyploidie und Aneuploidie kommen (126,127).

3.4 Rekombinationsfrequenz

Thomas Hunt Morgan (1866-1945) erkannte, dass bestimmte Merkmale meist gekoppelt vererbt wurden, gelegentlich jedoch auch eine Neuverteilung stattfand. Daraus schloss er, dass die Gene in linearer Anordnung vorlagen und die Neukombination durch Austausch von Allelen zustande kam. Diese Crossing-over setzte er gleich den von Janssen beobachteten Chiasmata. In weiteren Experimenten zeigte sich die zunehmende Proportionalität von Cross-over und Entfernung der Allele. Sturtevant erstellte auf dieser Grundlage Chromosomenkarten. Die Abstände der Merkmale wurden aus den Cross-over-Ereignissen geschlossen, woraufhin Haldane 1919 als Maß die Morgan-Einheit einführte (127).

1 Centi-Morgan entspricht dabei etwa 1% Rekombination bzw. etwa 1000 Kilobasen (127,128). Diese Festlegung war rein willkürlich.

Das Dystrophingen (2,4 Mbp) weist über 2 Mbp eine Rekombinationsfrequenz von durchschnittlich 12 % auf (135).

Das entspricht 6 cM/Mbp, demgegenüber das restliche X-Chromosom im Durchschnitt nur eine Frequenz von 1,2 cM/Mbp und das menschliche Genom insgesamt 1,0 cM/Mbp hat (128, 136).

Innerhalb des DMD-Genes gibt es DNA-Abschnitte mit erhöhter Rekombination, sogenannte Hotspots und solche mit weniger häufigen Rekombinationen.

DXS164 ist mit 3% (139), 4% (69) bzw. 5% (129) Rekombinationshäufigkeit ein solcher Hot Spot. Diese Ergebnisse lassen sich mit der mehr als doppelt so hohen Gesamtrekombinationsfrequenz vereinbaren.

Diese hohe Rate an Rekombinationen stellt ein diagnostisches Problem dar und verursacht die Fehlerrate von RFLP basierenden Risikokalkulationen (125, 135).

3.5 Neumutationen

Das Dystrophin-Gen weist neben der hohen Rekombinationsrate allgemein eine hohe Mutationsrate von 10^{-4} (125, 134, 135) auf. Sie ist damit höher als bei allen anderen X-chromosomalen Erkrankungen (134).

Falls die Mutationsrate für Männer und Frauen ähnlich ist (130,134), lässt sich mit der Haldane-Formel

$$x = \mu / (2\mu + v)$$

x : Anteil der Neumutationen

μ : weibliche Mutationsrate

v : männliche Mutationsrate

ein Anteil von 1/3 für die Neumutationen berechnen. Dieser hohe Anteil erklärt die annähernd gleichbleibende Prävalenz bei DMD-Patienten, obwohl diese ihren Gendefekt niemals (ein beschriebener Fall) selbst weitergeben, und somit in jeder Generation ein Anteil verschwindet.

Die Neumutationen stellen neben den Rekombinationen ein Problem bei der Beratung dar. Ebenso verhält es sich mit Keimzellmosaiken, aufgrund derer trotz nachgewiesener Deletionsfreiheit ein Risiko von 10% besteht DMD geerbt zu haben (125).

4. Vorgehensweise

4.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden über 200 Familienstammbäume. Für die Familien wurden bereits im Rahmen der genetischen Beratung am Institut für Humangenetik Würzburg eine Haplotypenanalyse vorgenommen, so dass für jede Person mehrere Allele durch flankierende und intragene Marker bekannt waren. Des Weiteren waren Daten bezüglich der Geburtsjahre und Deletionen vorhanden.

4.2 Methoden

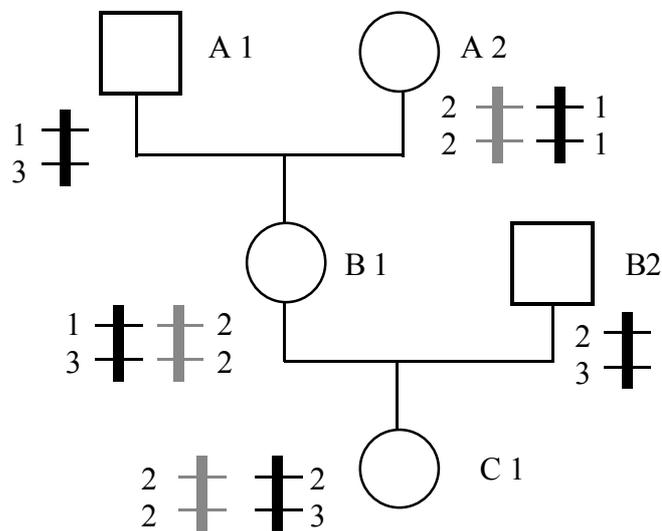
Die Grenzen des zu untersuchenden DNA-Bereiches wurden am 5'-Ende bei den Markern DYS I, II, III und am 3'-Ende bei STR 56 gesetzt. Alle Stammbäume deren Grenzmarker außerhalb des Dystrophingenes und damit der genannten Marker lagen, wurden nicht in die Bewertung mit einbezogen, um einen möglichst gleich großen Genabschnitt zu untersuchen.

Als nächstes musste eine Phase für das Allel festgelegt werden, um eine Rekombination zu erkennen. Dies war nötig, da derzeit bei der Allelbestimmung molekulargenetisch kein Unterschied zwischen väterlichen und mütterlichen Anteil gemacht werden kann. Deswegen konnten nur diejenigen Stammbäume ausgewertet werden, die entweder mindestens aus drei Generationen bestanden oder bei denen die betreffende Frau mindestens zwei Kinder hatte. Alle übrigen Stammbäume wurden nicht in die Wertung einbezogen.

Des Weiteren konnten auch jene Stammbäume nicht berücksichtigt werden, die diese Kriterien zwar erfüllten, für welche sich aber die Phase nicht eindeutig bestimmen ließ.

Wie die Phase festgelegt wurde, verdeutlicht am Beispiel Stammbaum1:

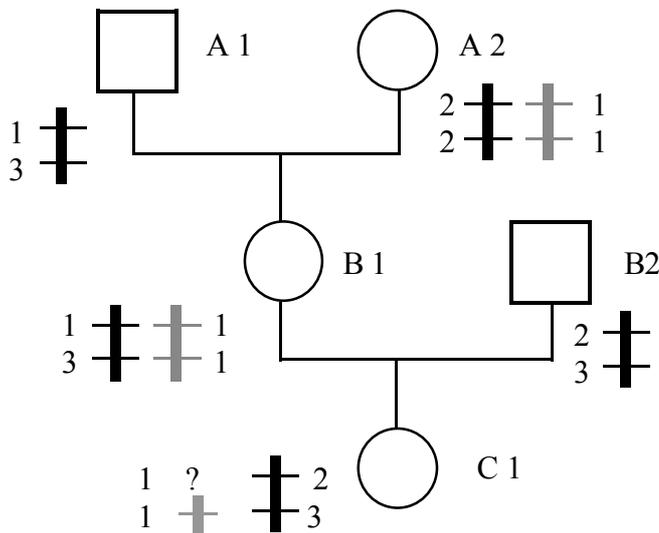
Stammbaum 1: Festlegung der Phase für B1



Für A2 wissen wir, dass sie für den ersten Marker die Allele 1 und 2 besitzt, ebenso für den 2 Marker. Wir wissen jedoch nicht, ob sie von ihren Eltern 2-2 und 1-1 geerbt hat oder 2-1 und 2-1, was auch möglich ist. Bei ihrer Tochter B1 sehen wir, dass sie vom Vater 1-3 geerbt hat, deswegen muss 2-2 von der Mutter stammen. So können wir rückwirkend für A2 die Allele 2-2 und 1-1 bestimmen. Durch die Tochter B1 war diese Zuordnung möglich, die nun wiederum für C1 genutzt werden kann, um ein Cross-over festzustellen. C1 hat von B2 das Allel 2-3 geerbt und von der Mutter 2-2. Somit kann ein Cross-over zwischen diesen Markern ausgeschlossen werden. Das selbe wäre der Fall, wenn C1 von ihrer Mutter das andere Chromosom mit 1-3 geerbt hätte.

Keine genaue Aussage über die Vererbung ist jedoch im folgenden Beispiel gegeben, weshalb solche Stammbäume nicht in die Untersuchung mit einbezogen worden sind.

Stammbaum 2: keine Festlegung der Phase möglich



Durch B1 kann zwar wie im obigen Beispiel die Phase von A2 auf 2-2 und 1-1 festgelegt werden, da B1 vom Vater aber 1-3 geerbt hat kann für die Tochter C1 kein Cross-over nachgewiesen werden, da beide Marker von B1 an erster Stelle das Allel 1 anzeigen.

Um statistische Fehler zu vermindern, wurden die Familien nach der Kinderzahl in Gruppen unterteilt. Damit nicht immer das erste Kind als Phase festgelegt wird und somit nicht in die Bewertung eingeht, habe ich die Kinder je nach Gruppe immer abwechselnd als Ausgangspunkt genutzt. Am Beispiel heißt das: In der Gruppe mit zwei Kindern wurde beim ersten Stammbaum das erste Kind, beim zweiten das zweite und beim dritten wieder das erste Kind festgelegt. Somit soll vermieden werden, dass sich das Alter der Mütter fehlerbedingt erhöht, wenn immer die Erstgeborenen wegfallen. Wenn eine Drei-Generationenfamilie mehr als 1 Kind hatte, wurde die Phase über die Generation bestimmt, so dass alle Kinder in die Bewertung aufgenommen werden konnten.

Durch die Phasenauswertung der Stammbäume blieben 110 Familien übrig, die in die Untersuchung einbezogen wurden. Bei jeder Familie wurde das Kind, welches die Phase bestimmte, ausgeschlossen. Daraus ergibt sich, dass 110 Kinder nicht mit in die Bewertung einbezogen werden konnten.

Die Frauen wurden anschließend nach dem Alter bei der Geburt des Kindes in drei Gruppen eingeteilt.

Gruppe 1: < 30 Jahre (16-30 Jahre)

Gruppe 2: 30-35 Jahre

Gruppe 3: > 35 Jahre (35 –43 Jahre)

Die Festlegung der einzelnen Gruppen in diese Altersklassen wurde von der Vergleichsarbeit von Sherman et al (1994) übernommen (131). Somit lassen sich die Ergebnisse leichter gegenüberstellen.

Die Gruppenstärke belief sich auf

Gruppe 1: 129 Frauen

Gruppe 2: 40 Frauen

Gruppe 3: 20 Frauen

4.3 Statistische Berechnung

Grundlage der Auswertung der Mehrfeldertafel (Tabelle 1) stellt der k*2-Felder- χ^2 - Test nach Brandt und Snedecor dar (140).

$$\chi^2 = \frac{n^2}{x(n-x)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x^2}{n} \right]$$

n = Umfang der gesamten Stichproben

n_j = Umfang der einzelnen Stichprobe j

x = Gesamtzahl der Stichprobenelemente mit dem Merkmal „+“

x_j = Häufigkeit des Merkmals „+“ in der Stichprobe j

Dieser Test wird vor allem bei der Auswertung von qualitativen Merkmalen verwendet. Hiermit lässt sich ermitteln, ob zwei qualitative Merkmale voneinander abhängig sind (Gibt es einen Zusammenhang zwischen Alter und Cross-over-Rate?).

Als Nullhypothese wurde festgelegt, dass es keinen Unterschied bezüglich der Rekombinationsrate in den verschiedenen Altersgruppen gibt. Die Alternativhypothese lautet, dass es einen Unterschied in der Cross-over-Rate gibt.

Des Weiteren ergeben sich bei 3 Altersgruppen 2 Freiheitsgrade ($FG=k-1$), so dass die Nullhypothese ab $\chi^2 > 5,99$ verworfen werden kann.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisübersicht

Cross-over fanden sich in der ersten Gruppe bei 17, in der zweiten Gruppe bei 9 und in der dritten Gruppe bei 2 Frauen. Damit gab es insgesamt 28 Rekombinationen bei 189 Frauen.

Bei 161 Frauen aus allen drei Gruppen fanden sich keine Cross-over (Tabelle 1, Diagramm 1).

Alter	< 30 Jahre	30 – 35 Jahre	> 35 Jahre	Summe
Rekombinationen	17	9	2	28
keine Rekombinationen	112	31	18	161
Gesamtanzahl	129	40	20	189
Prozentanteil der Rekombinationen	0,1318	0,2250	0,1000	0,1481

Tabelle 1

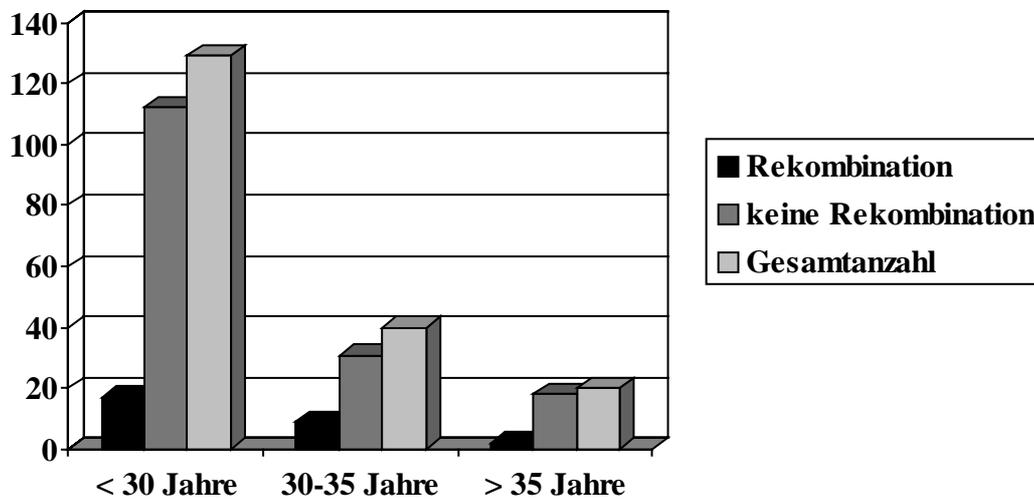


Diagramm 1

5.2 Berechnung

Zur Berechnung dient der in 4.3. genannte Test von Brandt und Snedecor.

$$\chi^2 = \frac{n^2}{x(n-x)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{x_j^2}{n_j} - \frac{x^2}{n} \right]$$

$$\chi^2 = \frac{189^2}{161(189-161)} * \left(\frac{112^2}{129} + \frac{31^2}{40} + \frac{18^2}{20} - \frac{161^2}{189} \right)$$

$$\underline{\underline{\chi^2 = 2,513}} < 5,99$$

χ^2 ist mit 2,513 kleiner als 5,99. Deswegen kann die Nullhypo- these nicht abgelehnt werden; das Ergebnis ist nicht signifikant.

6. Diskussion

Mit dieser Arbeit soll festgestellt werden, ob es eine altersabhängige Veränderung der Rekombinationshäufigkeit innerhalb des DMD-Genes bei Frauen gibt.

Bei der Auswertung konnten die Daten von 110 Familien verwertet werden. Cross-over fanden sich bei 17 von 129 Frauen unter 30 Jahren, 9 von 40 im Alter von 30 bis 35 Jahren und 2 von 20 bei den über 35-jährigen (Tabelle 1, 5.1)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Rekombinationsrate des DMD-Genes altersunabhängig ist. Damit haben junge Schwangere kein höheres Risiko aufgrund einer Rekombination die Mutation zu vererben als Ältere. Dieser Punkt ist vor allem interessant für die Risikoberatung von Betroffenen, da man bezüglich des Alters keinen Unterschied in der Genauigkeit der Vorhersage machen muss bzw. kann.

Demgegenüber steht die Untersuchung von Sherman et al (1994), welche bei der Untersuchung der Rekombinationsrate von Chromosom 21 bei Trisomie eine reduzierte Häufigkeit im höheren Alter fanden (131).

Ein Unterschied dieser Untersuchungen besteht in der Anzahl der Frauen in der jeweiligen Altersgruppe. Bei Sherman et al sind in Gruppe 1 (<30 Jahre) 56, Gruppe 2 (30-35 Jahre) 44 und Gruppe 3 (> 35 Jahre) 41 Frauen vertreten. Die Gruppenstärken sind damit annähernd gleich, wohingegen die Gruppenstärke bei den DMD-Frauen sehr stark variiert. Von Gruppe 1 mit 129, Gruppe 2 mit 40 zu Gruppe 3 mit 20 Frauen. Dies könnte eine mögliche Fehlerquelle darstellen, da gerade in der interessanten Gruppe 3 die wenigsten Frauen vertreten sind. Doch auch bei einer Gruppeneinteilung mit annähernd gleicher Stärke, zeigt sich bei den untersuchten Frauen keine Signifikanz ($p = 1,64 < 5,99$) im Zusammenhang zwischen Alter und Rekombinationsrate (Tabelle 2).

Tabelle 2

Alter	<24 Jahre	24 – 30 Jahre	> 30 Jahre	Summe
Rekombinationen	6	11	11	28
keine Rekombinationen	53	59	49	161
Gesamtanzahl	59	70	60	189

Auch die Untersuchungen der Chromosomen 18 und 16 auf Rekombination bei Trisomie fanden eine reduzierte Rate im höheren Alter (132,133).

Ein weiterer Unterschied dieser Studien, liegt in der Tatsache, dass die Chromosomen 16, 18 und 21 Autosomen sind, wohingegen Chromosom X ein Gonosom ist. Dieses hat vielleicht andere Mechanismen der Anlagerung in der Meiose I, da beim Mann das homologe Chromosom fehlt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Auch das nicht beachten der Phasen kinder stellt eine mögliche Fehlerquelle dar. 110 Kinder konnten deswegen nicht mit in die Betrachtungen eingeschlossen werden. Des weiteren ist denkbar, dass die Phase bei einem Kind mit Rekombination festgelegt wurde und deswegen alle übrigen Kinder falsch positiv mit einer Rekombination diagnostiziert wurden. Wenn die Phasenfestlegung in Zukunft molekular erfolgen kann, würde diese Fehlerquelle wegfallen. Spätestens zu diesem Zeitpunkt wäre eine erneute Untersuchung des Sachverhaltes sinnvoll, um die Risikoberatung verbessern zu können. Einige Familien sind aufgrund der Vererbung gleicher Allele bei Vater und Mutter nicht beurteilbar. Diese Familien könnten in Zukunft bei verbesserter Molekularanalyse ebenso in die Untersuchung mit einbezogen werden und den Stichprobenumfang nochmals erhöhen.

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen Alter und Rekombinationsrate für den Duchenne-Muskeldystrophie-Genabschnitt auf dem X-Chromosom (Xp21.2) zu ermitteln.

Mutationen in diesem Bereich führen je nach Art der Veränderung zur Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder Becker. Die Duchennesche Muskeldystrophie (DMD) endet meist vor dem 20. Lebensjahr mit dem Tod, während die Patienten mit einer Muskeldystrophie vom Typ Becker (BMD) nur eine gering eingeschränkte Lebenserwartung haben.

Aufgrund der infausten Prognose der DMD und der derzeit noch ungenügenden Therapiemöglichkeiten, hat die genetische Beratung einen hohen Stellenwert bei der Betreuung von betroffenen Familien.

In der vorliegenden Arbeit wurden von über 200 am Humangenetischen Institut der Universität Würzburg untersuchten Familien 110 informative Stammbäume ausgewertet. Bei diesen Familien waren bereits im Rahmen der genetischen Beratung mittels Haplotypenanalyse mehrere flankierende und intragene Marker des DMD-Genes bekannt. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Personen zu erreichen, wurden die Grenzen des zu untersuchenden DNA-Bereiches bei den Markern DYS I,II,III sowie STR 56 gesetzt.

Anschließend wurde über eine Eltern-Kind-Generation willkürlich festgelegt, welche Allele vom Vater und welche von der Mutter stammen. Diese Phasenbestimmung war nötig, da die molekulargenetischen Ergebnisse der Alleluntersuchung keine Zuordnung zum väterlichen oder mütterlichen Chromosom zulassen. Kinder, über welche die Phase bestimmt wurde, konnten nicht mit in die Betrachtung einbezogen werden, da bei diesen willkürlich bestimmt wurde, dass es hier kein Cross-over gibt.

Die Frauen wurden anschließend nach dem Entbindungsalter in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 beinhaltet die unter 30-jährigen, Gruppe 2 die 30- bis 35-jährigen und Gruppe 3 die über 35-jährigen Frauen. Rekombinationen fanden sich in Gruppe 1 bei 17 von 129, in Gruppe 2 bei 9 von 40 und in Gruppe 3 bei 2 von 20 Frauen.

Um die Signifikanz der Ergebnisse zu bestimmen, wurde der k*2-Felder- χ^2 -Test nach Brandt und Snedecor verwendet. Als Nullhypothese wurde festgelegt, dass es keinen

Unterschied bezüglich der Rekombinationsrate in den verschiedenen Altersgruppen gibt.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich χ^2 mit 2,513 bestimmen. Bei drei Gruppen entsprechend 2 Freiheitsgraden ist χ^2 erst ab 5,99 signifikant. Damit kann man die Nullhypothese nicht ablehnen, es gibt keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Frauen bei der Entbindung und der Rekombinationsrate. Aufgrund anderer Arbeiten zum Thema Rekombinationsrate bei Autosomen in Abhängigkeit vom Alter wurde eine Abnahme der Rate im höheren Alter erwartet. Dies konnte jedoch bei der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Mögliche Fehlerquellen liegen hierbei in der stark variierenden Gruppengröße, dem Stichprobenumfang und falsch positiver Zuordnung bei der Phasenfestlegung. Außerdem besteht die Möglichkeit eines unterschiedlichen Rekombinationsverhaltens bei Gonosomen im Vergleich zu Autosomen.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist trotz fehlender Signifikanz im Hinblick auf die genetische Beratung so zu beurteilen, daß jüngere Frauen (< 30 Jahre) kein erhöhtes Risiko für eine Rekombination tragen als Ältere (> 35 Jahre) und es damit in der Risikoberechnung bezüglich des Alters keine Unterschiede gibt.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Poeck, K., Hacke, W. (2001) Neurologie, Springer-Verlag, S.674-677
- 2 Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. (2000) Die Innere Medizin, Schattauer, S. 47
- 3 Ganten, D., Ruckpaul, K. (2000), Monogen bedingte Erbkrankheiten 1, Springer-Verlag
- 4 Pongratz, D., Reimers, C.D., Schmidt-Achert, M. (1992) Aktuelle Myologie, Urban&Schwarzenberg
- 5 Jaffe, K.M., McDonald, C.M., Ingman, E., Haas, J. (1990) Symptoms of upper gastrointestinal dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: case-control study, Arch-Phys-Med-Rehabil Sep. 71(10): 742-744
- 6 Bushby, K.M., Thambyayah, M., Gardner-Medwin, D. (1991) Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy, Lancet Apr. 27; 337(8748): 1022-1024
- 7 Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G.P. et al (1994) Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul-Disord. 4: 359-369
- 8 Saito, M., Kawai, H., Adachi, K., Akaike, M. (1994) Clinical feature and mechanism of cardiac failure in patients with Becker muscular dystrophy, Rinsho-Shinkeigaku Feb. 34(2): 134-40
- 9 Sullivan, M. Thompson, W.K. Hill, G.D. (1994) Succinylcholine-induced cardiac arrest in children with undiagnosed myopathy, Can-J-Anaesth. Jun. 41(6): 497-501
- 10 Goodwin, F. Muntoni, F., Dubowitz, V. (1997) Epilepsy in Duchenne and Becker muscular dystrophies, Eur-J-Paediatr-Neurol. 1(4): 115-9
- 11 Yotsukura, M. Yamamoto, A., Kajiwar, T., Nishimura, T., Sakata, K., Ishihara, T., Ishikawa, K. (1999) QT dispersion in patients with Duchenne-type progressive muscular dystrophy Am-Heart-J. Apr. 137(4Pt1): 672-7
- 12 Finsterer, J., Bittner, R.E., Grimm, M. (1999) Cardiac involvement in Becker's muscular dystrophy, necessitating heart transplantation, 6 years before apparent skeletal muscle involvement, Neuromuscul-Disord. Dec. 9(8): 898-600
- 13 Kumagai, T., Miura, K., Ohki, T., Matsumoto, A., Miyazaki, S., Nakamura, M., (2001) Central nervous system involvements in Duchenne/Becker muscular dystrophy, No-To-Hattatsu Nov.33(6): 480-6

- 14 Carter, G.T., Abresch,R.T., Fowler Jr, W.M. (2002) Adaptions to exercise training and contraction-induced muscle injury in animal models of muscular dystrophy, *Am-J-Phys-Med-Rehabil.* Nov.81(11-Suppl):151*61
- 15 Bothwell, J.E., Gordon, K.E., Dooley, J.M., MacSween, J., Cummings, E.A., Salisbury, S. (2003) Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy *Clin-Pediatr-(Phila)* May 42(4): 353-6
- 16 Jeppesen, J.,Green, A., Steffensen, B.F., Rahbek,J. (2003) The Duchenne Muscular dystrophy population in Denmark, 1977-2001: prevalence, incidence and survival in relation to the introduction of ventilator use, *Dec.* 13(10): 804-12
- 17 Schmidh, G.N.,Burmeister, M.A., Lilje, C., Wappler, F., Bischoff, P. (2003) Acute heart failure during spinal surgery in a boy with Duchenne muscular dystrophy, *Jun* 90(6): 800-4
- 18 Reid, J.M., Appleton, P.J., (1999) A case of ventricular fibrillation in the prone position during back stabilisation surgery in a boy with Duchenne's muscular dystrophy, *Apr;* 54(4): 364-7
- 19 Kuller,J.A., Hoffman, E.P., Fries, M.H.,Golbus, M.S. (1992) Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by fetal muscle biopsy, *Hum-Genet.* Sep-Oct; 90(1-2): 34-40
- 20 Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Bushby, K.M.,Gardner-Medwin, D., Curtis, A., Ginjaar, I.B., den-Dunnen, J.T., Welch, J.L., Butler, T.J., Bakker, E., et-al (1993) Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3 Differential diagnosis and prognosis, *J-Med-Genet.* Sep. 30(9): 745-51
- 21 Takeschima, Y. (1998) Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy; clinical application and problems, *No-To-Hattatsu*, Mar;30(2):141-7
- 22 Bennett, R.R., den-Dunnen, J., O'Brien,K.F., Darras, B.T., Kunkel, L.M., (2001) Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing, *BMC-Genet*, 2(1):17
- 23 Fenichel, G.M., Florence, J.M.,Pestronk, A., Mendell, J.R.,Moxley, R.T. 3rd, Griggs, R.C.,Brooke, M.H.,Miller, J.P.,Robison,J., King, W., et-al (1991) Long-term benefit fromprednisone therapy in of Duchenne muscular dystrophy, *Neurology*, Dec; 41(12):1874-7

- 24 Griggs, R.C., Moxley, R.T. 3rd, Mendell, J.R., Fenichel, G.M., Brooke M.H., Pestronk, A., Miller, J.P.,(1991) Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response. *Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group, Arch-Neurol.* Apr: 48(4): 383-8
- 25 Backmann, E.,Henriksson, K.G. (1995) Low-dose prednisolone treatment in Duchenne and Becker muscular dystrophy *Neuromuscul-Disord*, May; 5(3): 233-41
- 26 Yang, L., Luo, J., Petrof, B.J. (1998) Corticosteroid therapy does not alter the threshold for contraction-induced injury in dystrophic (mdx) mouse diaphragm, *Muscle-Nerve.* Mar; 21(3): 394-7
- 27 Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton,G.R., Hoffman, E.P. Kunkel, L.M. (1989) conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts, *Nature*, Jan 12; 337(6203): 176-9
- 28 Karpati, G., Pouliot, Y., Zubrzycka-Gaarn, E., Carpenter, S.,Ray, P.N.,Worton, R.G., Holland, P. (1989) Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation, *Am-J-Pathol.* Jul; 135(1): 27-32
- 29 Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E.,Gilgenkrantz, H., Couton,D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J.C., Perricaudet, M. et al (1993) Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx.mice, *Nature*, Feb 18; 361(6413): 647-50
- 30 Karpati, G., Ajdukovic, D., Arnold, D., Gledhill, R.B., Guttmann, R., Holland, P., Koch, P.A.,Shoubridge,E., Spence,D., Banasse, M. et al (1993) Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy, *Ann-Neurol.* Jul; 34(1): 8-17
- 31 Karpati, G., Acsadi, G., (1993) The potential for gene therapy in Duchenne muscular dystrophy and other genetic muscle disease, *Muscle-Nerve*, Nov; 16(11): 1141-53
- 32 Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato,A.A., King, W., Signore, L.,Prior,T.W., Sahenk,Z., Benson,S., MxAndrew, P.E., Riche, R., et al (1995) Myoblast transfer in the tretment of Duchenne's muscular dystrophy, *N-Engl-J-Med*, Sep 28; 333(13):832-8
- 33 Acsadi, G., Lochmüller, H., Jani, A., Huard, J., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Terof, B.J.,Karpati, G., (1996) Dystrophin exprssion in muscles

- of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer, *Hum-Gene-Ther* Jan 20;7(2): 129-40
- 34 Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Tinsley, J.M., Massie, B., Davies, K.E., Karpati, G. (1998) Efficient utrophin expression following adenovirus gene transfer in dystrophic muscle, *Biochem-Biophys-Res-Commun*, Jan 6; 242(1):244-7
- 35 Bilbert, R. Nalbantoglu, J., Terof, B.J., Ebihara, S., Guibinga, G.H., Tinsley, J.M., Kamen, A., Massie, B., Davies, K.E., Karpati, G., (1999) Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum-Gene-Ther*. May 20; 10(8): 1299-310
- 36 Wakefield, P.M., Tinsley, J.M., Wood, M.J., Gilbert, R., Karpati, G., Davies, K.E., (2000) Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene, *Gene-Ther*. Feb; 7(3): 201-4
- 37 Gussoni, E., Blau, H.M., Kunkel, L.M. (1997) The fate of individual myoblasts after transplantation into muscle of DMD patients, *Nat-Med*, Sep; 3(9): 970-7
- 38 Smythe, G.M., Fan, Y., Grounds, M.D. (2000) Enhanced migration and fusion of donor myoblasts in dystrophic and normal host muscle, *Muscle-Nerve*, Apr; 23(4): 560-74
- 39 White, J.D., Bower, J.J., Kurek, J.B., Austin, L. (2001) Leukemia inhibitory factor enhances regeneration in skeletal muscles after myoblast transplantation, *Muscle-Nerve* May 24(5): 695-7
- 40 Partridge, T. (2002) Myoblast transplantation, *Neuromuscul-Disord*. Oct; 12 Suppl 1: 3-6
- 41 Wang, B., Li, J., Xiao, X. (2000) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*, Dec 5; 97(25): 13714-9
- 42 Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y. (2001) Gene therapy for muscular dystrophies: current status and future prospects, *BioDrugs*; 15(10): 635-44
- 43 Perkins, K.J., Davies, K.E. (2002) The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy *Neuromuscul-Disord*. Oct; 12 Suppl 1: 78-89
- 44 Ebihara, S., Guibinga, G.H., Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Massie, B., Karpati, G., Petrof, B.J. (2000) Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer

- in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice, *Physiol-Genomics*. Sep 8; 32(3): 133-44
- 45 Jasmin, B.J., Angus, L.M., Belanger, G., Chakkalakal, J.V., Gramolini, A.O., Lunde, J.A., Stocksley, M.A., Thompson, J. (2002) Multiple regulatory events controlling the expression and localization of utrophin in skeletal muscle fibers: insights into a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy, *J-Physiol-Paris*, Jan-Mar; 96(1-2): 31-42
- 46 Courdier-Fruh, I., Barman, L., Briguet, A., Meier, T. (2002) Glucocorticoid-mediated regulation of utrophin levels in human muscle fibers, *Neuromuscul-Disord*. Oct; 12 Suppl 1: 95-104
- 47 Cerletti, M., Negri, T., Cozzi, F., Colpo, R., Andreetta, F., Croci, D., Davies, K.E., Cornelio, F., Pozza, O., Karpati, G., Gilbert, R., Mora, M. (2003) Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer, *Gene-Ther*. May; 10(9): 750-7
- 48 Gilbert, R., Dudley, R.W., Liu, A.B., Petrof, B.J., Malbantoglu, J., Karpati, G. (2003) Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (gutted) adenovirus-encoding murine dystrophin, *Mol-Mol-Genet*. Jun 1; 12(11): 1287-99
- 49 Dudley, R.W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Malbantoglu, J., Petrof, B.J., Karpati, G. (2004) Sustained Improvement of Muscle Function One Year After Full-Length Dystrophin Gene Transfer into mdx Mice by a Gutted Helper-Dependent Adenoviral Vector, *Hum-Gene-Ther*. Feb-Mar; 15(2): 145-56
- 50 Davies, K.E., Pearson, P.L., Harper, P.S., Murray, J.M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., Williamson, R. (1983) Linkage analyses of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic-Acids-Res*. Apr 25; 11(8): 2303-12
- 51 Emanuel, B.S., Zackai, E.H., Tucker, S.H. (1983) Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular dystrophy (DMD) locus: X;9 translocation in a female with DMD, *J-Med-Genet*. Dec; 20(6): 461-3
- 52 Kingston, H.M., Sarfarazi, M., Thomas, N.S., Harper, P.S. (1984) Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum-Genet*. 67(1): 6-17

- 53 Dorkins, H. Junien, C., Mandel, J.L., Wrogemann, K., Moison, J.P. Martinez, M., Old, J.M., Bunday, S., Schwartz, M., Carpenter, N. et al (1985) Segregation analyses of a marker localised Xp21.2-Xp21.3 in Duchenne and Becker muscular dystrophy families. *Hum-Genet.* 71(2): 103-7
- 54 Wilcox, D.E., Affara, N.A., Yates, J.R., Ferguson-Smith, M.A., Pearson, P.L. (1985) Multipoint linkage analyses of the short arm of the human X chromosome in families with X-linked muscular dystrophy. *Hum-Genet.* 70(4): 365-75
- 55 Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Colletti-Feener, C., Kunkel, L.M. (1987) Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum-Genet.* 75(3): 221-7
- 56 Koenig, M. Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., Kunkel, L.M. (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* Jul 31; 50(3): 509-17
- 57 Burghes, A.H., Logan, C., Hu, X., Belfall, B., Worton, R.G., Ray, P.N. (1987) A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature.* 30-Aug 5; 328(6129): 434-7
- 58 Dubowitz, V. (1986) X-autosome translocations in females with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Nature* 322: 291-292
- 59 Francke, U., Ochs, H.D., Martinville, B. et al (1985) Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am-J-Hum-Genet* 37: 250-267
- 60 Hoffman, E.P., Brown, R.H. Jr, Kunkel, L.M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* Dec 24; 51(6): 919-28
- 61 Forrest, S.M., Cross, G.S., Speer, A., Gardner-Medwin, D., Burn, J., Davies, K.E., (1987) Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature.* Oct 15-21; 329(6140): 638-40
- 62 Forrest, S.M., Cross, G.S., Flint, T., Speer, A., Robson, K.J., Davies, K.E., (1988) Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* Feb; 2(2): 109-14

- 63 Koenig, M., Monaco, A.P., Kunkel, L.M. (1988) The coimplete seyquence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell. Apr 22; 53(2): 219-26*
- 64 Hoffman, E.P. Fischbeck, K.H., Brown, R.H., Johnson, M., Medori,R., Loike, J.D., Harris, J.B., Waterston, R., Brooke, M., Specht. L. et al (1988) Characterization of dystrophinin muscle-biopsy specimens form patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N-Engl-J-Med. May 26; 318(21): 1363-8*
- 65 Zybrzycka-Gaarn. E.E.,Bulman, D.E., Karpati, G., Burghes, A.H., Belfall, B., Klamut, H.J., Talbot, J., Hodges, R.S., Ray, P.N., Worton, R.G. (1988) The Duchenne muscular dystrophy gene product ist localized in sarcolemma of hman skeletal muscle. *Nature. Jund 2; 333(6172): 466-9*
- 66 Bonilla, E., Samitt, C.E., Miranda, A.F., Hays, A. P., Salviati,G.,DiMauro, S., Kunkel, L.M., Hoffman, E.P., Rowland, L.P. (1988) Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell Aug 12; 54(4): 447-52*
- 67 Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy,Z., Neuman, S., Yaffe, D. (1989) Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature. Jan 5: 337(6202): 76-8*
- 68 Baumbach. L.L., Chamberlain, J.S., Ward, P.A., Farwell, N.J.,Caskey, C.T. (1989) Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology Apr; 39(4): 465-74*
- 69 Monaco, A.P., Berelson, C.J.,Liechti-Gallati,S., Moser, H., Kunkel, L.M. (1988) An explanation for phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics 2: 90-95*
- 70 Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H. et al (1989) The moleculr basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am-J.-Hum-Genet. Oct; 45(4): 498-506*
- 71 Buyhby, K.M. (1992) Genetic and clinical correlations of Xp21 muscular dystrophy. *J-Inherit-Metab-Dis. 15(4): 551-64*

- 72 Bushby, K.M. Gardner-Medwin, D., Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Haggerty, I.D. (1993) The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J-Neurol.* Feb; 240(2): 105-12
- 73 Blonden, L.A., Grootsholten, P.M., den-Dunnen, J.T., Bakker, E., Abbs, S., Bobrow, M., Boehm, C., van-Broeckhoven, C., Baumbach, L., Chamberlain, J. et al. (1991) 242 breakpoints in the 200-kb deletion-prone P20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics.* Jul; 10(3): 631-9
- 74 Nachman, M.W., Crowell, S.L., (2000) Contrasting evolutionary histories of two introns of the Duchenne muscular dystrophy gene, *Dmd* in humans. *Genetics.* Aug; 155(4): 1855-64
- 75 Mallikarjuna-Rao, G.N., Hussain, T., Geetha-Devi, N., Jain, S., Chandak, G.R., Ananda-Raj, M.P. (2003) Deletions in South Indian Duchenne muscular dystrophy patients. *Indian-J-Med-Sci.* Jan; 57(1): 1-6
- 76 Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Bushby, K.M., Gardner-Medwin, D., Curtis, A., Ginjaar, I.B., den-Dunnen, J.T., Welch, J.L., Butler, T.J., Bakker, E. et al (1993) Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 2. Correlations within individual patient. *J-Med-Genet.* Sep; 30(9): 737-44
- 77 Nevo, Y., Muntoni, F., Sewry, C., Legum, C., Kutai, M., Harrel, S., Dubowitz, V., (2003) Large in-frame deletions of the rod-shaped domain of the dystrophin gene resulting in severe phenotype. *Isr-Med-Assoc-J.* Feb; 5(2): 94-7
- 78 Carpenter, S., Karpati, G., Zubrzycka-Gaarn, E., Bulman, D.E., Ray, P.N., Worton, R.G., (1990) Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle-Nerve.* May 13(5): 376-80
- 79 Petrof, B.J., Sharger, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., Sweeney, H.L. (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* Apr 15; 90(8): 3710-4
- 80 Petrof, B.J., (1998) The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Feb; 179(1-2): 111-23*

- 81 Greenberg, C.R., Rohringer, M., Jacobs, H.K., Averill, N., Nylen, E., van-Ommen, G.I.J., Wrogemann, K. (1988) Gene studies in newborn males with Duchenne muscular dystrophy detected by neonatal screening. *Aug* 20; 2(8608): 425-7
- 82 White, S., Kalf, M., Liu, Q., Villerius, M., Engelsma, D., Kriek, M., Vollebregt, E., Bakker, V., van-Ommen, G.J., Breuning, M.H., den-Dunnen, J.T. (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Aug*; 71(2): 365-74
- 83 Liu, Y.M., Feng, Z.C., Fang, Z.W. (2002) technique in genetic diagnosis of Duchenne /Becker muscular dystrophy. *Di-Yi-Jun-Yi-Da-Xue-Xue-Bao*. *Aug*; 22(8): 731-3
- 84 Xiao, Y., Jiang, X., Wang, R. (2003) Screening for DMD/BMD deletion carriers by fluorescence in situ hybridization. *Genet-Test*. 7(3): 195-201
- 85 Giradet, A., Hammamah, S., Cechaud, H., Anahory, T., Coubes, C., Hedon, B., Demaille, J., Claustres, M. (2003) Specific detection of deleted and non-deleted dystrophin exons together with gender assignment in preimplantation genetic diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Mol-Hum-Reprod*. *Jul*; 9(7): 421-7
- 86 Tay, J.S., Lai, P.S., Low, P.S., Lee, W.L., Gan, G.C. (1992) Pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy: the calcium hypothesis revisited. *J-Paediatr-Child-Health*. *Aug*; 28(4): 291-3
- 87 Huard, J., Cao, B., Qu-Petersen, Z. (2003) Muscle-derived stem cells; potential for muscle regeneration. *Birth-Defects-Res-Part-C-Embryo-Today*. *Aug*; 69(3): 230-7
- 88 Ohlendieck, K., Campbell, K.P. (1991) Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS-Lett*. *Jun* 3; 283(2): 230-4
- 89 Cullen, M.J., Walsh, J., Nicholson, L.V., Harris, J.B., Zubrzycka-Gaarn, E.E., Ray, P.N., Worton, R.G. (1991) Immunogold labelling of dystrophin in human muscle, using an antibody to the last 17 amino acids of the C-Terminus. *Neuromuscul-Disord*. 1(2): 113-9
- 90 Hammonds, R.J., (1987) Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha actinin. *Cell* 51:1

- 91 Prior, I.T.W., Cartolo, C., Papp, A.C. et al. (1997) Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frameshift deletion. *Neurology* 48: 486-88
- 92 Bittner, R.E., Shorny, S., Streubel, B., Hübner, C., Voit, T., Kress, W. (1995) Serum antibodies to the deleted dystrophin sequence after cardiac transplantation in a patient with Becker's muscular dystrophy. *N-Engl-J-Med.* 333:732-733
- 93 Emery, A.E.H. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular disease – a world survey. *Neuromuscul-Disord.* 1: 19-29
- 94 Kissel, J.T., Burrow, K.L., Rammohan, K.W., et al (1991) Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41: 667-672
- 95 Malhatra, S.B., Hart, K.A., Klamut, H.J. et al (1988) Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242: 755-759
- 96 Gangopadhyay, S.B., Sherratt, T.G., Heckmatt, J.Z. et al (1992) Dystrophin in frame-shift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am-J-Hum-Genet.* 51: 562-570
- 97 Beggs, A.H. and Kinkel, L.M. (1990) Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J-Clin-Invest.* 85: 613-619
- 98 Abbs, S., Yau, S.C., Clark, S. et al (1991) A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J-Med-Genet.* 28: 304-311
- 99 Roverts, R.G., Barby, T.F.M., Manners, E. et al (1991) Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am-J-Hum-Genet.* 9:298-310
- 100 Acsadi, G., Dcison, G., Love, D.R., et al. (1991) Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 353: 815-18
- 101 Geenstein, R.M., Reardon, M.P., Chan, T.S. (1977) An X-autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence for DMD gene localization. *Pediatr-Res.* 11:457

- 102 Sadulet-Puccio, H.M., Kunkel, L.M. (1996) Dystrophin and its isoforms. *Brain-Pathol.* 6:25-35
- 103 Lederfein, D., Levy, S., Augier, N., et al (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscular tissues. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 89: 5346-5350
- 104 Makover, A., Zuk, D., Breakston, E. et al. (1991) Brain-type and muscle-type promoters of the dystrophin gene differ greatly in structure. *Neuromuscul-Disord.* 1:39-45
- 105 Gillard, E.F., Chamberlain, J.S., Murphy, E.G., et al (1989) Molecular and phenotypic analyses of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am-J-Hum-Genet.* 45:507-520
- 106 Nigro, V. G., Politano, L., Nigro, V., Petretta, V.R., Comi, L.I. (1994) Mutation of dystrophin gene and cardiomyopathy. *Neuromuscul-Disord.* 4: 371-379
- 107 Perloff, J.K. (1984) Cardiac rhythm and conduction in Duchenne muscular dystrophy. *J-Amer-Coll-Cardiol.* 3, 1263-1268)
- 108 Perloff, J.K., Henze, E., Schelbert, H.R. (1984) Alterations in regional myocardial metabolism, perfusion and wall motion in Duchenne muscular dystrophy studied by radionuclide imaging. *Circulation* 69, 33-42;
- 109 Perloff, J.K., Robverts, W.C., de Leon, A.C., O'Doherty, D. (1967) The distinctive electrocardiogram in Duchenne muscular dystrophy. *Amer. J. Med.* 42, 179-188;
- 110 Sanyal, S.K., Johnson, W.W., Thapar, M.K., Pitner, S.E., (1978) An ultrastructural basis for the electrocardiographic alterations associated with Duchenne progressive muscular dystrophy. *Circulations* 57, 1122-1129
- 111 Barohn, R.J., Levine, E.J., Olson, J.D. Mendell, J.R. (1988) Gastric hypomotility in Duchenne's Muscular dystrophy. *N-Engl-J-Med.* 319: 15-18
- 112 Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C. (1994) *Myology*, vol II, 2nd edn. McGraw-Hill, New York
- 113 Janka, M., Grimm, T. (1991) Bedeutung des Keimzellmosaiks für die genetische Beratung von Familien mit Muskeldystrophie Duchenne und Becker. *klin Padiatr* 203: 354-358

- 114 Straub, B., Bittner, R.E., Léger, J.J. Voit, T. (1992) Direct visualization of dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J-Cell-Biol.* 119: 1183-1191
- 115 Pasternak, C., Wong, S., Elson, E.L. (1995) Mechanical function of dystrophinin muscle cell. *J-Cell-Bio..* 128: 355-361
- 116 Emery, A.E.H., Burt, D. (1980) Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *BMJ* 48: 355-361
- 117 Franco, A., Lansman, J.B. (1990) Calciumentry through stretch-inactivated ionchannels in mdx myotubes. *Nature* 344: 670-3
- 118 Fong, P. Turner, P.R., Denetclaw, W.F., Steinhardt, R.A., (1990) Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne humanand mdx mouse origin. *Science* 250: 673-675
- 119 Muntoni, F., Wilson,L., Marrosu, G. et al. (1995) A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J-Clin-Invest.* 96: 693-699
- 120 Dubowitz, V. (1995) *Muscle Disorders in Childhood*, 2nd edn, W.B. Saunders Company Ltd, S.34-133
- 121 Strachan T, Read AP (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum, Heidelberg
- 122 Vrints,C., Mercelis, R., Vanagt, E., Snoeck,J., Matrin, J. (1983) Cardiac manifestations of Becker-type muscular dystrophy. *Acta-Cardiol.* 38:479-86
- 123 Yazawa, M., Ikeda, S., Owa, M., Haruta, S., Yanagisawa, N., Tanaka, E., Watanabe, M., (1987) A family of Becker's progressive muscular dystrophy with severe cardiomyopathy. *Europ-Neurol.* 27: 13-19
- 124 Angelini, C.,Fanin,M., Pegoraro,E., Freda, M.P., Cadaldini, M, Martinella, F. (1994) Clinical-molecular correlation in 104 mild X-linked muscular dystrophy patients: characterizationof subclinical phenotypes. *neuromuscul-Disord.* 4:349-358
- 125 *Medizinische Genetik* (1999) Nummer 4, 11. Jahrgang
- 126 Munk, K (2001) *Grundstudium Biologie Genetik*. Spektrum, Heidelberg
- 127 Hennig, W. (1998) *Genetik*, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin
- 128 Buselmaier, W., Tariverdian, G. (1999) *Humangenetik*, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin

- 129 Fischbeck, K.H., Ritter, A.W., Tirschwell, D.L, Kunkel, L.M., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Hejtmancik, J.F., Boehm, C., Ionasescu, V., Ionasescu, R., Pericak-Vance, M., Kandt, R., and Roses, A.D. (1986) Recombination with Pert87(DXS164) in families with X-linked muscular dystrophy. *Lacet* 2: 104
- 130 Müller, B., Dechant, C., Meng, G., Liechti-Gallati, S., Doherty, R.A., Hejtmancik, J.F., Bakker, E., Read, A.P., Jeanpierre, M., Fischbeck, K.H., et al (1992) Estimation of the male and female mutation rates in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Hum-Genet.* May; 89(2): 204-6
- 131 Sherman, S.L., Petersen, M.B., Freeman, S.B., Hersey, J., Pettay, D. Taft, L., Prantzen, M., Mikkelsen, M., Hassold, T.J., (1994) Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Vo. 3, No. 9: 1529-1535*
- 132 Hassold, T., Merrill, M., Adkins, K., Freeman, S., Sherman, S., (1995) Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16, *A-J-Hum-Genet.* 57:867-874
- 133 Bugge, M., Collins, A., Pettersen, M.B., Fiischer, J., Brandt, C., Hertz, J.M., Tranebjaerg, L., deLozier-Blanchet, C., Nicolaidis, P., Brondum-Nielsen, K., Morton, N., Mikkelsen, M. (1998) Non-disjunction of chromosome 18, *Hum-Mol-Genet.* Vol 7, No 4: 661-669
- 134 Moser, H. (1984) Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum-Genet* 66: 17-40
- 135 Abbs, S., Roberts, R.G., Mathew, C.G., Bentley, D.R., Bobrow, M. (1990) Accurate Assessment of Intragenic Recombination Frequency within the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Genomics.* Aug; 7(4): 602-6
- 136 Drayna, D., and White, R. (1985) The genetic linkage map of the X chromosome. *Science* 230: 6-13
- 137 Yuan, L., Liu, J.G., Hoja, M.R., Wilbertz, J., Nordqvist, K., Höög, C. (2002) Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science.* May 10; 296(5570), pp. 1115-8
- 138 Vormittag, W. (1977) Age dependence of chromosomal findings. *Acta-Med-Austriaca;* 4(1), pp 1-6

- 139 Donald, J.A., Morgan, G., Chen, J.D., Serravalle, S., Colley, P., Denton, M.J. (1987) Recombination between Duuchenne muscular dystrophy and DNA marker DXS164 (Pert87). *Lancet*. Jan3; 1(8523): 39-40
- 140 Sachs, L. (1983) *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag, S. 356-360

Danksagung:

Abschließend bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm für die Überlassung des Themas und die stets geduldige und freundliche Unterstützung sehr herzlich.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Antje Rudorf
Geburtsdatum: 11.08.1977
Geburtsort: Gera
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1991 Polytechnische Oberschule Julius Fucik, Gera
1991 – 1996 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Gera

Berufsausbildung

10/1996 – 09/1999 Ausbildung zur exam. Krankenschwester am Krankenhaus
Rothenburg o.d.T. gGmbH

Hochschulbildung

10/1999 – 09/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
09/2001 Physikum
10/2001 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
09/2002 1. Staatsexamen
09/2004 2. Staatsexamen
11/2005 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

10/2004 – 02/2005 Klinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg
02/2005 – 05/2005 LKH Missionsärztliche Klinik Würzburg
05/2005 – 09/2005 LKH Klinikum Coburg

Würzburg, den 15.11.2005

Antje Rudorf