

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. T. Haaf

**Berechnung des Verhältnisses k
der Mutationsraten von Spermatogenese zu Oogenese
bei Muskeldystrophie Duchenne**

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

vorgelegt von
Christina Schäfer
aus Volkach
Würzburg, Oktober 2014



Referent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Februar 2015

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Stand des Wissens.....	3
2.1 Klinik der Muskeldystrophie Duchenne	3
2.2 Genetik	5
2.2.1 Formale Genetik.....	5
2.2.2 Molekulargenetik	8
2.3 Diagnostik	9
2.3.1 Diagnostik beim Betroffenen	9
2.3.2 Diagnostik bei weiblichen Angehörigen	12
2.4 Therapie.....	14
2.5 Die humangenetische Beratung Angehöriger von DMD-Patienten	16
2.5.1 Problembeschreibung.....	16
2.5.2 Risikoberechnung.....	17
3. Theoretische Überlegungen und Methoden	21
3.1 Grundlagen der Risikoberechnung	21
3.2 Mögliche Haplotyp-Konstellationen.....	24
3.2.1 Ursachen für eine DMD-Erkrankung und Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens	24
3.2.2 Wahrscheinlichkeit eines GVH oder GMH.....	29
3.2.3 Berechnung der Gesamtwahrscheinlichkeit von GVH und GMH....	33
4. Ergebnisse	35
4.1 Einschlusskriterien und Beschreibung des Patientenguts.....	35
4.2 Verteilung der gefundenen Mutationen	38
4.3 Berechnung von k	40
4.3.1 k für Deletionen	42
4.3.2 k für Duplikationen.....	43
4.3.3 k für Punktmutationen	43
5. Diskussion	45
5.1 Häufigkeitsangaben für die verschiedenen Mutationstypen	45
5.2 Fallzahlen für Duplikationen.....	45
5.3 k im Vergleich mit anderen Studien	46
5.4 Hypothesen zur Entstehung verschiedener Mutationstypen	49
5.5 Geschlechtsabhängige Mutationsraten bei anderen Krankheiten	50
5.6 Konsequenzen für die Risikoberechnung	52
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	58
8. Abkürzungsverzeichnis.....	73
9. Darstellungsverzeichnis.....	75

1. Einleitung

Bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) handelt es sich um eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Mit 1:3500 männlichen Geburten gehört sie zu den häufigsten genetisch determinierten Erkrankungen. Von seltenen Ausnahmen abgesehen, erkranken ausschließlich Jungen. 1868 wurden die Symptome der nach ihm benannten Muskeldystrophie ausführlich von Guillaume Benjamin Amand Duchenne (Duchenne 1868) beschrieben. Schon er erkannte bei seinen „petits malades“ unter anderem eine zunehmende Gliederschwäche und eine scheinbare Hypertrophie der Muskulatur als Leitsymptome.

DMD verläuft trotz des medizinischen Fortschritts progredient und ist bis heute nicht heilbar. In der Diagnostik werden verschiedene Methoden von Muskelbiopsie über Enzymbestimmungen bis hin zu molekulargenetischen Verfahren angewandt.

Gegenstand der genetischen Beratungen ist neben der Diagnosesicherung durch den Mutationsnachweis im Dystrophin-Gen insbesondere die Klärung des Konduktorinnenstatus von weiblichen Angehörigen, also möglichen Überträgerinnen. Durch verbesserte Diagnosemethoden können heute die meisten Mutationen im Dystrophin-Gen sicher nachgewiesen werden. Dennoch bleiben auch heute noch Mutationen unentdeckt bzw. sind beim Indexpatienten nicht bekannt.

In diesen Fällen ist eine ausführliche Risikoberechnung im Rahmen einer humangenetischen Beratung vonnöten, um das Heterozygotenrisiko, also die Wahrscheinlichkeit, Überträgerin einer Mutation im Dystrophin-Gen zu sein, valide berechnen zu können.

In diese Berechnung fließen - neben Stammbauminformationen und dem CK-Wert - verschiedene Faktoren ein. Dazu gehören die Inzidenz verschiedener

Mutationsarten, der Anteil von Neumutationen und Keimzellmosaikern, sowie die Mutationskonstanten k_{Deletion} , $k_{\text{Duplikation}}$ und $k_{\text{Punktmutation}}$. Diese k -Werte beschreiben die unterschiedliche Entstehungswahrscheinlichkeit der einzelnen Mutationstypen in Spermatogenese oder Oogenese.

Ziel dieser Arbeit ist es, die in die Risikoberechnung für von DMD betroffenen Familien einfließenden Mutationskonstanten k für Deletion, Duplikation und Punktmutation im Dystrophin-Gen möglichst genau zu bestimmen.

Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit eine erneute Sichtung des Würzburger Patientenguts vorgenommen, welches bereits im Jahr 1994 auf die Herkunft von DMD-verursachenden Mutationen in Spermatogenese und Oogenese hin untersucht wurde (Grimm et al. 1994). Gründe für die neuerliche Sichtung waren neue Erkenntnisse durch beispielsweise weitere Erkrankungsfälle in den Familien oder einen genauen Mutationsnachweis, der in den Jahren zuvor nicht gelungen war. Zusätzlich wurden alle Familien, die sich seit 1994 bis zum Jahr 2007 wegen DMD im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg vorgestellt hatten, in die Analyse mit einbezogen.

Anders als in vorherigen Untersuchungen (Grimm et al. 1994; Tuffery et al. 1998; Grimm et al. 2009) wurden nun Familien, in denen seit Generationen DMD-Erkrankte auftreten, sowie Geschwisterfälle ausgeschlossen. Zudem wurde ein besonderes Augenmerk auf das Vorliegen molekulargenetischer Untersuchungen und einer Muskelbiopsie zur Diagnosesicherung gelegt, um z.B. autosomal-rezessive Phänokopien und Gliedergürtelmuskeldystrophien auszuschließen. Diese werden in ca. 5 % der Fälle (Stec et al. 1995) als DMD-Erkrankung fehlgedeutet. Damit könnten sie zu einer Verfälschung der k -Werte geführt haben. Durch dieses Vorgehen konnten in der hier vorliegenden Arbeit die Mutationskonstanten k präzisiert werden, was zu einer verbesserten Risikokalkulation in der genetischen Beratung der von DMD betroffenen Familien führen wird.

2. Stand des Wissens

2.1 Klinik der Muskeldystrophie Duchenne

An DMD erkrankte Jungen fallen schon relativ früh im Kleinkindalter durch eine gewisse Ungeschicklichkeit, schnellere Ermüdung und Kraftlosigkeit auf. Letztere betrifft besonders den Beckengürtel. Die motorische Entwicklung kann bereits verzögert sein. Das freie Gehen beispielsweise wird von den betroffenen Jungen oft erst mit 18 Monaten oder später erlernt. Auffällig ist dabei bereits ein breitbeiniger so genannter „Watschelangang“ aufgrund der vorrangigen Betroffenheit der Beckengürtelmuskulatur. Dies zeigt sich auch am Gowers-Zeichen, dem mühsamen „An-sich-selbst-Hochklettern“ aus dem Sitzen vom Boden (Gowers 1879; Abbildung 1), und einer Ungeschicklichkeit beim Treppensteigen. So müssen sich die Jungen am Geländer festhalten und schaffen es nicht, die Treppe im Wechselschritt zu erklimmen. Viele Eltern berichten auch über eine raschere Ermüdung ihrer Söhne während Spaziergängen (Korinthenberg 2008).

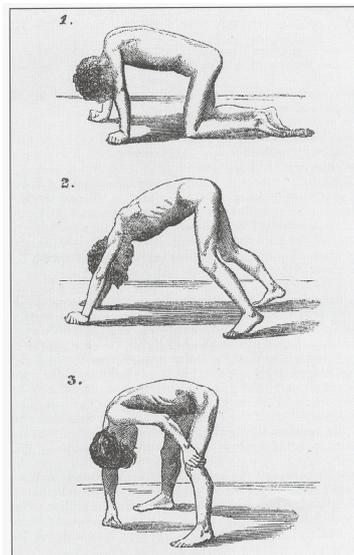


Abbildung 1 Gowers-Zeichen. Das freie Aufstehen ist den von DMD betroffenen Jungen nicht möglich. Nur mühevoll kommen sie aus dem Sitzen auf dem Boden zum Stand.

Eine bei DMD beobachtete Verzögerung der Sprachentwicklung wurde in einer Vergleichstudie von an DMD-erkrankte Jungen und deren Geschwistern untersucht. Die Arbeitsgruppe um Cyrulnik beschäftigte sich mit dem Erreichen von motorischen und sprachlichen Meilensteinen. Ein verzögerter Sprachbeginn ging dabei häufig mit einer späteren kognitiven Beeinträchtigung einher. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen den im Gehirn für die Koordination komplexer Bewegungsabläufe zuständigen Regionen (z.B. dem Kleinhirn) und der Entwicklung kognitiver Fähigkeiten (Cyrulnik et al. 2007).

Durch Einlagerung von Binde- und Fettgewebe in die Myozyten (Böcker et al. 2004) erscheint die Wadenmuskulatur zunehmend hypertrophiert, bildhaft beschrieben als „Gnomenwaden“.

Zeichen der fortschreitenden Muskelschwäche sind eine lumbale Hyperlordose sowie Scapulae alatae. Im weiteren Verlauf entstehen Beugekontrakturen und häufig auch eine Lumbalskoliose (Forst 2000). Derartige Komplikationen führen bei über der Hälfte der Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen zu chronischen Schmerzen, die Auswirkungen auf die soziale Teilhabe und die allgemeine Lebensqualität haben (Engel et al. 2009).

Um das zehnte Lebensjahr besteht bei den Betroffenen eine zunehmende Pflegebedürftigkeit und Gehunfähigkeit. Bei DMD wird gelegentlich - aber seltener als bei Muskeldystrophie Typ Becker (BMD) - eine dilatative Kardiomyopathie mit konsekutiver Herzinsuffizienz beobachtet (Korinthenberg 2004). Diese entsteht durch eine durch das Fehlen von Dystrophin bedingte Schädigung des Sarkolemms und letztlich dem Niedergang der Kardiomyozyten (Ameen und Robson 2010).

Aufgrund der Schwere der Erkrankung und des frühen Krankheitsbeginns haben die DMD-Patienten keine Nachkommen. Die Lebenserwartung von an

DMD erkrankten Jungen liegt auch heute nur bei circa 25 - 30 Jahren (van Essen et al. 1992a; Rall und Grimm 2012). Häufig führen bei zunehmender chronischer Ateminsuffizienz akute Infektionen zum Tod der Patienten (Hübner et al. 2009). Durch verbesserte Behandlungsmöglichkeiten respiratorischer Probleme rückt die dilatative Kardiomyopathie als Todesursache jedoch in den Vordergrund (Ameen und Robson 2010).

2.2 Genetik

2.2.1 Formale Genetik

Die Vererbung der DMD verläuft X-chromosomal-rezessiv. Jeder männliche Nachkomme einer Mutationsträgerin hat ein Erkrankungsrisiko von 50 %. Die Töchter von Carriern tragen zu 50 % dieses Merkmal. Fast ausschließlich Männer sind betroffen. Sie erkranken, sobald eine Mutation des Dystrophin-Gens auf dem X-Chromosom vorliegt.

♂ ♀	Y	X
X	XY	XX
x	xY	xX

Abbildung 2 Kreuzungsschema X-chromosomaler Erbgang. Bei X-chromosomal rezessiven Erbgängen sind weibliche Nachkommen von heterozygoten Frauen zu 50 % ebenfalls Trägerinnen einer Mutation. Söhne heterozygoter Frauen erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 %.

Als seltene Ausnahme erwähnenswert ist der Fall eines Klinefelter-Mannes mit dem Karyotyp XXY, der durch diese numerische Chromosomenaberration

nicht an DMD erkrankte (Würzburger Fallnummer G 93-164).

Verschiedene zu DMD führende Mutationstypen sind bekannt. Am häufigsten finden sich Deletionen (etwa 60% - 65%). Die Angaben für die Häufigkeit von Punktmutationen und Duplikationen schwanken in der Literatur. Punktmutationen machen etwa 25-35 % aller Mutationen bei DMD aus (Dolinsky et al. 2002; Grimm et al. 2009). Duplikationen treten in ca. 5-10 % auf (Den Dunnen et al. 1989, White et al. 2002).

Bestimmte Exons sind dabei häufiger von Deletionen betroffen. Auffällig sind gewisse hot-spots im Bereich der Exons 3-19 und der Exons 44-52 im Dystropin-Gen (Florentin et al. 1995; Tuffery et al. 1998). Etwa 75 % aller in einer griechischen Studie untersuchten Deletionen im Dystrophin-Gen lagen in diesen Bereichen (Florentin et al. 1995). Die Arbeitsgruppe um Tuffery konnte für Frankreich nachweisen, dass ca. 16 % der Deletionen im Dystrophin-Gen im Bereich der Exons 3-19 lagen. 79 % der Deletionen im Dystrophin-Gen wurden im Bereich der Exons 41 - 60 entdeckt (Tuffery et al. 1998).

Eine Untersuchung aus Nordchina an 179 Patienten ermittelte ähnliche hot spots in den Exons 45-50. Die Autoren um Wang unterschieden dabei nochmals nach Single-Exon-Deletionen und Multi-Exon-Deletionen. Im Exon 51 und 52 ergaben sich die meisten Ein-Exon-Deletionen. Waren mehrere Exons von einer Deletion betroffen, lagen diese im Bereich der Exons 45 - 50. Wang et al. führen dies darauf zurück, dass die entsprechenden Introns durch sehr viele repetitive Sequenzen mehr Bruchstellen besitzen und damit die Exons häufiger als andere von Deletionen betroffen sind (Wang et al. 2008). Dies wurde bereits 2002 von Pozzoli et al. vermutet (Pozzoli et al. 2002). In einer europaweit durchgeführten Studie wurde beobachtet, dass sich diese bevorzugten Orte der Deletion im Dystrophin-Gen in verschiedenen Populationen unterscheiden, was auf die Gendrift zurückgeführt wird (Danieli et al. 1993).

Für Punktmutationen ist das hot-spots-Phänomen nicht beschrieben. Diese sind relativ gleichmäßig über das gesamte Dystrophin-Gen verteilt (Dolinsky et al. 2002).

Für die Schwere der Krankheit ist dabei nicht die Größe der Mutation ausschlaggebend, sondern die Funktionsfähigkeit des Dystrophin-Gens (Koenig et al. 1989; Gillard et al. 1989). In einer 2005 veröffentlichten Untersuchung an BMD-Patienten wurde gezeigt, dass bei zusätzlichem Verlust der Hinge-III-Region (Exon 50-51) sogar ein milderes klinisches Bild entstehen kann als bei einer kürzeren Mutation (Carsana et al. 2005).

Die Inzidenz liegt für DMD bei 30×10^{-5} (Emery 1991; Kress et al. 2002). Die Neumutationsrate μ beträgt ungefähr 10^{-4} . Sie ist damit im Vergleich zu anderen Erbkrankheiten sehr hoch. Die Ursache für DMD liegt gemäß der Leseraster-Theorie zumeist in einer out-of-frame-Mutation im Dystrophin-Gen (Genort Xp21.2) (Kress et al. 2002).

Liegt eine out-of-frame-Mutation im Dystrophin-Gen vor, kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Es entsteht ein kurzes und zumeist völlig funktionsloses Protein durch Bildung eines Stopp-Codons, Dystrophin wird nicht oder nicht ausreichend gebildet und es kommt zur Muskeldystrophie.

Mit dieser Leseraster-Theorie lässt sich erklären, warum die Becker-Muskeldystrophie BMD, deren Ursache auf dem gleichen Genort liegt, milder verläuft: Das Leseraster wird bei BMD nicht verschoben (sogenannte in-frame-Mutation), was dazu führt, dass das veränderte Protein dennoch eine Restfunktion behält.

In wenigen Fällen entstehen Ausnahmen von der Leseraster-Theorie durch alternatives Spleißen oder durch sekundäre Auswirkungen auf die Transkription oder Translation (Malhotra et al. 1988; Den Dunnen et al. 1989). Eine Untersuchung von Patientendaten der Datenbank der Universität Leiden

aus dem Jahr 2006 zeigte eine Übereinstimmung von 91 % mit der Leserastertheorie (Aartsma-Rus et al. 2006).

2.2.2 Molekulargenetik

Mit 79 Exons und insgesamt über 2400 kb genomischer DNA ist das Dystrophin-Gen das größte bekannte menschliche Gen. Das Genprodukt ist Dystrophin mit einem Anteil am Gesamtmuskelprotein von 0,002 %.

Dystrophin besteht aus 3685 Aminosäuren. Es hat ein Molekulargewicht von 427 kDa. Dieses Protein besteht aus vier funktionellen Einheiten, der N-terminalen aktinbindenden Domäne, 25 repetitiven tripelhelikalen Abschnitten (Stabdomäne), einer cystinreichen Domäne und dem C-terminalen Ende, das einen Komplex aus Sarkoglykanen bindet. Abbildung 3 zeigt schematisch den Ort des Dystrophin-Gens auf dem X-Chromosom und das Dystrophin-Molekül als das Genprodukt des Dystrophin-Gens.

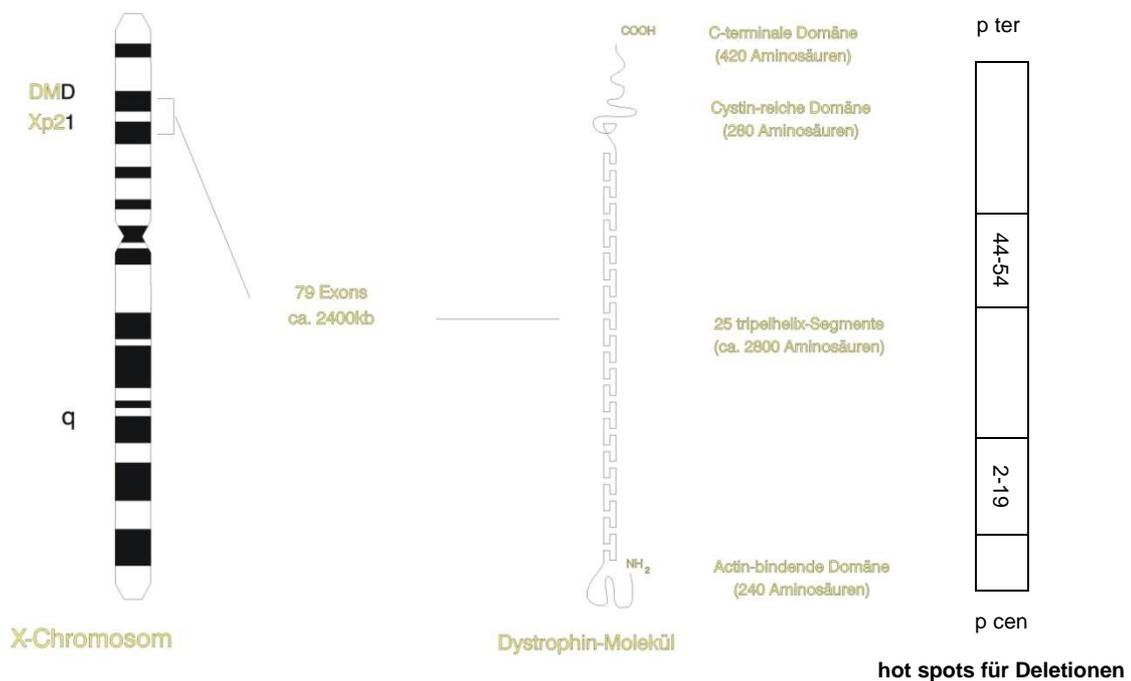


Abbildung 3 Lage des Dystrophin-Gens auf dem X-Chromosom, schematische Darstellung

des Dystrophin-Moleküls und schematische Lokalisation der Exons 2-19 und 44-54 der Dystrophin-mRNA, die am häufigsten von Deletionen betroffen sind (mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg und modifiziert nach Forst (2000)) (p = Region p des X-Chromosoms; cen = zentral; ter = terminal).

Dystrophin wird hauptsächlich im Muskel exprimiert und wurde in weiteren Isoformen im Herzmuskel und in der Retina gefunden. Elektroretinographien deuten dabei darauf hin, dass nur DMD-Patienten mit Deletionen auffällige Untersuchungsergebnisse zeigen. Möglicherweise wird hier ein anderer Promoter benutzt oder die Transkription des Retina-Dystrophins wird nicht beeinträchtigt (De Becker et al. 1994).

Auch im Gehirn wurden Dystrophin-Isoformen nachgewiesen, was die bei DMD-Patienten relativ häufig zu beobachtende geistige Retardierung erklären könnte. In den einschlägigen Untersuchungen ergeben sich dazu Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Deletionsort (Exon 47-51) und einer möglichen geistigen Retardierung (Covone et al. 1991).

Das Protein Dystrophin ist auf der zytoplasmatischen Seite des Skelettmuskels lokalisiert. Es dient der Stabilisierung der Zellmembran. Bei DMD kommt es zu einer besonderen Empfindlichkeit des Muskels gegenüber mechanischer Belastung. Durch das Fehlen von Dystrophin strömt unkontrolliert Kalzium ein, welches möglicherweise endogene Ca^{2+} -abhängige Proteasen aktiviert und die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die letztlich zur Apoptose der Muskelzellen führen, sind noch nicht hinreichend geklärt (Kumar et al. 2004; Dudley et al. 2006).

2.3 Diagnostik

2.3.1 Diagnostik beim Betroffenen

Entscheidend für die Diagnose einer DMD sind eine ausführliche Eigen- und Familienanamnese, die klinische neuropädiatrische Untersuchung und

schließlich die molekulargenetische Diagnostik (Diener und Weimar 2012).

Bei klinischem Verdacht sowie bei positiver Familienanamnese sollte sich zunächst eine Bestimmung der Creatinkinase (CK) als Marker für eine Schädigung der Muskulatur anschließen. Während ein mäßig erhöhter CK-Wert als unspezifisch gilt, ist ein mehr als zehnfach erhöhter Wert als deutlicher Hinweis auf eine DMD zu werten (Vry et al. 2012). Gelegentlich entsteht der Verdacht auf DMD auch durch eine zufällig festgestellte CK-Erhöhung (Schara 2004). GOT, GPT, LDH und Aldolase sind häufig leicht erhöht. Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung von hepatischen Erkrankungen wird der γ GT-Wert im Normbereich bestimmt.

Bildgebende Verfahren wie die Myosonographie zeigen oft ein typisches Bild mit erhöhter Echogenität. Als ergänzende Untersuchung (Diener und Weimar 2012) können auch eine Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) des Muskels dienen. Die Magnetresonanztomographie ist dabei der CT überlegen und bildet deutlich die myopathischen Veränderung mit zunehmender Pseudohypertrophie ab (Forst 2000). Im Elektromyogramm zeigt sich ein sogenanntes myogenes Muster mit niedrigamplitudigen, verkürzten und vermehrt polyphasischen Einzelpotentialen (Forst 2000).

Die Diagnosesicherung erfolgte zunächst durch Muskelbiopsien mit fehlendem Nachweis von Dystrophin durch Immunhistochemie und Western Blot. In den letzten Jahren rückten immer mehr molekulargenetische Analysen in den Vordergrund (Gencik et al. 1999). Mittels Multiplex-PCR konnten Deletionen nachgewiesen werden (Covone et al. 1992), der Southern Blot wurde zum Duplikationsnachweis genutzt. Heute stehen verbesserte, PCR-basierte und quantitative Methoden zur Verfügung, wie zum Beispiel die MAPH- (multiplex amplifiable probe hybridisation) (Armour et al. 2000; White et al. 2002) oder die MLPA-Diagnostik (multiplex ligation-dependent probe amplification) (Schwartz

und Duno 2004; Janssen et al. 2005). Mit den beiden letztgenannten Methoden können Deletionen und Duplikationen durch Ermittlung der Exondosen im Dystrophin-Gen nachgewiesen werden.

Auch Punktmutationen, also einzelne Nukleotidveränderungen, können heute ohne Probleme durch Sequenzierung nachgewiesen werden (Grimm et al. 2012).

Routinemäßige CK-Messungen im Rahmen des Neugeborenen-Screenings oder der Vorsorgeuntersuchungen werden derzeit in Deutschland nicht durchgeführt. Der Grund liegt in der geringen Spezifität erhöhter CK-Werte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit falsch positiver Fälle. Dieser Anteil liegt beispielsweise bei der Suche nach Heterozygoten etwa bei 30 %. Auch wenn es eine Möglichkeit zur validen Früherkennung gäbe, würde dies für die bereits geborenen Patienten keinen Vorteil bedeuten – schließlich ist DMD zu keinem Zeitpunkt heilbar. Allenfalls könnte man den betroffenen Eltern bei einem positiven Ergebnis durch Beratung Entscheidungskriterien für die Familienplanung an die Hand geben (Grimm 1981; Forst 2000).

Andere Länder bewerteten den Nutzen für die Eltern im Hinblick auf die weitere Familienplanung anders und führen im Rahmen des Neugeborenen-Screenings eine Untersuchung von Trockenblut auf erhöhte CK-Werte durch. So entschied man sich beispielsweise im Jahr 1990 in Wales, eine Untersuchung auf erhöhte CK-Werte ins Neugeborenen-Screening zu integrieren. Man erhoffte sich damit, Muskelerkrankungen wie DMD früher zu diagnostizieren. Dadurch sollten durch eine Verhinderung des „diagnostic delay“ weitere Erkrankungsfälle in der Familie vermieden werden (Moat et al. 2013). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung wurde im Rahmen einer kleinen Studie in England für ca. 4,3 Jahre ermittelt (van Ruiten et al. 2014).

In den USA wird derzeit ein CK-Screening von männlichen Säuglingen im Alter von etwa zwölf Monaten im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung diskutiert. Die Autoren einer in Atlanta an 524 Jungen durchgeführten Studie sprechen sich für einen späteren Untersuchungszeitpunkt aus, der weit nach der turbulenten ersten Zeit mit einem Neugeborenen liegt und zu dem die Eltern-Kind-Bindung schon gefestigt ist. Zudem könnten falsch-positive Ergebnisse, die durch deutlich erhöhte CK-Werte aufgrund des Geburtsvorgangs entstehen, ausgeschlossen werden (Cyrus et al. 2012).

2.3.2 Diagnostik bei weiblichen Angehörigen

Ist der klinische Verdacht einer DMD bei einem Jungen durch diagnostische Verfahren bestätigt worden, so sollte weiblichen Angehörigen unbedingt eine Heterozygotendiagnostik angeboten werden, um den Überträgerstatus zu bestimmen. Eine Bestimmung der CK kann einen ersten Hinweis darauf geben, ob die ratsuchende Person Trägerin einer Mutation im Dystrophin-Gen ist, jedoch sind die Werte nur bei etwa 2/3 der Konduktorinnen erhöht (Allingham-Hawkins et al. 1998). Aufgrund des relativ einfachen Nachweises von Deletionen aus einer EDTA-Blutprobe beginnt damit meist die Konduktorinnendiagnostik.

Falls kein genetisches Material vorhanden ist, bedient man sich biochemischer Marker wie zum Beispiel der Creatinkinase und einer Stammbaumanalyse, um das Heterozygotenrisiko genauer einschätzen zu können. Die Risikoberechnung erfolgt unter Zuhilfenahme des Bayes-Theorems und der Kopplungsanalyse (Haplotypanalyse) mittels DNA-Marker (Hodgson und Bobrow 1989; Chaturvedi et al. 2000; Mukherjee et al. 2003). Hierbei lassen sich anhand verschiedener X-chromosomaler Marker Rückschlüsse auf die Herkunft des die Mutation tragenden X-Chromosoms, ob großväterlich oder großmütterlich, ziehen (Müller und Grimm 1986) (Abbildung 4).

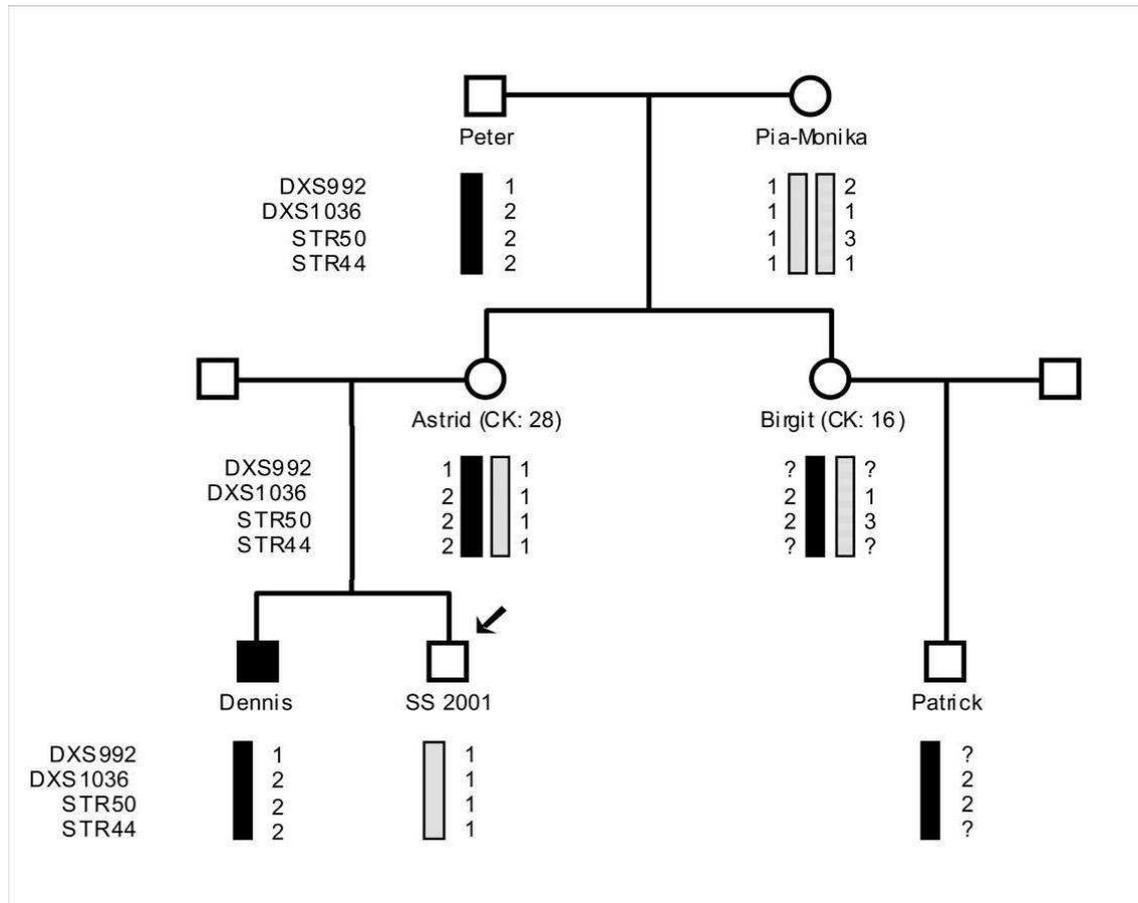


Abbildung 4 DMD-Stammbaum mit Haplotypen. Der männliche Fet – SS2001 – hat einen anderen X-chromosomalen Haplotyp von seiner Mutter geerbt als sein erkrankter Bruder Dennis, daher ist sein Erkrankungsrisiko sehr niedrig.

Eine besondere Herausforderung in der Heterozygotendiagnostik stellen Keimzellmosaik dar (Janka und Grimm 1991). Dabei ist der Indexpatient Träger einer Mutation, die in einer Mitose während der Keimzellentwicklung bei der Mutter des Indexpatienten entstanden ist (maternales Keimzellmosaik). Keimzellmosaik entstehen durch Mutationen in der Mitose nach Entstehung der Primordialkeimzelle. Je nach dem Zeitpunkt der Mutation liegt die Zahl der betroffenen Zellen zwischen einer Zelle (ganz am Ende der mitotischen Teilungen) und 50 % (in der Primordialkeimzelle) (Grimm et al. 1990).

Als Folge der mitotischen Neumutation können bei der Mutter mehrere Keimzellen die Mutation tragen. Findet die Neumutation dagegen in der Meiose statt, ist nur eine Keimzelle betroffen. Ein Keimzellmosaik kann auch in den großväterlichen Stammzellen seinen Ursprung haben, in diesem Fall ist die Mutter des Indexpatienten Konduktorin. Das empirische Wiederholungsrisiko für DMD bei einem sporadischen Patienten, bei dessen Mutter keine Mutation nachweisbar ist, beträgt etwa 10 % (Barbujani et al. 1990, van Essen et al. 1992b). Man kann von einem Keimzellmosaik ausgehen, wenn bei zwei Nachkommen die gleiche Mutation nachgewiesen wird, die bei der Mutter nicht nachgewiesen werden kann. Die Möglichkeit zweier unabhängiger identischer meiotischen Neumutationen kann vernachlässigt werden.

2.4 Therapie

In der symptomatischen Behandlung werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Ein wichtiger Bestandteil besteht in der Langzeitbehandlung mit Prednison (0,75 mg/kgKG/d) (Muntau 2004) oder Deflazacort (0,9 mg/kgKG/d) (Korinthenberg 2004). Diese verzögert den zunehmenden Kraftverlust und kann dadurch die Gehfähigkeit um etwa ein bis zwei Jahre, im besten Fall sogar um bis zu fünf Jahre verlängern (Moxley et al. 2010). Diese Therapie ist mit entsprechenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen verbunden, wie beispielsweise Wachstumshemmung, Gewichtszunahme oder Katarakt (Korinthenberg 2004; Korinthenberg 2008), wird jedoch aufgrund des Behandlungserfolgs in Kauf genommen (Biggar et al. 2006).

Physiotherapie zielt in den frühen Krankheitsstadien vor allem auf eine Förderung der Bewegung ab; später konzentriert sie sich auf Kontrakturprophylaxe und Atemtherapie (Korinthenberg 2004).

Bei zunehmender Ateminsuffizienz und nächtlicher Hypoventilation kommt eine

BIPAP-Beatmung in Betracht.

Eine im Verlauf der DMD-Erkrankung auftretende dilatative Kardiomyopathie kann mit ACE-Hemmern und Betablockern therapiert werden (Vry et al. 2012).

Insgesamt sind regelmäßige, jährliche Untersuchungen von Herzfunktion, Bewegungsapparat und Lungenfunktion unverzichtbar, um Verschlechterungen rechtzeitig zu bemerken und adäquat behandeln zu können (Hübner et al. 2009). Auch heute liegt die Lebenserwartung der Patienten bei kaum über 20 Jahren (van Essen et al. 1992a; Rall und Grimm 2012) .

Alternative Therapieverfahren wie Exon-Skipping und „Stop-Codon-Read-Through“ (Pichavant et al. 2011) sind zwar Gegenstand klinischer Forschung, bis heute ist jedoch keine kausale Therapie der DMD etabliert. Auch mehrere klinische Studien mit Aminoglykosid-vermitteltem „read through“ von UGA-Stopp-Codons zeigten zwar einen messbaren Dystrophin-Anstieg, konnten jedoch keine klinische Verbesserung der Patienten erzielen (Malik et al. 2010).

Das Prinzip des „Stop-Codon-Read-Through“-Verfahren beruht auf der Erkenntnis, dass 10-15 % der an DMD Erkrankten eine Mutation tragen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Gentamicin und Ataluren bewirken am 40s-Ribosom bzw. 60s-Ribosom das Einsetzen einer Aminosäure am vorzeitigen Stop-Codon, wodurch die Translation weitergeführt wird. Dadurch wird die Dystrophin-Expression um ca. 15-20 % angehoben (Politano et al. 2003; Pichavant et al. 2011; Peltz et al. 2013).

Etwas vielversprechender sind die Resultate im Bereich der Forschung am Exon-Skipping im Dystrophin-Gen. Dabei wird versucht, aus einer out-of-frame-Mutation mit funktionslosem Dystrophinprotein eine in-frame-Mutation zu gestalten, die das Leseraster erhält und ein funktionierendes, wenn auch kürzeres Protein produziert. Sogenannte Antisense-Oligonukleotide lagern sich

an die der Deletion benachbarten Exons an und werden beim Splicen übersprungen (Kinali et al. 2009; Muir und Chamberlain 2009; Heemskerk et al. 2010).

2.5 Die humangenetische Beratung Angehöriger von DMD-Patienten

2.5.1 Problembeschreibung

Bei der Mutter und weiblichen Verwandten des von DMD betroffenen Indexpatienten kann mit oben genannten Untersuchungen ein möglicher Überträgerstatus festgestellt werden. Der humangenetischen Beratung kommt aufgrund fehlender Heilungsmöglichkeiten und der besonderen Schwere der Erkrankung eine besondere Bedeutung zu.

Die Problematik der Beratung sei an folgendem Beispiel aufgezeigt: Die Mutter eines an Muskeldystrophie Duchenne erkrankten Jungen fragt nach ihrem Überträgerstatus und einer möglichen Erkrankung eines zweiten Kindes an DMD. Folgende Szenarien sind unter anderem denkbar:

a) Die Mutation beim Betroffenen ist bekannt und wird auch bei der Mutter nachgewiesen. Die Mutter ist somit Konduktorin für DMD. Rein statistisch werden 50% ihrer Söhne erkranken, 50 % ihrer Töchter sind Konduktorinnen und werden die Erkrankung weitervererben.

b) Die Mutation beim Betroffenen ist bekannt, bei der Mutter kann diese nicht nachgewiesen werden. Somit liegt entweder eine meiotische Neumutation vor, oder aber die Mutter ist Trägerin eines Keimzellmosaiks und die Neumutation ist in der Mitose entstanden.

In beiden Fällen ist nun eine ausführliche Risikoberechnung im Rahmen einer humangenetischen Beratung nötig, um das individuelle Heterozygotenrisiko dieser betroffenen Frau festzustellen und ihr und ihrem Partner Entscheidungshilfen für oder gegen eine weitere Schwangerschaft an die Hand

zu geben.

2.5.2 Risikoberechnung

Ein Meilenstein in der Risikoberechnung X-chromosomal vererbter Krankheiten war die Formulierung des Mutations-Selektionsgleichgewichts durch Haldane (Haldane 1935). Er erkannte, dass die Inzidenz und die Heterozygotenrate Vielfache der Neumutationsrate μ sind. An DMD erkrankte Männer haben in der Regel keine Nachkommen, so dass die Prävalenz der DMD stetig abnehmen müsste. Dies wird jedoch durch Neumutationen ausgeglichen. Es kann folgendes Mutations-Selektions-Gleichgewicht aufgestellt werden (Tab. 1 und 2); in diesem genetischen Modell ist noch nicht berücksichtigt, dass es Keimzellmosaik gibt. Es wird angenommen, dass die erkrankten Männer so schwer betroffen sind, dass sie keine Nachkommen zeugen (Fertilität $w = 0$).

	heterozygote Konduktorinnen	kranke Männer
Inzidenz Generation n	A	B
Generation n+1		
Vererbung	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} A$
Neumutation	2μ	μ
Inzidenz Generation n+1	$\frac{1}{2} A+2\mu$	$\frac{1}{2} A+\mu$
Unter der Annahme eines Gleichgewichts ist: Inzidenz Generation n = Inzidenz Generation n+1 $A = \frac{1}{2} A + 2\mu \qquad A = 4\mu$ $B = \frac{1}{2} A + \mu = 3\mu$		

Tabelle 1 Herleitung des Mutations-Selektions-Gleichgewichts im X-chromosomalen Erbgang unter der Annahme gleicher Mutationsraten in beiden Geschlechtern. Die Inzidenz in der darauf folgenden Generation n+1 ergibt sich durch eine Wahrscheinlichkeit von 50 % und die Neumutationsrate von 2μ (A = Heterozygote, B = erkrankte Männer, μ = Mutationsrate in beiden Geschlechtern).

	heterozygote Konduktorinnen	kranke Männer
Inzidenz Generation n	4μ	3μ
Generation n+1		
Vererbung	$\frac{1}{2} 4\mu = 2\mu$	$\frac{1}{2} 4\mu = 2\mu$
Neumutation	2μ	μ
Inzidenz Generation n+1	4μ	3μ

Tabelle 2 Mutations-Selektions-Gleichgewicht im X-chromosomalen Erbgang unter der Annahme gleicher Mutationsraten in beiden Geschlechtern, ausgedrückt als Vielfache der Mutationsrate μ (μ = Mutationsrate in beiden Geschlechtern).

Der Anteil von Neumutationen an allen Erkrankungsfällen liegt bei DMD sehr hoch und beträgt unter der Annahme, dass die Mutationsraten bei beiden Geschlechtern gleich ist, etwa 33%.

Die A priori - Wahrscheinlichkeit für eine Frau mit einem bereits an DMD erkrankten Sohn, Überträgerin zu sein, beträgt 66% (unter Annahme gleicher Mutationsraten im weiblichen und männlichen Geschlecht). Durch genaue Stammbaumanalysen lässt sich diese Wahrscheinlichkeit präzisieren (Grimm 1982).

Schon Haldane nahm an, dass die Neumutationsraten bei Frauen und Männern nicht gleich sind (Haldane, 1935). Spätere Untersuchungen haben dies bestätigt (Grimm et al. 1994). Diese Unterschiede in den Mutationsraten der beiden Geschlechter müssen berücksichtigt werden (Tab. 3 und 4) (Grimm et al. 2011).

	heterozygote Konduktorinnen	kranke Männer
Inzidenz Generation n	A	B
Generation n+1		
Vererbung	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} A$
Maternale Neumutation	u	u
Paternale Neumutation	v	
Inzidenz Generation n+1	$\frac{1}{2} A+u+v$	$\frac{1}{2} A+u$
Unter der Annahme eines Gleichgewichts ist: Inzidenz Generation n = Inzidenz Generation n+1 $A = \frac{1}{2} A + u + v$ $A = 2u + 2v$ $B = \frac{1}{2} A + u = 2u + v$		

Tabelle 3 Herleitung des Mutations-Selektions-Gleichgewichts im X-chromosomalen Erbgang bei unterschiedlichen Mutationsraten in beiden Geschlechtern (u = Mutationsrate im weiblichen Geschlecht, v = Mutationsrate im männlichen Geschlecht).

	heterozygote Konduktorinnen	kranke Männer
Inzidenz Generation n	2u+2v	2u+v
Generation n+1		
Vererbung	$\frac{1}{2} (2u+2v)=u+v$	$\frac{1}{2} (2u+2v)=u+v$
Maternale Neumutation	u	u
Paternale Neumutation	v	
Inzidenz Generation n+1	2u+2v	2u+v

Tabelle 4 Mutations-Selektions-Gleichgewicht im X-chromosomalen Erbgang bei unterschiedlichen Mutationsraten in beiden Geschlechtern (u = Mutationsrate im weiblichen Geschlecht, v = Mutationsrate im männlichen Geschlecht).

3. Theoretische Überlegungen und Methoden

3.1 Grundlagen der Risikoberechnung

Wie Grimm et al. (Grimm et al. 1990) ausführen, sind zur Risikoberechnung mehrere Variablen erforderlich. Die verschiedenen notwendigen Variablen mit ihrer jeweiligen Definition sind in der folgenden Übersicht aufgeführt (Tab. 5):

u	Mutationsrate in der Oogenese
v	Mutationsrate in der Spermatogenese
g	Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Mitose, die zu einem Keimzellmosaik führt
1-g	Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Meiose
f	mittlere Häufigkeit der Oozyten oder Spermien, die durch eine mitotische Neumutation Genträger wurden (= Segregationsrate)
k	Verhältnis der Mutationsrate von Spermatogenese zu Oogenese ($k = \frac{v}{u}$)

Tabelle 5 Variablen im genetischen Modell

	Heterozygote Frauen	KZM bei Frauen	KZM bei Männern	Kranke Männer
Inzidenz Generation n	A	B	C	D
Generation n+ 1				
Vererbung	$\frac{1}{2} A$			$\frac{1}{2} A$
Maternales KZM	$\frac{1}{2} f B$			$\frac{1}{2} f B$
Paternales KZM	f C			
Maternale Neumutation	(1-g) u	2 g u		(1-g) u
Paternale Neumutation	(1-g) v		g v	
Inzidenz Generation n+1	$\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + f C + (1-g) u + (1-g) v$	2 g u	g v	$\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + (1-g) u$
<p>Unter der Annahme eines Gleichgewichts ist: Inzidenz Generation n = Inzidenz Generation n+1 $A = \frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + f C + (1-g) u + (1-g) v$ $B = 2 g u$ $C = g v$ $D = \frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + (1-g) u$</p> <p>Damit gilt: $A = (2 u + 2 v) (1-g + g f)$ und $D = (2 u + v) (1 - g + g f)$</p>				

Tabelle 6 Herleitung des genetischen Modells mit Keimzellmosaik. Die Wahrscheinlichkeit A, heterozygot für eine Mutation (z.B. im Dystrophin-Gen) zu sein, berechnet sich aus den verschiedenen Einzelwahrscheinlichkeiten aus Vererbung,

Keimzellmosaik und der Möglichkeit der paternalen Neumutation.

Unter der Annahme, dass ein Keimzellmosaik (KZM) vorliegen kann und die Mutationsraten in beiden Geschlechtern ungleich sind, kann folgendes Mutations-Selektions-Gleichgewicht hergeleitet werden (Tab. 7):

	Heterozygote Frauen	KZM bei Frauen	KZM bei Männern	Kranke Männer
Inzidenz Generation n	$(2 u + 2 v) (1-g + g f)$	$2 g u$	$g v$	$(2 u + v) (1 - g + g f)$
Generation n+ 1				
Vererbung	$\frac{1}{2} (2 u + 2 v)$			$\frac{1}{2} (2 u + 2 v)$
Maternales KZM	$\frac{1}{2} f 2 g u$			$\frac{1}{2} f B$
Paternales KZM	$f g v$			
Maternale Neumutation	$(1-g) u$	$2 g u$		$(1-g) u$
Paternale Neumutation	$(1-g) v$		$g v$	
Inzidenz Generation n+1	$\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + f C + (1-g) u + (1-g) v$	$2 g u$	$g v$	$\frac{1}{2} A + \frac{1}{2} f B + (1-g) u$

Tabelle 7 Genetisches Modell mit Keimzellmosaik. Hier wurden die verschiedenen Mutationsraten im männlichen und weiblichen Geschlecht berücksichtigt.

3.2 Mögliche Haplotyp-Konstellationen

Wie oben aufgezeigt, gibt es verschiedene Möglichkeiten für das Entstehen einer DMD-Erkrankung:

- 1) Neumutation in der Meiose bei der Mutter
- 2) Vererbung der Mutation von der Mutter, weil bei ihr ein Keimzellmosaik vorliegt
- 3) Vererbung der Mutation von der Mutter, weil sie Konduktorin ist

Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des jeweiligen Falls ist der Quotient aus dem Mutations-Selektionsgleichgewicht und der Gesamtwahrscheinlichkeit, dass eine DMD-Erkrankung vorliegt (siehe Tab. 7).

Im Folgenden sollen die verschiedenen Haplotyp-Konstellationen erläutert werden, die der Erkrankung beim Indexpatienten zugrunde liegen können. Zur Veranschaulichung werden neben der mathematischen Formel zur Wahrscheinlichkeitsberechnung auch schematische Stammbäume gezeigt.

3.2.1 Ursachen für eine DMD-Erkrankung und Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens

Eine Erkrankung an DMD bei einem Patienten liegt vor:

- 1) weil bei seiner Mutter eine meiotische Neumutation entstanden ist (MNC) (Abbildung 5). Die Mutter ist keine Konduktorin (M_{NC}).

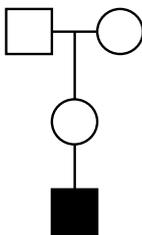


Abbildung 5 Meiotische Neumutation.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{NC} = [(1-g)u] / [(2u+v)(1-g+fg)]$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{NC} = (1-g) / [(2+k)(1-g+fg)]$$

2) weil bei seiner Mutter ein Keimzellmosaik vorliegt (M_{KZM})(Abbildung 6):

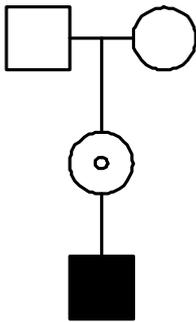


Abbildung 6 Keimzellmosaik bei der Mutter des Indexpatienten.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{KZM} = \left(\frac{1}{2} f 2gu \right) / [(2u+v)(1-g+fg)]$$

$$M_{KZM} = fgu / [(2u+v)(1-g+fg)]$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{KZM} = fg / [(2+k)(1-g+fg)]$$

3) weil seine Mutter Konduktorin ist (M_{Het})(Abbildung 7).



Abbildung 7 Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin (M_{Het}).

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het}} = \left[\frac{1}{2}(2u + 2v)(1 - g + fg) \right] / [(2u + v)(1 - g + fg)]$$

$$M_{\text{Het}} = (u + v)/(2u + v)$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{\text{Het}} = (1 + k)/(2 + k)$$

Die Mutter des Indexpatienten kann Konduktorin sein:

a) weil bei ihrer Mutter (Großmutter des Indexpatienten) eine meiotische Neumutation entstanden ist ($M_{\text{Het-GM-NC}}$) (Abbildung 8):

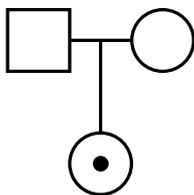


Abbildung 8 Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und es liegt eine großmütterliche Neumutation vor.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het-GM-NC}} = [(1-g)u]/[(2u+2v)(1-g+fg)]$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{\text{Het-GM-NC}} = (1-g)/[(2+2k)(1-g+fg)]$$

b) weil bei ihrem Vater (Großvater des Indexpatienten) eine meiotische Neumutation entstanden ist ($M_{\text{Het-GV-NC}}$) (Abbildung 9):

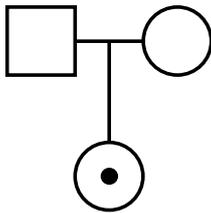


Abbildung 9 Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und es liegt eine großväterliche Neumutation vor.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het-GV-NC}} = [(1-g)v]/[(2u+2v)(1-g+fg)]$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{\text{Het-GV-NC}} = [(1-g)k]/[(2+2k)(1-g+fg)]$$

c) weil bei ihrer Mutter (Großmutter des Indexpatienten) ein Keimzellmosaik vorliegt

($M_{\text{Het-GM-KZM}}$) (Abbildung 10):

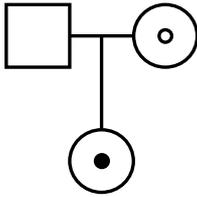


Abbildung 10 Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und bei der Großmutter liegt ein Keimzellmosaik vor.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het-GM-KZM}} = \left(\frac{1}{2} f 2 g u \right) / [(2u + 2v)(1 - g + fg)]$$

und wenn $k = v/u$

$$M_{\text{Het-GM-KZM}} = fg / [(2 + 2k)(1 - g + fg)]$$

d) weil bei ihrem Vater (Großvater des Indexpatienten) ein Keimzellmosaik vorliegt

($M_{\text{Het-GV-KZM}}$) (Abbildung 11):

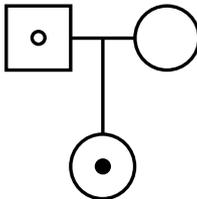


Abbildung 11 Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und bei dem Großvater liegt ein Keimzellmosaik vor.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het-GV-KZM}} = (fgv) / [(2u + 2v)(1 - g + fg)]$$

und wenn $k = \frac{v}{u}$

$$M_{\text{Het-GV-KZM}} = fgk / [(2 + 2k)(1 - g + fg)]$$

e) weil ihre Mutter (Großmutter des Indexpatienten) auch Konduktorin ist ($M_{\text{Het-GM-Het}}$) (Abbildung 12):

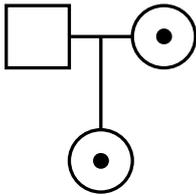


Abbildung 12 Mutter und Großmutter des Indexpatienten sind Konduktorinnen.

Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt:

$$M_{\text{Het-GM-Het}} = \left[\left(\frac{1}{2} (2u + 2v)(1 - g + fg) / [(2u + 2v)(1 - g + fg)] \right) \right]$$

und wenn $k = \frac{v}{u}$

$$M_{\text{Het-GM-Het}} = \frac{1}{2}$$

3.2.2 Wahrscheinlichkeit eines GVH oder GMH

Die Wahrscheinlichkeiten für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) und einen großväterlichen Haplotypen (GVH) lassen sich wie folgt berechnen:

a) Bei der Mutter ist eine meiotische Neumutation entstanden (M_{NC}) (Abbildung 5):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = \frac{1}{2} M_{NC}$$

$$GVH = \frac{1}{2} (1-g) / [(2+k)(1-g+fg)]$$

$$GVH = (1-g) / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = \frac{1}{2} M_{NC}$$

$$GMH = \frac{1}{2} (1-g) / [(2+k)(1-g+fg)]$$

$$GMH = (1-g) / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

b) Bei der Mutter liegt ein Keimzellmosaik vor (M_{KZM})(Abbildung 6):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = \frac{1}{2} M_{KZM}$$

$$GVH = \frac{1}{2} fg / [(2+k)(1-g+fg)]$$

$$GVH = fg / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = \frac{1}{2} M_{KZM}$$

$$GMH = \frac{1}{2} fg / [(2+k)(1-g+fg)]$$

$$GMH = fg / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

c) Die Mutter ist Konduktorin (M_{Het}) (Abbildung 7), weil bei der Großmutter eine meiotische Neumutation entstanden ist ($M_{Het-GM-NC}$) (Abbildung 8):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = M_{Het} \times 0 = 0$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = M_{Het} \times M_{Het-GM-NC}$$

$$GMH = [(1+k)/(2+k)] \times \left[\frac{1}{2}(1-g) \right] / [(1+k)(1-g+fg)]$$

$$GMH = (1-g) / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

d) Die Mutter ist Konduktorin (M_{Het}) (Abbildung 7), weil beim Großvater eine meiotische Neumutation entstanden ist ($M_{Het-GV-NC}$) (Abbildung 9):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = M_{Het} \times M_{Het-GV-NC}$$

$$GVH = [(1+k)/(2+k)] \times \frac{1}{2}(1-g)k / [(1+k)(1-g+fg)]$$

$$GVH = (1-g)k / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt

unter dieser Bedingung:

$$GMH = M_{\text{Het}} \times 0 = 0$$

e) Die Mutter ist Konduktorin (M_{Het})(Abbildung 7), weil bei der Großmutter ein Keimzellmosaik vorliegt ($M_{\text{Het-GM-KZM}}$) (Abbildung 10):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = M_{\text{Het}} \times 0 = 0$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = M_{\text{Het}} \times M_{\text{Het-GM-KZM}}$$

$$GMH = [(1+k)/(2+k)] \times \frac{1}{2} fg / [(1+k)(1-g+fg)]$$

$$GMH = fg / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

f) Die Mutter ist Konduktorin (M_{Het})(Abbildung 7), weil beim Großvater ein Keimzellmosaik vorliegt ($M_{\text{Het-GV-KZM}}$) (Abbildung 11):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = M_{\text{Het}} \times M_{\text{Het-GV-KZM}}$$

$$GVH = [(1+k)/(2+k)] \times \frac{1}{2} fgk / [(1+k)(1-g+fg)]$$

$$GVH = fgk / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = M_{Het} \times 0 = 0$$

g) Die Mutter ist Konduktorin (M_{Het}) (Abbildung 7), weil bereits die Großmutter Konduktorin ist ($M_{Het-GM-Het}$) (Abbildung 12):

Die Wahrscheinlichkeit für einen großväterlichen Haplotypen (GVH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GVH = M_{Het} \times 0 = 0$$

Die Wahrscheinlichkeit für einen großmütterlichen Haplotypen (GMH) beträgt unter dieser Bedingung:

$$GMH = M_{Het} \times M_{Het-GM-Het}$$

$$GMH = \left[\frac{(1+k)}{(2+k)} \right] \times \frac{1}{2}$$

$$GMH = (1+k)/(4+2k)$$

3.2.3 Berechnung der Gesamtwahrscheinlichkeit von GVH und GMH

Durch Addieren der verschiedenen Möglichkeiten, die einem großmütterlichen oder großväterlichen Haplotypen beim Indexpatienten zugrunde liegen können, lässt sich die Wahrscheinlichkeit eines GMH bzw. GVH bestimmen:

Für die Wahrscheinlichkeit eines GVH gilt also:

$$GVH = \left\{ \frac{(1-g)}{[(4+2k)(1-g+fg)]} \right\} + \left\{ \frac{fg}{[(4+2k)(1-g+fg)]} \right\} + 0 \\ + \left\{ \frac{(1-g)k}{[(4+2k)(1-g+fg)]} \right\} + 0 + \left\{ \frac{fgk}{[(4+2k)(1-g+fg)]} \right\} + 0$$

$$GVH = [(1-g) + fg + (1-g)k + fgk] / [(4+2k)(1-g+fg)]$$

$$GVH = (1+k) / (4+2k)$$

Für die Wahrscheinlichkeit eines GMH gilt also:

$$GMH = \left\{ \frac{(1-g)}{(4+2k)(1-g+fg)} \right\} + \left\{ \frac{fg}{(4+2k)(1-g+fg)} \right\} + \left\{ \frac{(1-g)}{(4+2k)(1-g+fg)} \right\} + 0 + \left\{ \frac{fg}{(4+2k)(1-g+fg)} \right\} + 0 + \frac{(1+k)}{(4+2k)}$$

$$GMH = 2 / (4+2k) + (1+k) / (4+2k)$$

$$GMH = (3+k) / (4+2k)$$

Das Verhältnis F der Wahrscheinlichkeit für einen GVH zu der Wahrscheinlichkeit für einen GMH beträgt:

$$F = GVH / GMH$$

Durch Einsetzen und Auflösen ergibt sich für das Verhältnis k der Mutationsraten von Spermatogenese zu Oogenese:

$$F = (1+k) / (3+k)$$

$$F(3+k) = 1+k$$

$$3F + Fk - 1 - k = 0$$

$$Fk - k = 1 - 3F$$

$$k(F-1) = 1-3F$$

$$k = (1-3F) / (F-1)$$

$$k = (GMH - 3GVH) / (GVH - GMH)$$

(nach Grimm et al. 1990; Grimm et al. 1994)

4. Ergebnisse

4.1 Einschlusskriterien und Beschreibung des Patientenguts

Im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg wurden für diese Arbeit Akten von 1777 Familien aus den Jahren 1982 bis 2007 ausgewertet, bei denen eine Diagnostik und eine humangenetische Beratung bei Verdacht auf Muskeldystrophie Duchenne durchgeführt wurden.

Zum einen musste bei diesen Patienten eine DMD durch molekulargenetische Verfahren durch den Nachweis einer typischen Mutation, etwa durch M-PCR, MLPA oder Southern Blot, gesichert sein und durch fehlenden Dystrophinnachweis in einer Muskelbiopsie mittels Immunhistochemie (Western Blot) bestätigt worden sein. Dadurch können - anders als in bereits bestehenden Auswertungen der Würzburger Datenbank - autosomal-rezessive Phänokopien ausgeschlossen werden.

Zum anderen mussten die Haplotypen des Indexpatienten, der Mutter und von mindestens einem mütterlichen Großelternteil bekannt sein. Fand ein Cross-Over statt und wurde damit eine sichere Zuordnung des die DMD-verursachende Mutation tragenden X-Chromosoms nicht eindeutig möglich, wurden diese Patienten ausgeschlossen. Ebenso wurden Familien mit seit mehreren Generationen an DMD Erkrankten ausgeschlossen, da in diesen Fällen die Feststellung des Indexpatienten nicht sicher erfolgen konnte.

Bei Indexpatienten mit sicher nachgewiesener DMD durch Muskelbiopsie, jedoch ohne Deletions- oder Duplikationsnachweis im Dystrophin-Gen, wurde von einer Punktmutation ausgegangen.

Letztlich konnten in die Berechnung der Mutationskonstanten k_{Deletion} , $k_{\text{Duplikation}}$ und $k_{\text{Punktmutation}}$ 102 an DMD erkrankte Patienten eingeschlossen werden.

Sämtliche Patienten waren kaukasischer Herkunft. 99 von DMD betroffene

Patienten stammten bis 1989 aus der BRD, ab diesem Zeitpunkt aus dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik. Drei DMD-Patienten kamen aus Österreich. Die genaue Herkunft nach der ersten Ziffer der Postleitzahl ist in Diagramm 1 dargestellt.

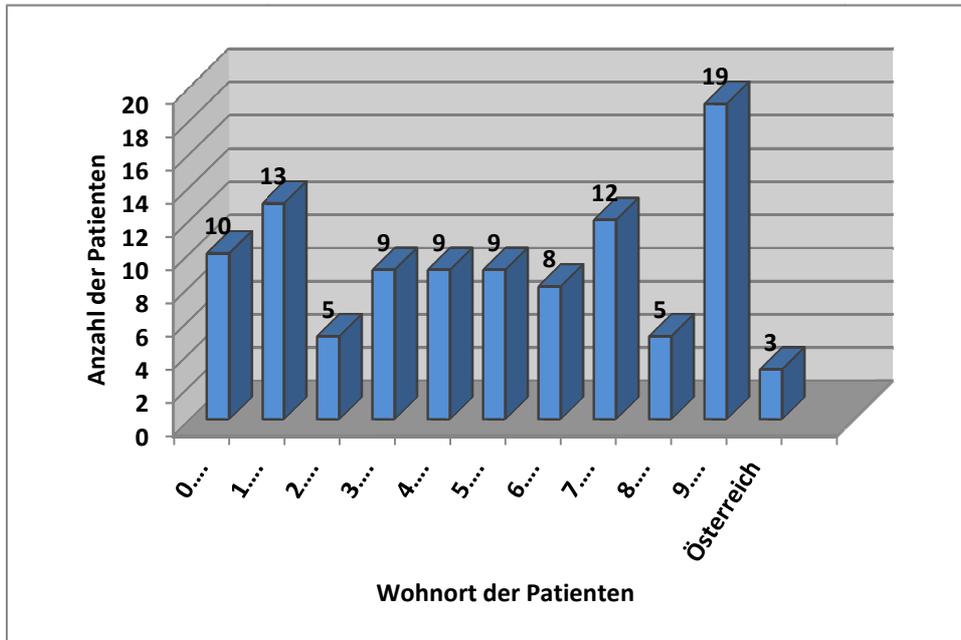


Diagramm 1 Wohnorte der Indexpatienten (für Deutschland: Postleitzahlenbereiche).

Zur Vorstellung im Humangenetischen Institut der Universität Würzburg führten unterschiedliche Fragestellungen. Dazu gehören natürlich die Diagnostik beim Indexpatienten, aber auch die Frage nach dem Konduktorinnenstatus im Rahmen der Familienplanung, z.B. wegen eines von DMD betroffenen Großonkels, Onkels, Cousins oder Bruders. Dabei stellten sich Familienangehörige eines Indexpatienten besonders in den 80er und 90er Jahren z.T. über Jahre wiederholt vor, bis mittels verbesserter diagnostischer Verfahren eine DMD- verursachende Mutation gefunden war. Dadurch erklären sich auch die verschiedenen Lebensalter, in denen bei mutmaßlich an DMD erkrankten Jungen und Männern die Diagnostik eingeleitet und durchgeführt wurde. Die unter Diagramm 2 aufgeführten Lebensalter geben das Lebensjahr wieder, in

dem entweder eine positive Gendiagnostik mit definitiver DMD-Diagnose vorlag oder eine aussagekräftige Muskelbiopsie ohne Nachweis von Dystrophin. Bei den Indexpatienten, denen erst nach dem 24. Lebensjahr DMD sicher nachgewiesen werden konnte, ist von einer Diagnosestellung post mortem auszugehen. Hierfür wurden eingefrorene Muskelbiopsien genutzt bzw. es konnte eine DMD-verursachende Mutation bei einer z.B. ratsuchenden Mutter, Schwester, Tante, Cousine nachgewiesen werden.

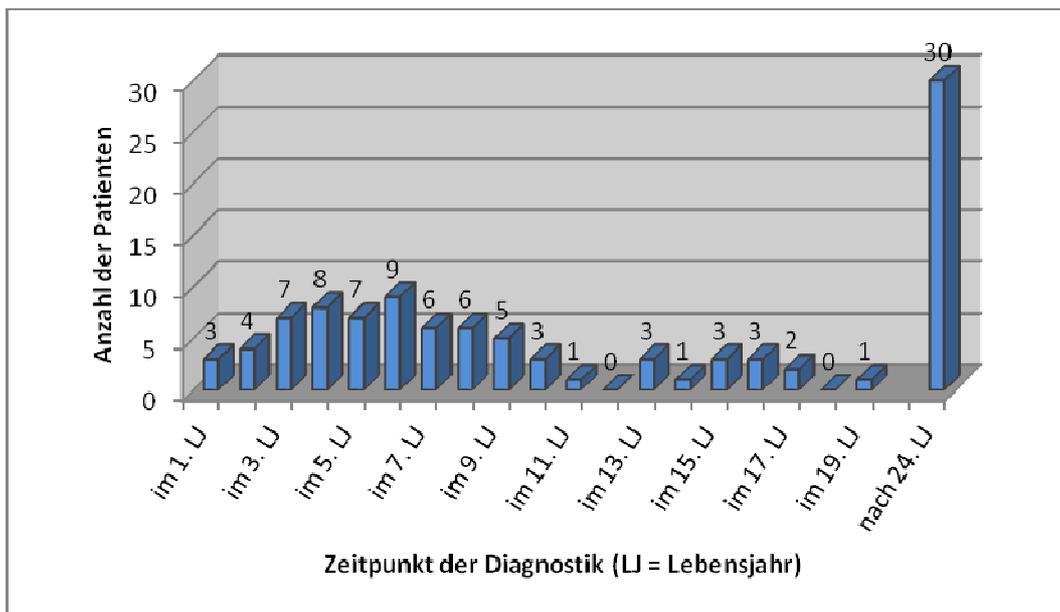


Diagramm 2 Zeitpunkt der genetischen Diagnostik auf DMD.

4.2 Verteilung der gefundenen Mutationen

Bei 43 der 102 Indexpatienten fanden sich Deletionen (42 %), bei 11 Indexpatienten (11 %) Duplikationen, bei 48 Personen Punktmutationen (47 %) (Diagramm 3).

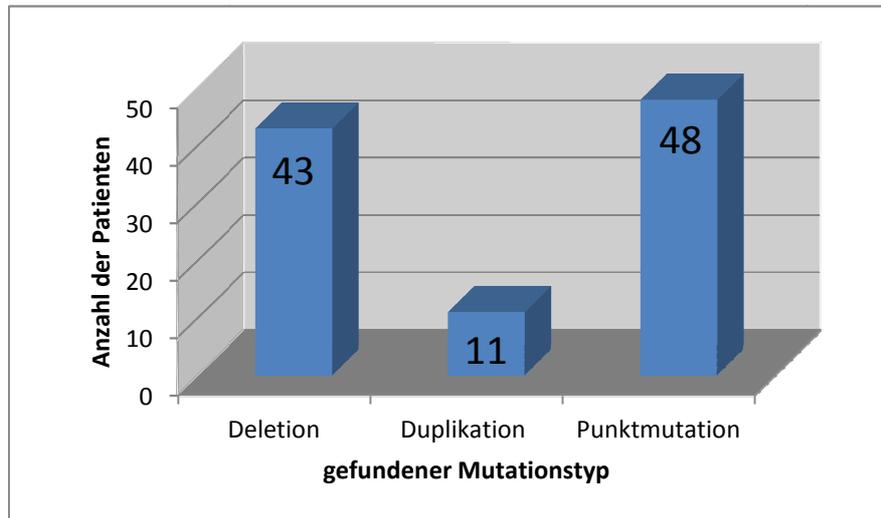


Diagramm 3 Verteilung der gefundenen Mutationstypen.

Unter 2.2.1 wurde das Vorkommen bestimmter hot-spots, also häufig von Deletionen betroffener Exons, im Dystrophin-Gen beschrieben. Auch die in der Humangenetik Würzburg diagnostizierten Deletionen im Dystrophin-Gen sind in einer ähnlichen Weise verteilt.

So lagen im Bereich der Exons 3-19 acht der 43 DMD-verursachenden Deletionen (ca. 18 %). 70 % der Deletionen wurden im Bereich der Exons 44-52 im Dystrophin-Gen nachgewiesen. Zurückzuführen ist dieses Phänomen wie oben beschrieben auf die hohe Anzahl repetitiver Sequenzen in den Introns der Exons 44-52 (Pozzoli et al. 2002; Wang et al. 2008).

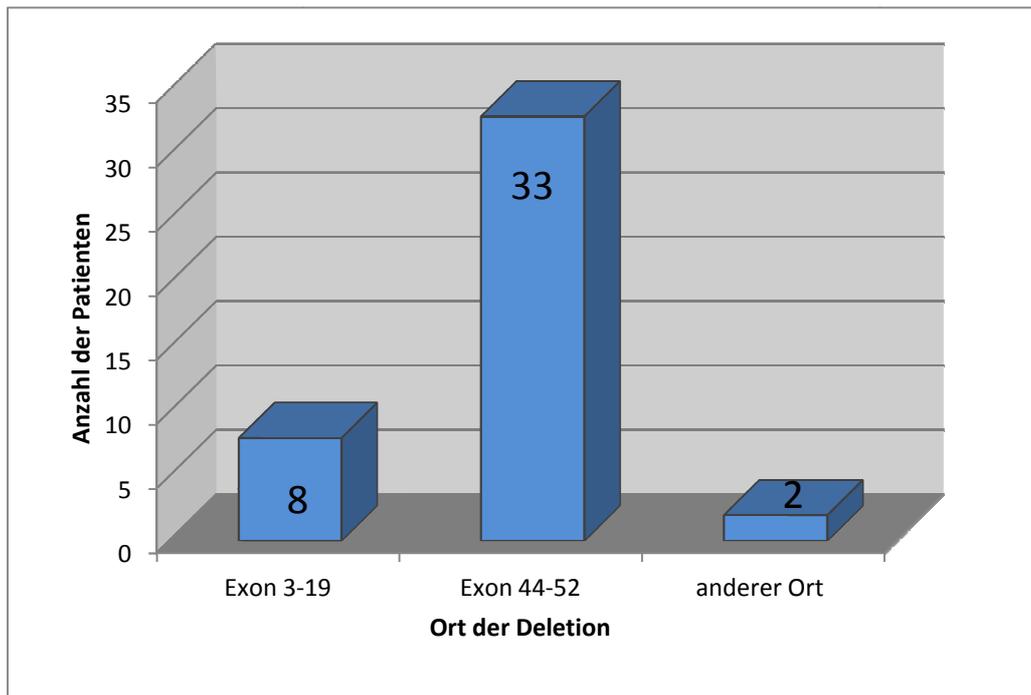


Diagramm 4 Verteilung der gefundenen Deletionen; bestimmte Exons (hot spots) waren häufiger betroffen.

Mittels Haplotypanalyse konnte bei 65 (64 %) der Indexpatienten ein großmütterlicher (GMH) und bei 37 (36 %) der Indexpatienten ein großväterlicher (GVH) Haplotyp nachgewiesen werden (Diagramm 5).

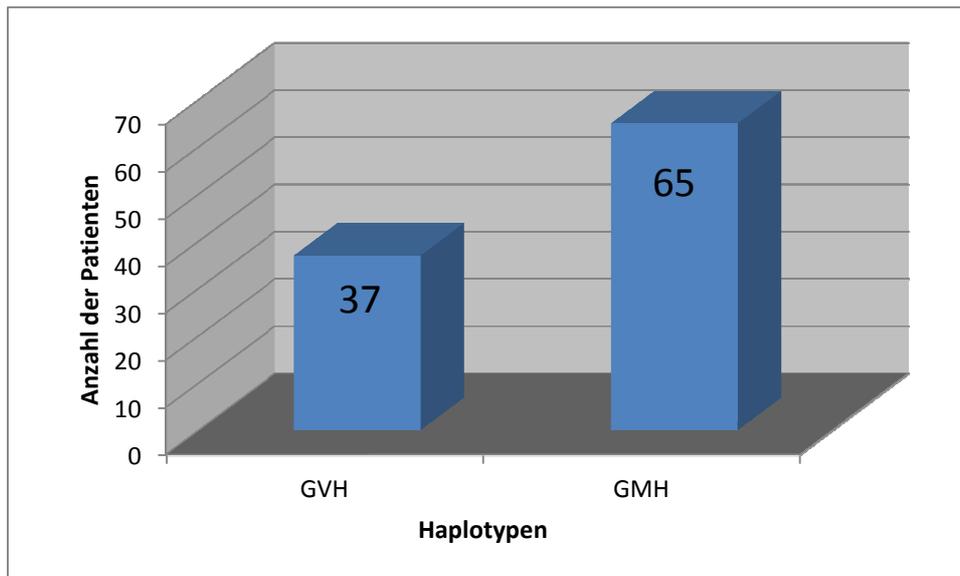


Diagramm 5 Anzahl der großväterlichen (GVH) und der großmütterlichen (GMH) Haplotypen.

4.3 Berechnung von k

Wie unter 3.2.3 ausgeführt, lässt sich k ausdrücken durch: $k = \frac{(1-3F)}{(F-1)}$.

Für die einzelnen Mutationstypen (Deletion, Duplikation, Punktmutation) lassen sich nun anhand der Patientendaten eigene k - Werte für DMD berechnen.

Einen großmütterlichen Haplotypen weisen 65 Patienten auf. Davon haben 31 eine Deletion, 5 eine Duplikation und 29 eine Punktmutation (Diagramm 6).

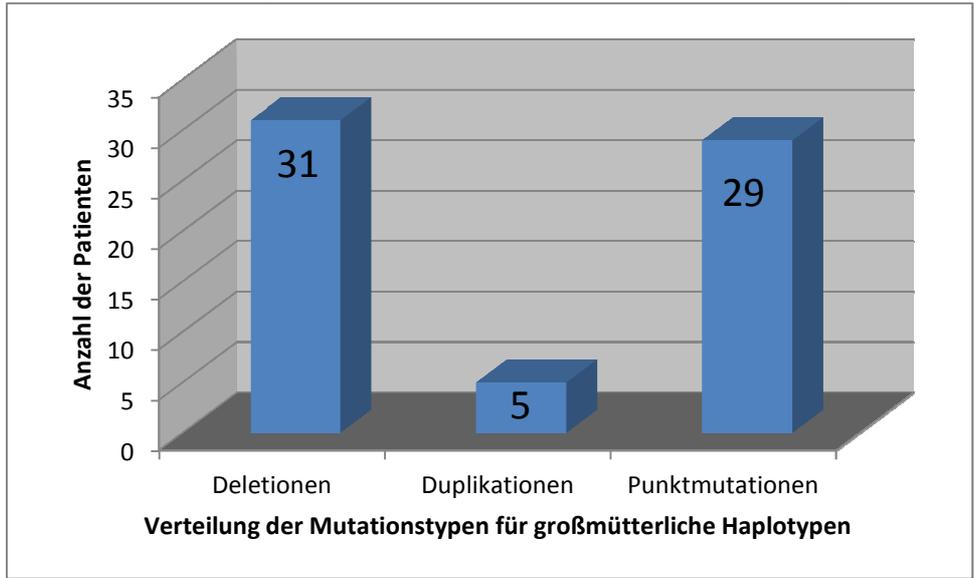


Diagramm 6 Verteilung der Mutationstypen - Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen - für großmütterliche Haplotypen (GMH).

Einen großväterlichen Haplotypen weisen 37 Patienten auf. Davon haben 12 eine Deletion, 6 eine Duplikation und 19 eine Punktmutation (Diagramm 7).

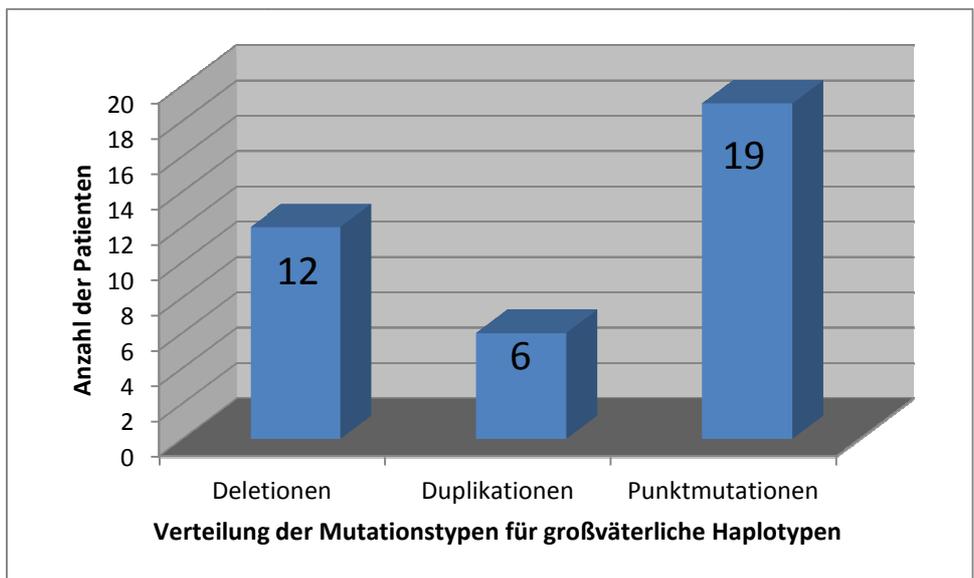


Diagramm 7 Verteilung der Mutationstypen - Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen - für großväterliche Haplotypen (GVH).

4.3.1 k für Deletionen

In Kenntnis der genannten Verteilungen ist es möglich, bei allen gefundenen Deletionen den großväterlichen Haplotypen zum großmütterlichen Haplotypen ins Verhältnis zu setzen (Diagramm 8).

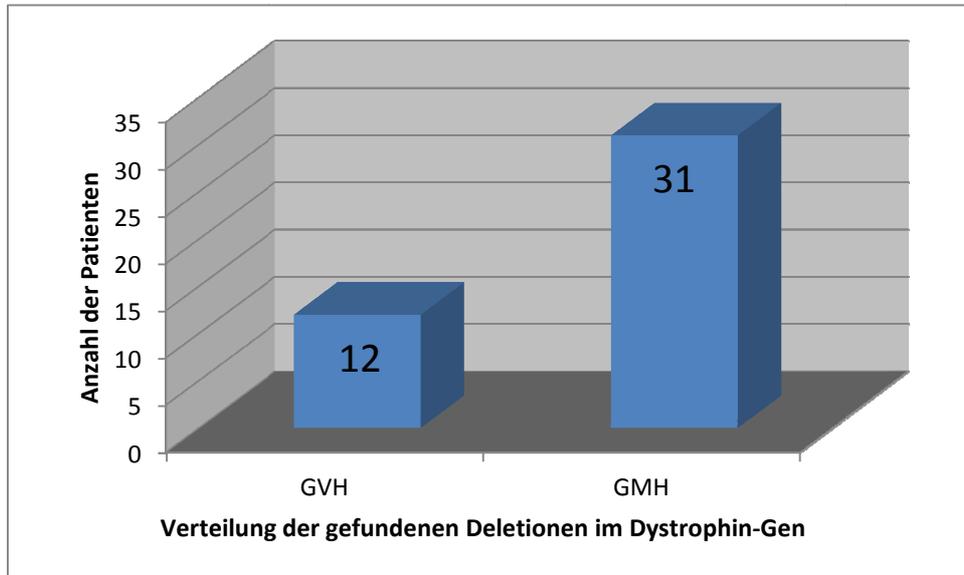


Diagramm 8 Verteilung der Deletionen im Dystrophin-Gen auf GVH und GMH.

Bei zwölf Indexpatienten wurde ein großväterlicher Haplotyp, bei 31 der großmütterliche Haplotyp festgestellt.

Damit ergibt sich aus

$$F = GVH / GMH = 12/31$$

$$\text{und } k = \frac{(1-3F)}{(F-1)}$$

ein Wert von $k = 0,26$.

4.3.2 k für Duplikationen

Bei sechs der elf Duplikationen lag ein großväterlicher Haplotyp vor, bei fünf Patienten mit Duplikation war ein großmütterlicher Haplotyp nachzuweisen (Diagramm 9).

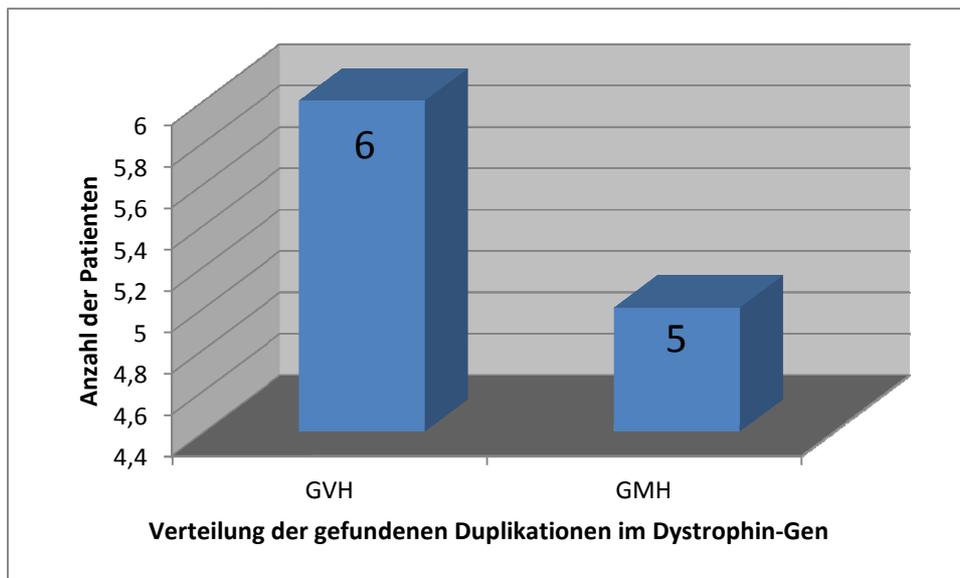


Diagramm 9 Verteilung der Duplikationen im Dystrophin-Gen auf GVH und GMH.

Damit ergibt sich aus

$$F = GVH / GMH = 6/5$$

$$\text{und } k = \frac{(1-3F)}{(F-1)}$$

ein Wert von $k = -13$.

4.3.3 k für Punktmutationen

Analog lässt sich k für die Punktmutationen berechnen. 19 der Indexpatienten mit Punktmutationen trugen den großväterlichen Haplotypen, 29 den

großmütterlichen (Diagramm 10).

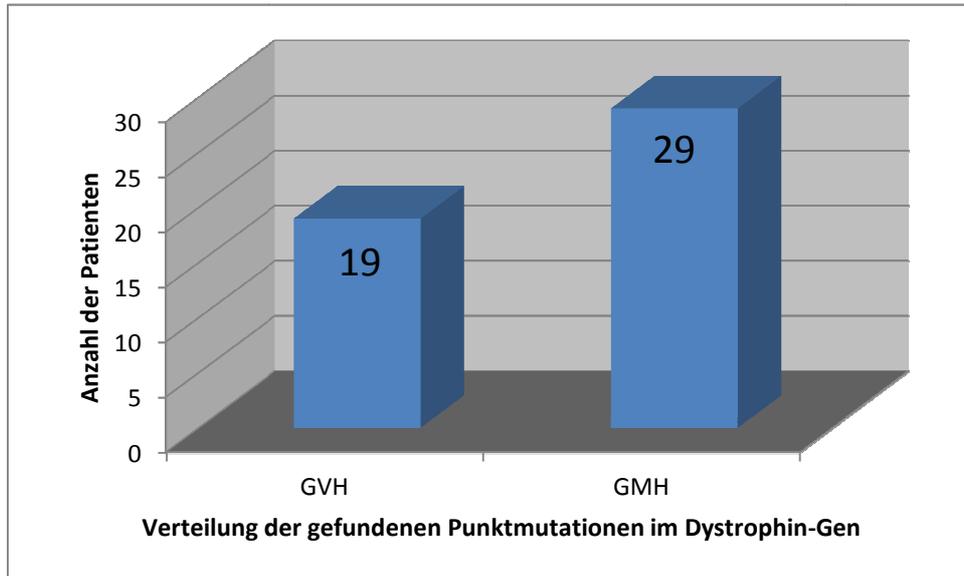


Diagramm 10 Verteilung der Punktmutationen im Dystrophin-Gen auf GVH und GMH.

Damit ergibt sich aus

$$F = GVH / GMH = 19 / 29$$

$$\text{und } k = \frac{(1 - 3F)}{(F - 1)}$$

ein Wert von $k = 2,8$.

5. Diskussion

5.1 Häufigkeitsangaben für die verschiedenen Mutationstypen

Die Häufigkeit von Deletionen und Punktmutationen im Dystrophin-Gen werden in der Literatur mit 60-65 % für Deletionen und 30 % für Punktmutationen angegeben, die Häufigkeit von Duplikationen im Dystrophin-Gen beläuft sich auf 5-10 % (Den Dunnen et al. 1989, Dolinsky et al. 2002; White et al. 2002; Grimm et al. 2009).

In der hier vorliegenden Untersuchung war der Deletionsanteil im Dystrophin-Gen mit 42 % unerwartet niedrig. Dies lässt sich damit erklären, dass nur Patienten, bei denen auch eine Haplotypbestimmung durchgeführt wurde, in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Bei Patienten mit sicherem Deletionsnachweis im Dystrophin-Gen wird akutell die Haplotypbestimmung häufig nicht mehr durchgeführt.

Der Anteil der Punktmutationen im Dystrophin-Gen war dagegen im Vergleich zu genannten Angaben mit 47 % erhöht. Punktmutationen waren zu Beginn der ausführlichen Diagnostik mit molekulargenetischen Mitteln schwierig nachzuweisen. Gerade weil hierfür molekulargenetische Methoden noch nicht verfügbar waren, wurden umfangreiche Stammbaumanalysen und eben auch Haplotypanalysen erstellt, die für diese Arbeit verwendet werden konnten.

Der in dieser Untersuchung gefundene Wert von 11 % Duplikationen im Dystrophin-Gen entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Den Dunnen et al. 1989; Dolinsky et al. 2002; White et al. 2002; Grimm et al. 2009).

5.2 Fallzahlen für Duplikationen

Insgesamt konnten nur elf Indexpatienten in die Berechnung für Duplikationen eingeschlossen werden. Aufgrund dieser geringen Fallzahl und gleichmäßigen

Verteilung (6 GVH, 5 GMH) können keine sicheren Aussagen über k für Duplikationen getroffen werden. Kawamura et al. legen nahe, dass die Häufigkeit der Entstehung von Duplikationen in der Spermatogenese höher ist. Alle Mütter ihrer Probanden mit einer nachgewiesenen Duplikation waren Überträger, während der Oogenese entstanden keine neuen Duplikationen (Kawamura et al. 1997).

5.3 k im Vergleich mit anderen Studien

Die Mutationsraten im männlichen und weiblichen Geschlecht unterscheiden sich abhängig von der Art der vorliegenden Mutation im Dystrophin-Gen. Eine erste Einschätzung der verschiedenen Wahrscheinlichkeiten für bestimmte Mutationstypen während der Oogenese und Spermatogenese zeigten Grimm et al. 1994 in einer Untersuchung an 208 Patienten für Muskeldystrophie Duchenne auf Grundlage der Ergebnisse von Muller et al. (Muller et al. 1992). Dabei fanden sich für k_{Deletion} ein Wert von 0,3 (hier: $k = 0,26$) und für $k_{\text{Punktmutation}}$ ein Wert von 2,2 (hier: $k = 2,8$) (Grimm et al. 2009).

In der Studie von Grimm et al. aus dem Jahr 1994 wurde für k noch ein deutlich höherer Wert vermutet ($k_{\text{Punktmutation}} = 40,3$), da man die autosomal rezessiven Phänokopien miteinbezogen hatte. Die Möglichkeit des Vorliegens autosomal rezessiver Phänokopien musste in der hier vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden, da die Diagnose einer DMD bei allen Patienten durch eine Muskelbiopsie mit fehlendem Dystrophinnachweis gesichert war.

Auf Grundlage der Ergebnisse von Kawamura et al. (Kawamura 1997) konnte $k_{\text{Duplikation}}$ erstmals mit 5 angegeben werden. $k_{\text{Punktmutation}}$ wurde auf 5 korrigiert, k_{Deletion} nur leicht von 0,3 auf 0,385 angepasst (Grimm et al. 2009).

Viele Autoren beobachteten Unterschiede in der Entstehung der verschiedenen Mutationen. Tuffery et al. untersuchten in einer „small but

extensively analyzed sample" 65 französische DMD-Patienten. Die Studie aus dem Jahr 1998 umfasste zunächst 94 Patienten mit DMD und BMD. Fünf Teilnehmer (i.e. 5,3 %) mussten jedoch wieder ausgeschlossen werden, da nachgewiesen werden konnte, dass sie nicht an einer durch auf dem X-Chromosom liegenden Muskeldystrophie litten. Es fand sich für $k_{\text{Punktmutation}}$ ein Wert von 2,0 und damit eine höhere Entstehungswahrscheinlichkeit von X-chromosomalen Muskeldystrophien in der Spermatogenese. Für Deletionen wurde $k = 0,3$ berechnet. DMD- bzw. BMD-Patienten mit Duplikationen waren in der Studie nicht vertreten (Tuffery et al. 1998).

	Deletion	Duplikation	Punktmutation
Grimm et al 1994 n= 208	0,3	-	2,2
Tuffery et al 1998 n= 65	0,3	-	2,0
Grimm et al. 2009 Kawamura et al 1997 n= 108	0,385	5	5
vorliegende Arbeit n=102	0,26	nicht berechenbar mit den zur Verfügung stehenden Daten	2,8

Tabelle 8 Übersicht über die in der Literatur gefundenen k .

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Frage des Ursprungs der Mutation bei sporadisch aufgetretenen DMD-Erkrankungen.

Hu et al. stellten in einer im Jahre 1990 veröffentlichten Studie fest, dass vier von fünf untersuchten Duplikationen in der Spermatogenese entstanden. Sie führten dies darauf zurück, dass Duplikationen durch Schwesternchromatidaustausch hervorgerufen werden und dementsprechend mit dem Replikationsprozess zusammenhängen (Hu et al. 1990).

Dolinsky et al. untersuchten zwanzig brasilianische DMD-Patienten mit per DGGE-Analyse nachgewiesener Punktmutation. Bei 16 DMD-Patienten (81%) war die Mutter Trägerin der Punktmutation und diese ebenfalls großväterlichen Ursprungs (Dolinsky et al. 2002).

Auch Helderman-van den Enden et al. zeigten, dass Deletionen im Dystrophin-Gen häufiger auf dem X-Chromosom der Großmutter mütterlicherseits entstehen. Punktmutationen im Dystrophin-Gen seien jedoch öfter beim großmütterlichen Großvater entstanden. Erklärt wird dies ebenfalls mit der höheren Anzahl von Zellteilungen in der Spermatogenese (Helderman-van den Enden et al. 2009).

Lee et al. postulierten in einer kürzlich veröffentlichten Studie deshalb einen Zusammenhang zwischen dem Mutationstyp und dem Anteil von der Mutter übertragener Mutationen im Dystrophin-Gen. Sie untersuchten 139 DMD-Patienten und deren Mütter (99 Deletionen, zwölf Duplikationen, 28 Punktmutationen). Die Ergebnisse unterstützen die These, dass Punktmutationen während der Spermatogenese entstehen, da die gemessene Heterozygotenhäufigkeit in diesem Fall höher war. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant. Insgesamt lag die Heterozygotenhäufigkeit bei 57,6 % und damit niedriger als 66 %, wie es das Mutations-Selektions-Gleichgewicht vermuten ließe. Die Autoren vermuten, dass dies auf verbesserte gendiagnostische Methoden zurückzuführen ist. Sei eine Frau nach Geburt eines an DMD erkrankten Sohnes als Trägerin einer Mutation im Dystrophin-Gen identifiziert, würde die Geburt weiterer betroffener

Söhne verhindert. Zahlen aus den Niederlanden stützten diese Theorie (Lee et al. 2014).

5.4 Hypothesen zur Entstehung verschiedener Mutationstypen

Grundsätzlich scheinen kleine Punktmutationen häufiger in der Spermatogenese zu entstehen. Deletionen haben jedoch ihren Ursprung augenscheinlich deutlich öfter in der Oogenese genommen (Antonarakis und Cooper 2010). Eine Ursache dafür liegt wohl in der deutlich höheren Anzahl von Zellteilungen während der Spermatogenese (Vogel 1977). James F. Crow vermutet deshalb einen direkten Zusammenhang mit dem Replikationsprozess, wohingegen größere Mutationen wie Deletionen und Duplikationen durch ungleiche Cross-over und Rekombination während der Meiose (Crow 1997). Für Dystrophin und Utrophin konnte eine Untersuchung der Introns Hinweise liefern, dass durch die hohe Anzahl repetitiver Sequenzen - diese machten ca. ein Drittel des gesamten Introns aus - eine besondere Anfälligkeit für nicht-homologe Rekombination besteht (Pozzoli et al. 2002),

Insbesondere die Mechanismen, die zu Duplikationen führen, sind noch nicht hinreichend geklärt und Gegenstand der Forschung. Hu et al. (Hu et al. 1990; Hu et al. 1991) unterstellen z.B. für DMD und BMD, dass Deletionen und Duplikationen zwar durch ähnliche Mechanismen, nämlich ungleichen Chromatidaustausch, entstehen könnten und demnach gleich häufig sein müssten; Deletionen sind jedoch - zumindest im Falle der DMD - viel häufiger. Vermutlich seien diese Deletionen auf einem Einzelchromatid entstanden. Eine andere Entstehungsmöglichkeit wäre eine spontane Deletion in den einst duplizierten Exons. Die Autoren geben der letztgenannten Hypothese den Vorzug und führen zwei Arbeiten an, in denen Duplikationen im HPRT-Gen (ursächlich für das Lesch-Nyhan-Syndrom) und Faktor VIII-Gen eine spontane Deletion erlebten (Hu et al. 1990; Hu et al. 1991).

Zudem wurde beschrieben, dass mit zunehmendem väterlichen Alter auch die Anzahl von de novo - Mutationen erhöht ist (Kong et al. 2012). Diese erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit von Kindern wurde zwar für andere Krankheiten - darunter auch das ebenfalls X-chromosomal-rezessive Lesch-Nyhan-Syndrom - beobachtet, nicht jedoch für DMD. Das mag daran liegen, dass dieser „paternal age effect“ wegen der hohen Anzahl der DMD-Erkrankungen, die durch Deletionen verursacht werden - nämlich etwa 2/3 -, weniger ins Gewicht fällt (Crow 1997).

Die Mechanismen, die zu diesem „paternal age effect“ führen, sind Gegenstand der humangenetischen Forschung und noch nicht vollständig verstanden. Der „paternal age effect“ wurde insbesondere für eine Gruppe von autosomalen Erkrankungen untersucht (z.B. Apert-Syndrom und Achondroplasie). All diesen Erkrankungen ist gemeinsam, dass ihnen Mutationen zugrunde liegen, die in den RAS-Signaltransduktionsweg eingreifen (Goriely et al. 2012).

5.5 Geschlechtsabhängige Mutationsraten bei anderen Krankheiten

In dieser Arbeit wie auch in früheren Studien wurden für DMD unterschiedliche Mutationsraten in den Geschlechtern abhängig vom Mutationstyp beschrieben.

Auch bei anderen Erkrankungen wurden geschlechtsabhängige Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Mutationsarten beschrieben. Anhand der beispielhaft ausgewählten Erkrankungen Hämophilie A, Lesch-Nyhan-Syndrom und hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN I; Charcot-Marie-Tooth) sollen diese dargelegt werden.

In einer Untersuchung an 41 Patienten mit Hämophilie A, einer X-chromosomal-rezessiv vererbten Gerinnungsstörung, bestimmte eine Studiengruppe um A.H. Brocker-Vriends ein k von 5,2 und damit eine höhere

Entstehungswahrscheinlichkeit in der Spermatogenese. Dies hat direkten Einfluss auf die vermutete Heterozygotenrate, die nach diesen Annahmen bei 86 % vermutet wird (Brocker-Vriends 1991). Nachfolgende Untersuchungen für einzelne Mutationstypen (Inversion, Punktmutation und Deletion) von Becker et al. ermittelten für Hämophilie A $k_{\text{Inversion}} = 14,7$, $k_{\text{Punktmutation}} = 4,3$ und $k_{\text{Deletion}} < 0,1$ (Becker et al. 1996). Eine kleinere Analyse von 29 schwedischen Hämophilie-A-Patienten zeigte zwar eine sechsmal so große Entstehungswahrscheinlichkeit von Mutationen in der Spermatogenese, jedoch keine Unterschiede in den einzelnen Mutationstypen (Ljung und Sjörin 1999).

Inzwischen weiß man, dass die Hämophilie A vor allem durch kleine Inversionen und Punktmutationen verursacht wird. Deletionen werden nur selten beobachtet (Castaldo et al. 2007). Dies könnte das - im Vergleich mit DMD noch höher liegende k erhärten. Anders als jedoch zu erwarten gewesen wäre, ist kein „paternal-age-Effekt“ zu beobachten (Thomas 1996).

Die hereditäre motorisch-sensible Neuropathie 1 (HMSN1) bzw. Morbus Charcot-Marie-Tooth 1a wird autosomal-dominant vererbt und ist am häufigsten durch eine Duplikation auf Chromosom 17 (17p11.2) bedingt, die das PMP22-Gen mit dem Genprodukt Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22) einschließt. Punktmutationen machen etwa nur 5 % der HMSN1-Fälle aus. Es handelt sich bei der HMSN1 um eine im Jugend- und Erwachsenenalter beginnende neurodegenerative Erkrankung mit einer distal betonten Schwäche der Extremitätenmuskulatur (van Paassen et al. 2014). Palau et al. untersuchten den Ursprung der häufig Charcot-Marie-Tooth verursachenden Duplikation und fanden den Ursprung in einem ungleichen Crossing-over der Einzelchromatiden auf Chromosom 17 während der väterlichen Meiose (Palau et al. 1993). Ein Alterseffekt konnte hier nicht nachgewiesen werden, was die Vermutung bekräftigt, dass Duplikationen unabhängig von Replikation entstehen (Thomas 1996).

Das X-chromosomal-rezessiv vererbte Lesch-Nyhan-Syndrom wird durch Deletionen, Duplikationen und vor allem Punktmutationen im HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)- Gen verursacht und führt zu einem schweren Defekt im Purinstoffwechsel (Torres und Puig 2007). Es wurde beobachtet, dass mit zunehmendem väterlichen Alter bei Zeugung des Kindes mehr Erkrankungen auftreten und die Mutationen insbesondere in der Spermatogenese entstehen mit einem k von 8,75 (Francke et al. 1976). Der hohe Anteil von Punktmutationen könnte diesen „paternal-age-Effekt“ begründen und die o.a. Hypothese bestätigen, dass Punktmutationen replikationsbedingt sind und mit zunehmendem Alter häufiger werden (Crow 1997).

5.6 Konsequenzen für die Risikoberechnung

Obwohl heute Mutationen im Dystrophin-Gen auch bei heterozygoten Frauen meist sicher nachgewiesen werden können, bleibt ein kleiner Anteil von etwa drei Prozent auch nach der Sequenzierung unentdeckt. Wird ausschließlich eine MLPA durchgeführt, beträgt der Anteil nicht nachgewiesener Mutationen sogar 26,5 % (Grimm et al. 2012).

Für die humangenetische Beratung möglicher Konduktorinnen ist neben anderen Variablen das Verhältnis der Mutationsraten k in Spermatogenese zu Oogenese deshalb von großer Wichtigkeit. Im Folgenden seien exemplarisch zwei Berechnungen, nämlich für Deletion und Punktmutation, aufgeführt.

Die Mutter eines an DMD erkrankten Jungen mit Nachweis einer Deletion beim Jungen fragt nach ihrem Risiko, Überträgerin zu sein (Abbildung 13).

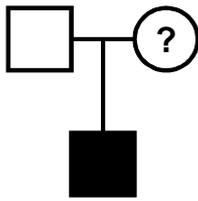


Abbildung 13

Mutter eines an DMD erkrankten Sohnes (Mutation = Deletion).

	Heterozygote Frauen	KZM	Nicht-Heterozygote
Mutter	$(2u+2ku)(1-g+gf)$	$2gu$	~ 1
1 kranker Sohn	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}f$	$(1-g)u$
verbundene Wahrscheinlichkeit	$u(1+k)(1-g+gf)$	fgu	$(1-g)u$
Summe der verbundenen Wahrscheinlichkeiten = $u [(1-g+gf)(2+k)]$ Mutter (Het) = $u [(1-g+gf)(1+k)] / u [(1-g+gf)(2+k)] = (1+k) / (2+k)$ M_{Het} mit k_{Deletion} von $0,26 = 1,26/2,26 \approx 0,56$			

Tabelle 9 Berechnung der Heterozygotenwahrscheinlichkeit bei einer Mutter mit einem an DMD erkrankten Sohn. Die Tabelle zeigt den Fall einer beim Sohn nachgewiesenen Deletion im Dystrophin-Gen. (u = Mutationsrate in der Oogenese; v = Mutationsrate in der Spermatogenese; g = Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Mitose, die zu einem Keimzellmosaik führt; $1-g$ = Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Meiose; f = mittlere Häufigkeit der Oozyten oder Spermien, die durch eine mitotische Neumutation Genträger wurden (= Segregationsrate); k = Verhältnis der Mutationsrate von Spermatogenese zu Oogenese).

Es gilt: $M_{\text{Het}} = \frac{1+k}{2+k}$ und k ist bei DMD im Falle einer Deletion = 0,26. Damit ergibt sich ein Heterozygotenrisiko der Mutter von 0,56 für das Dystrophin-Gen.

Wäre bei ihrem Sohn eine Punktmutation im Dystrophin-Gen nachgewiesen worden, so wäre ihr Risiko, Überträgerin zu sein, bei einem k von 2,8 wie folgt zu berechnen:

$$M_{\text{Het}} = \frac{1+k}{2+k} \text{ und } k \text{ ist bei Punktmutation} = 2,8$$

$$M_{\text{Het}} = \frac{1+2,8}{2+2,8} = 0,79.$$

Das Heterozygotenrisiko der Mutter, Trägerin einer DMD verursachenden Punktmutation zu sein, liegt somit bei 0,79.

Würde man von gleichen Mutationsraten im männlichen und weiblichen Geschlecht ausgehen, beträgt die Wahrscheinlichkeit der Mutter, Konduktorin zu sein, 66 %.

Beachtet man jedoch die unterschiedlichen Mutationsraten, lässt sich im vorliegenden Fall eines an DMD erkrankten Sohnes je nach vorliegender Mutation eine Risikospanne von 0,56 (Deletion) bis 0,79 (Punktmutation) berechnen. Je nach vorliegendem Mutationstyp ist die Wahrscheinlichkeit für die Mutter, Trägerin einer Mutation im Dystrophin-Gen zu sein, also unterschiedlich.

Durch die in dieser Arbeit erfolgte Präzisierung der Mutationskonstanten k_{Deletion} , $k_{\text{Duplikation}}$ und $k_{\text{Punktmutation}}$ für DMD ist eine genauere Vorhersage der Heterozygotenwahrscheinlichkeit im Dystrophin-Gen möglich.

Die nochmalige Prüfung der im Institut für Humangenetik der Universität Würzburg bis zum Jahr 1994 vorhandenen und der Einschluss weiterer Familienakten bis zum Jahr 2007 erbrachte erweiterte Erkenntnisse durch die nun mögliche exakte Sicherung der Diagnose durch Muskelbiopsie und zusätzlich den genetischen Nachweis einer DMD-verursachenden Mutation durch MLPA bzw. Sequenzierung, den Verzicht auf die Betrachtung familiärer Fälle mit wiederholten Erkrankungen an DMD sowie die Berücksichtigung zwischenzeitlich präzisierter molekulargenetischer Diagnostik.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten k -Werte werden nun in der genetischen Beratung von durch DMD betroffenen Familien zur genaueren Berechnung der Heterozygotenwahrscheinlichkeit am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg eingesetzt.

6. Zusammenfassung

Muskeldystrophie Duchenne (DMD) gehört mit 1:3500 männlichen Geburten zu den häufigsten genetisch-determinierten Erkrankungen und ist bis heute nicht heilbar. Die genetische Beratung ist Teil der Betreuung dieser Patienten und bezieht auch die Heterozygotenwahrscheinlichkeit weiblicher Angehöriger mit ein. Für die Risikoberechnung zum Überträgerstatus weiblicher Angehöriger von DMD-Patienten sind neben Stammbauminformationen und Enzymwerten Verhältnisse der Mutationsraten (k -Werte) essentiell, welche die unterschiedliche Entstehungswahrscheinlichkeit der einzelnen Mutationstypen (Deletion, Duplikation, Punktmutation) in Spermatogenese oder Oogenese beschreiben.

Durch die vorliegende Arbeit sollten die bisher verwendeten Mutationskonstanten präzisiert werden. Dafür wurden 1777 Akten von DMD-Familien aus dem Institut für Medizinische Genetik der Universität Würzburg analysiert. Bei 102 Patienten mit gesicherter DMD-Diagnose konnte durch Haplotypanalyse der großväterliche bzw. großmütterliche Ursprung des X-Chromosoms, welches die DMD-verursachende Mutation trägt, eindeutig festgestellt werden. Patienten, die keiner Haplotypanalyse unterzogen worden waren, wurden ebenso wie Patienten ohne sicheren Mutationsnachweis oder ohne durchgeführte Muskelbiopsie aus der Untersuchung ausgeschlossen. Familiäre Fälle wurden ebenfalls nicht berücksichtigt.

Die Bestimmung des Verhältnisses k der Mutationsraten zeigte, dass einerseits Deletionen im Dystrophin-Gen viel häufiger großmütterlichen Ursprungs ($k_{\text{Deletion}} \approx 0,26$) und andererseits Punktmutationen im Dystrophin-Gen meist großväterlichen Ursprungs ($k_{\text{Punktmutation}} \approx 2,8$) sind. Eine Berechnung für $k_{\text{Duplikation}}$ bei DMD war aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht möglich.

Die in der vorliegenden Arbeit berechneten Werte bestätigen die Resultate früherer Arbeiten von anderen Autoren. Die Werte k_{Deletion} und $k_{\text{Punktmutation}}$ konnten jedoch durch die strikten Ein- und Ausschlusskriterien genauer berechnet werden. Dadurch kann eine verbesserte Risikokalkulation in der genetischen Beratung der von DMD betroffenen Familien erreicht werden, was besonders im Hinblick auf die weitere Familienplanung von Bedeutung ist.

7. Literaturverzeichnis

Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J. und Den Dunnen, J.T. (2006): Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135-144.

Allingham-Hawkins, D.J., McGlynn-Steele, L.K., Brown, C.A., Sutherland, J. und Ray, P.N. (1998): Impact of carrier status determination for Duchenne/Becker muscular dystrophy by computer-assisted laser densitometry. *Am J Med Genet* 75, 171-175.

Ameen, V. und Robson, L.G. (2010): Experimental models of duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. *Open Cardiovasc Med J* 4, 265-277.

Antonarakis, S.E. und Cooper, D.N.(2010):Human Gene Mutation: Mechanisms and Consequences. In: Speicher M., Antonarakis S. E., Motulsky A. Vogel and Motulsky's Human Genetics - Problems and Approaches, 4. Aufl., Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 348-349.

Armour, J.A., Sismani, C., Patsalis, P.C. und Cross, G. (2000): Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28, 605-609.

Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G.A., Spiegler, A.W., Borkowska, J. und Petruszewicz, I.H. (1990): Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* 84, 522-526.

Becker, J., Schwaab, R., Moller-Taube, A., Schwaab, U., Schmidt, W., Brackmann, H.H., Grimm, T., Olek, K. und Oldenburg, J. (1996): Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet* 58, 657-670.

Biggar, W.D., Harris, V.A., Eliasoph, L. und Alman, B. (2006): Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord* 16, 249-255.

Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P.U. (2004): *Pathologie*. 3. Aufl., München-Jena, Elsevier Urban und Fischer, 345-346.

Brocker-Vriends, A.H., Rosendaal, F.R., van Houwelingen, J.C., Bakker, E., van Ommen, G.J., van de Kamp, J.J. und Briet, E. (1991): Sex ratio of the mutation frequencies in haemophilia A: coagulation assays and RFLP analysis. *J Med Genet* 28, 672-680.

Carsana, A., Frisso, G., Tremolaterra, M.R., Lanzillo, R., Vitale, D.F., Santoro, L. und Salvatore, F. (2005): Analysis of dystrophin gene deletions indicates that the hinge III region of the protein correlates with disease severity. *Ann*

Hum Genet 69, 253-259.

Castaldo, G., D'Argenio, V., Nardiello, P., Zarrilli, F., Sanna, V., Rocino, A., Coppola, A., Di Minno, G. und Salvatore, F. (2007): Haemophilia A: molecular insights. Clin Chem Lab Med 45, 450-461.

Chaturvedi, L.S., Mittal, R.D., Srivastava, S., Mukherjee, M. und Mittal, B. (2000): Analysis of dinucleotide repeat loci of dystrophin gene for carrier detection, germline mosaicism and de novo mutations in Duchenne muscular dystrophy. Clin Genet 58, 234-236.

Covone, A.E., Lerone, M. und Romeo, G. (1991): Genotype-phenotype correlation and germline mosaicism in DMD/BMD patients with deletions of the dystrophin gene. Hum Genet 87, 353-360.

Covone, A.E., Caroli, F. und Romeo, G. (1992): Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three-multiplex PCR. Am J Hum Genet 51, 675-677.

Crow, J.F. (1997): The high spontaneous mutation rate: is it a health risk? Proc Natl Acad Sci U S A 94, 8380-8386.

Cyrułnik, S.E., Fee, R.J., De Vivo, D.C., Goldstein, E. und Hinton, V.J. (2007): Delayed developmental language milestones in children with Duchenne's muscular dystrophy. J Pediatr 150, 474-478.

Cyrus, A., Street, N., Quarry, S., Kable, J., Kenneson, A. und Fernhoff, P. (2012): Clinic-based infant screening for duchenne muscular dystrophy: a feasibility study. PLoS Curr e4f99c5654147a.

Danieli, G.A., Mioni, F., Muller, C.R., Vitiello, L., Mostacciuolo, M.L. und Grimm, T. (1993): Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. Hum Genet 91, 342-346.

De Becker, I., Riddell, D.C., Dooley, J.M. und Tremblay, F. (1994): Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. Br J Ophthalmol 78, 719-722.

Den Dunnen, J.T., Grootsholten, P.M., Bakker, E., Blonden, L.A., Ginjaar, H.B., Wapenaar, M.C., van Paassen, H.M., van Broeckhoven, C., Pearson, P.L. und van Ommen, G.J. (1989): Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. Am J Hum Genet 45, 835-847.

Diener, H.-C. und Weimar, C. (2012): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Thieme, Stuttgart, 6-7.

Dolinsky, L.C., de Moura-Neto, R.S. und Falcao-Conceicao, D.N. (2002): DGGE analysis as a tool to identify point mutations, de novo mutations and

carriers of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 12, 845-848.

Duchenne, G. (1868): Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclérosique in: Lasègue C, Duplay S. *Archives générales de Médecine*. 1. Aufl., Reihe 6, Band 11. Paris, P. Asselin, 179.

Dudley, R.W., Danialou, G., Govindaraju, K., Lands, L., Eidelman, D.E. und Petrof, B.J. (2006): Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. *Am J Pathol* 168, 1276-1287; quiz 1404-1275.

Emery, A.E. (1991): Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1, 19-29.

Engel, J.M., Kartin, D., Carter, G.T., Jensen, M.P. und Jaffe, K.M. (2009): Pain in youths with neuromuscular disease. *Am J Hosp Palliat Care* 26, 405-412.

Florentin, L., Mavrou, A., Kekou, K. und Metaxotou, C. (1995): Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. *J Med Genet* 32, 48-51.

Forst, R.: Die orthopädische Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie (2000). 1. Aufl., Stuttgart, Thieme-Verlag, 12-13; 22;52; 55-60.

Francke, U., Felsenstein, J., Gartler, S.M., Migeon, B.R., Dancis, J., Seegmiller, J.E., Bakay, F. und Nyhan, W.L. (1976): The occurrence of new mutants in the X-linked recessive Lesch-Nyhan disease. *Am J Hum Genet* 28, 123-137.

Gencik, M., Epplen, J.T. und Mortier, W. (1999): [Diagnosis of neuromuscular diseases: progress with molecular genetic techniques]. *Dtsch Med Wochenschr* 124, 85-87.

Gillard, E.F., Chamberlain, J.S., Murphy, E.G., Duff, C.L., Smith, B., Burghes, A.H., Thompson, M.W., Sutherland, J., Oss, I., Bodrug, S.E. und et al. (1989): Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet* 45, 507-520.

Goriely, A., und Wilkie, A.O. (2012): Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *Am J Hum Genet* 90, 175-200.

Gowers, W. (1879): Pseudo-hypertrophic Muscular Paralysis - A Clinical Lecture. Vortrag am National Hospital for the Paralysed and the Epileptic, veröffentlicht in London, Churchill J. und A., 35.

Grimm, T. (1981): Neugeborenen-Screening nach Duchennescher Muskeldystrophie. *Monatsschr Kinderheilkd* 129, 414-417.

Grimm, T. (1982): Counseling female relatives of Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients: limited impact of information on unaffected males in previous generations. *Clin Genet* 22, 148-149.

Grimm, T., Muller, B., Muller, C.R. und Janka, M. (1990): Theoretical considerations on germline mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 27, 683-687.

Grimm, T., Meng, G., Liechti-Gallati, S., Bettecken, T., Muller, C.R. und Muller, B. (1994): On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet* 31, 183-186.

Grimm, T., Kress, W., Meng, G. und Müller-Reible, C. (2009): Muskeldystrophien Duchenne und Becker. Molekulargenetische Diagnostik und genetisches Modell. *Medizinische Genetik* 21, 327-331.

Grimm, T., Kress, W., Meng, G. und Müller-Reible, C. (2011): Risikoberechnungen beim X-chromosomal rezessiven Erbgang. *Medizinische Genetik* 23, 373-376.

Grimm, T., Kress, W., Meng, G. und Muller, C.R. (2012): Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31, 179-183.

Haldane, J.B. (1935): The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935. *J Genet* 83, 235-244.

Heemskerk, H., de Winter, C., van Kuik, P., Heuvelmans, N., Sabatelli, P., Rimessi, P., Braghetta, P., van Ommen, G.J., de Kimpe, S., Ferlini, A., Aartsma-Rus, A. und van Deutekom, J.C. (2010): Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol Ther* 18, 1210-1217.

Helderman-van den Enden, A.T., de Jong, R., den Dunnen, J.T., Houwing-Duistermaat, J.J., Kneppers, A.L., Ginjaar, H.B., Breuning, M.H. und Bakker, E. (2009): Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet* 75, 465-472.

Hu, X.Y., Ray, P.N., Murphy, E.G., Thompson, M.W. und Worton, R.G. (1990): Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet* 46, 682-695.

Hu, X.Y., Ray, P.N. und Worton, R.G. (1991): Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *Embo J* 10, 2471-2477.

Hübner, C., Kaindl, A.M. und Schülke, M. (2009) in: Speer, C.P. und Gahr, M. Pädiatrie. 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 290-292.

Janka, M. und Grimm, T. (1991): [Importance of germ cell mosaic for genetic counseling of families with Duchenne and Becker muscular dystrophy]. Klin Padiatr 203, 354-358.

Janssen, B., Hartmann, C., Scholz, V., Jauch, A. und Zschocke, J. (2005): MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. Neurogenetics 6, 29-35.

Kawamura, J., Kato, S., Ishihara, T., Hiraishi, Y. und Kawashiro, T. (1997): Difference of new mutation rates in dystrophin gene between deletion and duplication mutation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Rinsho Shinkeigaku 37, 212-217.

Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., Garralda, M.E., Rutherford, M., McCulley, C., Popplewell, L., Graham, I.R., Dickson, G., Wood, M.J., Wells, D.J., Wilton, S.D., Kole, R., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Morgan, J.E. und Muntoni, F. (2009): Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. Lancet Neurol 8, 918-928.

Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H. und et al. (1989): The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45, 498-506.

Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Wong, W.S., Sigurdsson, G., Walters, G.B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D.F., Helgason, A., Magnusson, O.T., Thorsteinsdottir, U. und Stefansson, K. (2012): Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471-475.

Korinthenberg, R. (2004) in: Reinhardt, D. *Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter*. 7. Aufl., Berlin, Springer-Verlag. 1362-1368.

Korinthenberg, R. (2008) in: Aksu, F. *Neuropädiatrie*. 3.Aufl., Bremen, Uni-Med, 326-328.

Kress, W., Mortier, W., Müller, C.R. und Grimm, T. (2002) in: Rieß, O. und Schöls, L. *Neurogenetik: Molekulargenetische Diagnostik neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen*, 2. Aufl., Stuttgart, Kohlhammer, 470-476.

Lee, T., Takeshima, Y., Kusunoki, N., Awano, H., Yagi, M., Matsuo, M. und Iijima, K. (2014): Differences in carrier frequency between mothers of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *J Hum Genet* 59, 46-50.

Ljung, R.C. und Sjorin, E. (1999): Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *Br J Haematol* 106, 870-874.

Malhotra, S.B., Hart, K.A., Klamut, H.J., Thomas, N.S., Bodrug, S.E., Burghes, A.H., Bobrow, M., Harper, P.S., Thompson, M.W., Ray, P.N. und et al. (1988): Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242, 755-759.

Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Violette, L. und Mendell, J.R. (2010): Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther Adv Neurol Disord* 3, 379-389.

Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A. und Hartley, L. (2013): Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur J Hum Genet* 21, 1049-1053.

Moxley, R.T., 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D.J. und Campbell, K. (2010): Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol* 25, 1116-1129.

Muir, L.A. und Chamberlain, J.S. (2009): Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med* 11, e18.

Mukherjee, M., Chaturvedi, L.S., Srivastava, S., Mittal, R.D. und Mittal, B. (2003): De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Exp Mol Med* 35, 113-117.

Muller, B., Dechant, C., Meng, G., Liechti-Gallati, S., Doherty, R.A., Hejtmancik, J.F., Bakker, E., Read, A.P., Jeanpierre, M., Fischbeck, K.H. und et al. (1992): Estimation of the male and female mutation rates in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Hum Genet* 89, 204-206.

Müller, C.R. und Grimm, T. (1986): Estimation of the male to female ratio of mutation rates from the segregation of X-chromosomal DNA haplotypes in Duchenne muscular dystrophy families. *Hum Genet* 74, 181-183.

Muntau, C. (2004) in: *Intensivkurs Pädiatrie*. 3. Aufl., München, Elsevier Urban und Fischer, 367-369.

Palau, F., Lofgren, A., De Jonghe, P., Bort, S., Nelis, E., Sevilla, T., Martin, J.J., Vilchez, J., Prieto, F. und Van Broeckhoven, C. (1993): Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2, 2031-2035.

Peltz, S.W., Morsy, M., Welch, E.M. und Jacobson, A. (2013): Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. *Annu Rev Med* 64, 407-425.

Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X. und Tremblay, J.P. (2011): Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 19, 830-840.

Politano, L., Nigro, G., Nigro, V., Piluso, G., Papparella, S., Paciello, O. und Comi, L.I. (2003): Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 22, 15-21.

Pozzoli, U., Sironi, M., Cagliani, R., Comi, G.P., Bardoni, A. und Bresolin, N. (2002): Comparative analysis of the human dystrophin and utrophin gene structures. *Genetics* 160, 793-798.

Rall, S. und Grimm, T. (2012): Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31, 117-120.

Schara, U., Christen, H.-J., Vorgerd, M. (2004): Die erhöhte Creatinkinase als Zufallsbefund. *Kinder- und Jugendarzt*, 575-579.

Schwartz, M. und Duno, M. (2004): Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test* 8, 361-367.

Stec, I., Kress, W., Meng, G., Muller, B., Muller, C.R. und Grimm, T. (1995): Estimate of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy

(LGMD2C, LGMD2D) among sporadic muscular dystrophy males: a study of 415 families. *J Med Genet* 32, 930-933.

Thomas, G.H. (1996): High male:female ratio of germ-line mutations: an alternative explanation for postulated gestational lethality in males in X-linked dominant disorders. *Am J Hum Genet* 58, 1364-1368.

Torres, R.J. und Puig, J.G. (2007): Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2, 48.

Tuffery, S., Chambert, S., Bareil, C., Sarda, P., Coubes, C., Echenne, B., Demaille, J. und Claustres, M. (1998): Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test. *Hum Genet* 102, 334-342.

van Essen, A.J., Busch, H.F., te Meerman, G.J. und ten Kate, L.P. (1992a): Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in The Netherlands. *Hum Genet* 88, 258-266.

van Essen, A.J., Abbs, S., Baiget, M., Bakker, E., Boileau, C., van Broeckhoven, C., Bushby, K., Clarke, A., Claustres, M., Covone, A.E. und et al. (1992b): Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet* 88, 249-257.

van Paassen, B.W., van der Kooi, A.J., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., Verhamme, C., Baas, F. und de Visser, M. (2014): PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J Rare Dis* 9, 38.

van Ruiten, H.J., Straub, V., Bushby, K. und Guglieri, M. (2014): Improving recognition of Duchenne muscular dystrophy: a retrospective case note review. *Arch Dis Child*.

Vogel, F. (1977): A probable sex difference in some mutation rates. *Am J Hum Genet* 29, 312-319.

Vry, J., Schara, U., S, L. und Kirschner, J. (2012): Diagnose und Therapie der Muskeldystrophie Duchenne. *Monatsschr Kinderheilkd* 160, 177-186.

Wang, X., Wang, Z., Yan, M., Huang, S., Chen, T.J. und Zhong, N. (2008): Similarity of DMD gene deletion and duplication in the Chinese patients compared to global populations. *Behav Brain Funct* 4, 20.

White, S., Kalf, M., Liu, Q., Villerius, M., Engelsma, D., Kriek, M., Vollebregt, E., Bakker, B., van Ommen, G.J., Breuning, M.H. und den Dunnen, J.T. (2002): Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet* 71, 365-374.

8. Abkürzungsverzeichnis

BIPAP = biphasic positive airway pressure

BMD = Muskeldystrophie Typ Becker-Kiener

CK = Creatinkinase

CT = Computertomographie

DMD = Muskeldystrophie Typ Duchenne

DNA = Desoxyribonukleinsäure

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

f = mittlere Häufigkeit der Oozyten oder Spermien, die durch eine mitotische Neumutation Genträger wurden (= Segretationsrate)

g = Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Mitose, die zu einem Keimzellmosaik führt

GM bzw. GMH = Großmutter bzw. großmütterlicher Haplotyp

GOT = Glutamatoxalacetattransaminase; ASAT = Aspartataminotransferase

GPT = Glutamatpyruvattransaminase; ALAT = Alaninaminotransferase

GV bzw. GVH = Großvater bzw. großväterlicher Haplotyp

HMSN = hereditäre motorisch-sensible Neuropathie

k = Verhältnis der Mutationsrate von Spermatogenese zu Oogenese

kb = Kilobasen

kDa = Kilodalton

LDH = Lactatdehydrogenase

MAPH = multiplex amplification and probe hybridization

MLPA = multiplex ligation-dependent probe amplification

MRT = Magnetresonanztomographie

M_{NC} = Mutter nicht heterozygot / non-conducting

M_{Het} = Mutter heterozygot

M_{KZM} = Keimzellmosaik bei der Mutter

PCR = polymerase chain reaction

u = Mutationsrate in der Oogenese

v = Mutationsrate in der Spermatogenese

$1-g$ = Wahrscheinlichkeit für Mutation in der Meiose

9. Darstellungsverzeichnis

Abbildung 1	Gowers-Zeichen
Abbildung 2	Kreuzungsschema X-chromosomaler Erbgang
Abbildung 3	Lage des Dystrophin-Gens auf dem X-Chromosom, schematische Darstellung des Dystrophin-Moleküls und schematische Lokalisation der Exons 2-19 und 44-54
Abbildung 4	DMD-Stammbaum mit Haplotypen
Abbildung 5	Meiotische Neumutation
Abbildung 6	Keimzellmosaik bei der Mutter des Indexpatienten
Abbildung 7	Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin (M_{Het})
Abbildung 8	Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und es liegt eine großmütterliche Neumutation vor
Abbildung 9	Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und es liegt eine großväterliche Neumutation vor
Abbildung 10	Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und bei der Großmutter liegt ein Keimzellmosaik vor
Abbildung 11	Mutter des Indexpatienten ist Konduktorin und bei dem Großvater liegt ein Keimzellmosaik vor
Abbildung 12	Mutter und Großmutter des Indexpatienten sind Konduktorinnen
Abbildung 13	Mutter eines an DMD erkrankten Sohnes (Mutation = Deletion)

Tabelle 1	Herleitung des Mutation-Selektionsgleichgewichts
Tabelle 2	Mutations-Selektions-Gleichgewicht im X-chromosomalen Erbgang unter der Annahme gleicher Mutationsraten in beiden Geschlechtern, ausgedrückt als Vielfache der Mutationsrate μ
Tabelle 3	Herleitung des Mutations-Selektions-Gleichgewichts im X-chromosomalen Erbgang bei unterschiedlichen Mutationsraten in beiden Geschlechtern
Tabelle 4	Mutations-Selektions-Gleichgewicht im X-chromosomalen Erbgang bei unterschiedlichen Mutationsraten in beiden Geschlechtern
Tabelle 5	Variablen im genetischen Modell
Tabelle 6	Herleitung des genetischen Modells mit Keimzellmosaik
Tabelle 7	Genetisches Modell mit Keimzellmosaik
Tabelle 8	Übersicht über die in der Literatur gefundenen k
Tabelle 9	Berechnung der Heterozygotenwahrscheinlichkeit bei einer Mutter mit einem an DMD erkrankten Sohn
Diagramm 1	Wohnorte der Indexpatienten
Diagramm 2	Zeitpunkt der genetischen Diagnostik auf DMD
Diagramm 3	Verteilung der gefundenen Mutationstypen
Diagramm 4	Verteilung der gefundenen Deletionen
Diagramm 5	Anzahl der großväterlichen (GVH) und der großmütterlichen (GMH) Haplotypen
Diagramm 6	Verteilung der Mutationstypen für großmütterliche

	Haplotypen (GMH)
Diagramm 7	Verteilung der Mutationstypen für großväterliche Haplotypen (GVH)
Diagramm 8	Verteilung der Deletionen auf GVH und GMH
Diagramm 9	Verteilung der Duplikationen auf GVH und GMH
Diagramm 10	Verteilung der Punktmutationen auf GVH und GMH

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg - allen voran Herrn Prof. Dr. Tiemo Grimm, der diese Arbeit vergeben und mir während der Entstehung stets zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank auch an Verena, die mir mit konstruktiver Kritik und aufmunternden Worten stets eine große Hilfe war.

Vielen Dank meinem Mann Manfred für seine Unterstützung und meinen wunderbaren Töchtern Theresa und Mathilda.