

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. Höhn

Klinik und Genetik der myotonen Dystrophie Curschmann-Steinert,
der facio-scapulo-humeralen Muskeldystrophie
und der Gliedergürtelmuskeldystrophie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christian Schmid
aus Memmingen

Würzburg, Juni 2004

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. R. Müller-Reible

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juni 2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Allgemeines.....	S. 1
1.2. fazioscapulothumerale Muskeldystrophie (FSHD).....	S. 2
1.2.1. Epidemiologie und Klinik.....	S. 2
1.2.2. Genetik und Pathophysiologie.....	S. 5
1.2.3. Diagnostik	S. 5
1.3. Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD).....	S. 6
1.3.1. Epidemiologie und Klinik.....	S. 6
1.3.2. Genetik und Pathophysiologie.....	S. 7
1.3.3. Diagnostik	S. 9
1.4. myotone Dystrophie Curschmann-Steinert (MD).....	S. 11
1.4.1. Epidemiologie und Klinik.....	S. 11
1.4.2. Genetik und Pathophysiologie	S. 15
1.4.3. Diagnostik	S. 16
1.5. tabellarische Darstellung der Erkrankungen	S. 20
2. Zielsetzung	S. 22
3. Material und Methoden	
3.1. Material.....	S. 23
3.1.1. Geräte	S. 23
3.1.2. Pufferlösungen	S. 24
3.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	S. 26

3.2	<i>Methoden</i>	S. 27
3.2.1.	Übersicht über die Methodik.....	S. 27
3.2.2.	DNA-Extraktion aus Vollblut	S. 27
3.2.3.	DNA-Restriktionsverdau.....	S. 28
3.2.4.	Horizontalgelelektrophorese und Southern-Blott	S. 30
3.2.5.	Herstellung der DNA-Sonde	S. 32
3.2.6.	Strippen der Membran.....	S. 35
3.2.7.	Labeln der DNA-Sonde.....	S. 35
3.2.8.	Hybridisieren, Waschen und Entwickeln der Nylonmembran.....	S. 36
4.	Ergebnisse	
4.1.	Differentialdiagnostik, myotone Dystrophie	S. 38
4.2.	Differentialdiagnostik, fazioscapulohumerale Muskeldystrophie..	S. 47
5.	Diskussion	S. 50
6.	Literaturverzeichnis	S. 53
7.	Abbildungsverzeichnis	S. 65

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Unter dem Oberbegriff der Muskeldystrophien werden genetisch sehr unterschiedliche Erkrankungen der Muskeln zusammengefasst. Klinisch und durch weitergehende Diagnostik sind sie jedoch eindeutig von anderen neuromuskulären Erkrankungen zu unterscheiden.

Ihre Pathophysiologie beruht oft auf einem Defekt oder dem Fehlen eines Strukturproteins oder eines Enzyms, wodurch die muskulären Veränderungen bedingt sind. Durch molekulargenetische und histologische Untersuchungen kann dieser Defekt oder Mangel des spezifischen Proteins nachgewiesen werden. Da sich die Erkrankungen in ihrem Phänotyp vor allem in fortgeschritteneren Stadien ähneln können, muss besonders auf den Beginn, den Verlauf und die primäre Lokalisation der Symptome geachtet werden.

Erstmalig wurden die unterschiedlichen Formen der Muskeldystrophien 1940 von Becker nach ihrem Erbgang eingeteilt. Er differenzierte die autosomal-dominanten Muskeldystrophien, die autosomal-rezessiven Gliedergürtelmuskeldystrophien und die gonosomal vererblichen progressiven Muskeldystrophien. Die häufigste degenerative Muskelerkrankung des Erwachsenenalters ist die myotone Dystrophie Curschmann-Steinert.

In dieser Arbeit wird auf die Klinik und Genetik der Gliedergürtelmuskeldystrophie, der myotonen Dystrophie Curschmann-Steinert, sowie auf die von Landouzy 1884 erstbeschriebene fazioscapulohumerale Muskeldystrophie weiter eingegangen.

1.2. fazioscapulohumereale Muskeldystrophie (FSHD)

1.2.1. Epidemiologie und Klinik

Bereits 1884 wurde diese Erkrankung erstmals von den französischen Ärzten Louis T.J. Landouzy und Joseph J. Déjérine beschrieben und auf den autosomal-dominanten Erbgang hingewiesen.

Ihre Prävalenz wird von Morten und Chung (1959) mit 2 : 1 000 000 für die USA angegeben. Für Europa wurde gestützt auf genetische und klinische Daten eine Inzidenz von 1 - 5 : 100 000 errechnet (Zierz et al., 1999). Die Zahl der Neumutationen ist bei einer leicht herabgesetzten Fruchtbarkeit der Betroffenen nicht größer als 5 : 10 000 000 (Lunt et al., 1989). Frauen und Männer sind von der FSHD gleichermaßen betroffen. Bei Neumutationen sind jedoch Männer öfter betroffen. In ihrer Häufigkeit unter den Muskeldystrophien nimmt sie den dritten Rang hinter der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne und der myotonen Dystrophie ein.

Das Manifestationsalter liegt im Bereich von früher Kindheit bis ins hohe Erwachsenenalter, vorwiegend jedoch im zweiten Lebensjahrzehnt (Tawil et al., 1998). Die Penetranz der FSHD liegt bei 5 % im Alter von 0 - 4 Jahren, bei 21 % im Alter von 5 - 9 Jahren, bei 58 % im Alter von 10 - 14 Jahren, bei 86 % im Alter von 15 -19 Jahren und bei 95 % im Alter von über 20 Jahren (Lunt et al., 1989).

Erstlokalisation der Symptomatik ist meist das Gesicht. Betroffen sind dabei besonders der M. orbicularis oculi und der M. zygomaticus (Mortier et al., 1994). Die äußere Augenmuskulatur, die Kaumuskulatur und die Pharynxmuskulatur werden ausgespart. Bei kleinen Kindern fällt speziell das Schlafen mit offenen Augen auf. Die Patienten haben Probleme beim Pfeifen oder Trinken mit einem Strohhalm. Auch Schwierigkeiten beim Sprechen sind beschrieben, da die Bildung

von Lippenlauten eingeschränkt ist. Ansonsten fällt in der klinischen Untersuchung eine facies myopathica mit Ptosis auf, wobei die Symptomatik im Gesicht oft erst retrospektiv bei fortgeschrittenerem Krankheitsverlauf deutlich wird (Zierz et al., 1999).

Im weiteren Verlauf ist die Muskulatur des Schultergürtels betroffen. Dies zeigt sich in der Inspektion des Patienten durch scapulae alatae und durch auffällig horizontale oder seitlich steil abfallende Schlüsselbeine. Typisch sind auch bestehende Achsel-Brust-Falten und das sogenannte „Durchschlüpfphänomen“ beim Hochheben von betroffenen Kindern unter ihren „losen Achseln“. Durch eine verstärkte Atrophie des M. pectoralis major erscheint die Brust auffällig abgeflacht. Da der M. levator scapulae von den dystrophischen Vorgängen relativ ausgespart wird, kommt es bei Armabduktion häufig zu einer typischen Elevation der Scapula. Diese wird besonders bei der Inspektion des Patienten in der Frontalebene deutlich.

Obwohl die dystrophischen Prozesse oft asymmetrisch beginnen, manifestieren sie sich immer beidseitig. Die Muskulatur des Beckengürtels ist in späteren Stadien fast immer mitbetroffen. Auch eine Mitbeteiligung der Dorsalextensoren des Fußes, der Unterarm- und der Handmuskulatur ist beschrieben worden. Im Verlauf der Krankheit bleiben zunächst Bizeps- und Trizepssehnenreflex, später auch der Bauchdeckenreflex und die Reflexe der unteren Extremität aus. Durch Hypertrophie des M. oris kommt es häufig zum sogenannten „Tapirmund“ oder „Schmollmund“. Manchmal kommt es auch zu einer Hypertrophie der Mm. deltoideus, quadrizeps oder pectoralis, selten jedoch zu einer Hypertrophie anderer Muskeln. Haltungsschäden speziell an der Wirbelsäule entstehen als Folge dieses muskulären Umbaus recht häufig (Zierz et al., 1999).

Einige Symptome, die nicht direkt mit muskulären Vorgängen zusammenhängen, werden trotzdem mit der FSHD in Verbindung gebracht. So werden Veränderungen des Kapillarsystems der Retina, wie Teleangiektasen und Mikroaneurysmen

(Fitzimons et al., 1987) sowie Netzhautablösungen und Flüssigkeitsexsudationen im Auge mit der FSHD assoziiert. Auch eine Veränderung des Hörvermögens mit Innenohrschwerhörigkeit und Hochttonabfall wird diskutiert (Brouwer et al., 1991). Von Yasukohchi et al., (1988) werden restriktive Ventilationsstörungen und ein cor pulmonale bei einem 13-jährigen an FSHD erkrankten Jungen beschrieben. Auch Reizleitungsstörungen und eine erhöhte Neigung zu Vorhofflimmern und Vorhofflattern sind im Zusammenhang mit einer FSHD bekannt (Stevenson et al., 1990). Über die Ätiologien der Komplikationen ist nichts bekannt. Für die Retinaveränderungen werden eine Koppelung der Gene oder Genheterogenität diskutiert (Takeya et al., 1990). Die Intelligenz der Betroffenen ist normal. Insgesamt handelt es sich bei der fazioscapulohumeralen Muskeldystrophie um eine oligosystemische Erscheinungsform.

Die Lokalisation der atrophen und hypertrophen Muskelregionen, das Vorliegen oben genannter assoziierter Symptome sowie der Verlauf der Erkrankung, kann selbst innerhalb einer erkrankten Familie sehr stark variieren. In der Regel verläuft die Krankheit langsam progredient mit einer nahezu normalen Lebenserwartung für die Patienten. Circa 20 % der Betroffenen werden rollstuhlpflichtig (Padberg et al., 1982). In seltenen Fällen gibt es einen rascheren Verlauf, der zur Gehunfähigkeit zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr führt. In solchen Fällen ist auch ein früherer Tod aufgrund einer respiratorischer Insuffizienz möglich. Bei sehr frühem Manifestationsalter, in den ersten beiden Lebensjahren, muss mit einem sehr stark fortschreitenden Verlauf gerechnet werden, der zum Tod noch im Jugendalter führen kann (Bailey et al., 1986).

Die Diagnose stellt sich anhand des klinischen Bildes, des Krankheitsverlaufs und des Nachweises eines autosomal-dominanten Erbgangs innerhalb der betroffenen Familie. Zusätzlich kann eine EMG-Untersuchung und eine Biopsie der betroffenen Muskeln hilfreich sein. Im EMG zeigen sich myopathische Merkmale. Histologisch finden sich atrophe Muskelfasern zwischen stark hypertrophierten Muskelfasern und

entzündliche Zellreaktionen (Mortier et al., 1994). Die Serumspiegel der Creatinkinase sind in der Regel nur auf das 1,5 bis 2-fache der Norm erhöht (Sayli et al., 1984) und daher nur bedingt aussagekräftig. Jedoch bietet sich hier eine Mitbestimmung der Pyruvatkinase an, da ihr Serumspiegel auch bei normalen Werten der Creatinkinase erhöht ist (Mortier et al., 1994).

1.2.2. Genetik und Pathophysiologie

Gesichert wird die Diagnose FSHD durch eine molekulargenetische Untersuchung. Dieser Test ermöglicht es auch präsymptomatisch oder ohne bekannten Stammbaum eine Diagnose zu stellen. Der genetische Defekt der Erkrankung liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (Wijmenga et al., 1990, 1991). Wijmenga beschreibt eine polymorphe Repeatsequenz mit der Größe von 3,3 kb in der telomeren Region von Chromosom 4q35. Die Zahl der Repeateinheiten variiert in der Bevölkerung zwischen 10 und 100. Bei von der FSHD betroffenen Personen liegen aufgrund von Deletionen nur bis zu 10 Wiederholungen vor. Für die Repeatsequenz in der Region 4q35 konnte noch kein transkribiertes Gen gefunden werden, das für die Erkrankung verantwortlich gemacht werden kann. Jedoch vermutet Bengtsson et al. (1994), dass das für die FSHD entscheidende Gen in direkter Nachbarschaft proximal des Repeatblocks liegt und ein Positionseffekt wahrscheinlich für die FSHD ursächlich ist. Durch diesen Positionseffekt der veränderten Repeatsequenz wird das noch unbekannte, für die FSHD verantwortliche Gen regulativ beeinflusst (Rieß et al., 1998).

1.2.3. Diagnostik

Zum Nachweis wird die Patientenprobe mit Eco RI gespalten. Bei der Hybridisierung des Southern-Blotts mit der DNA-Sonde p13E-11 zeigen sich bei Erkrankten Eco RI-Fragmente, die kürzer als 35 kb sind. Gesunde hingegen haben

ein Fragment von 48 bis 300 kb Größe. Fragmentgrößen zwischen 35 und 48 kb müssen mit Vorsicht interpretiert werden (Vitelli et al., 1999). Problem bei der Diagnostik ist, dass die Sonde durch Kreuzhybridisierung mit einem Abschnitt auf Chromosom 10q26 reagiert und somit eine genaue Auswertung erschwert. Die Repeatsequenz auf Chromosom 10 besitzt jedoch eine Schnittstelle für Bln I und kann somit durch einen Doppelverdau mit beiden Enzymen gespalten werden. Die Spezifität der Untersuchung beträgt dann circa 95 %, da es zu einem subtelomeralen Austausch zwischen Chromosom 4 und 10 kommen kann (van Deutekom et al., 1996). Durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym Xpa I, das spezifisch für Chromosom 4 ist, kann die Zuverlässigkeit des Tests auf ca. 99 % erhöht werden (unveröffentlichte Ergebnisse, 2001).

1.3. Gliedergürtelmuskeldystrophien (limb girdle muscular dystrophy, LGMD)

1.3.1. Epidemiologie und Klinik

Die Gruppe der Gliedergürtelmuskeldystrophien teilt sich nach ihrem Erbgang ein. Die Mehrzahl hat, wie von Becker 1940 beschrieben, einen autosomal-rezessiven Erbgang. Diese Formen haben in etwa eine Prävalenz von 1 : 20 000 (Emery et al., 1991). Einige wenige Formen werden autosomal-dominant vererbt.

In ihrer Klinik verlaufen die Erkrankungen sehr ähnlich zu den X-Chromosomal vererbten Muskeldystrophien vom Typ Duchenne (DMD) und Becker (BMD). Schwere Krankheitsverläufe ähneln in ihrem klinischen Bild eher der DMD, weniger progrediente Verläufe sind mit der BMD verwechselbar.

Manifestationszeitraum ist vom Jugendalter bis hin zum Erwachsenenalter. Die dominant vererbten Formen haben in der Regel eine schwächere Symptomatik, die auch erst in der dritten Dekade klinisch auffällig werden kann.

Die Patienten leiden unter einer progressiven proximalen Muskelschwäche (Kress et al., 1998). Diese beginnt meist im Becken- oder Schultergürtel. Skoliosen, Kontrakturen, Osteoporose und eine Pseudohypertrophie der Wade entwickelt sich je nach Ausprägung. Die Reflexe können sich im Laufe der Erkrankung durch Veränderungen der Muskelspindeln abschwächen oder ganz fehlen. Häufig ist auch der Herzmuskel von den dystrophen Vorgängen betroffen. Fadic et al. (1996) beschreibt einen 13-jährigen Jungen mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Die Serumspiegel der Creatinkinase können sich bis auf das 200 fache der Norm erhöhen. Das EMG zeigt Merkmale im Sinne einer Myopathie. In der Biopsie des Muskels können dystrophe oder unspezifisch myopathische Gewebeveränderungen dargestellt werden. Entscheidend verändert wird das histologische Bild im Endstadium durch Fettzelleinlagerungen und Fibrosierungen (Mortier et al., 1994).

1.3.2. Genetik und Pathophysiologie

Pathophysiologisch sind Genmutationen in einem für Membran assoziierte Proteine codierendem Gen ursächlich für die Erkrankungen. Bei den Dystrophino-, Sarkoglykano und α 2-Laminopathien sind die Gene weitgehend bekannt. Durch diesen Gendefekt wird ein Mangel oder das Fehlen des betroffenen Proteins verursacht.

Die Aufgabe dieser Proteine ist es, das Zytoskelett mit der Basalmembran fest zu verbinden (siehe Abb. 1) und sie vor Schädigungen bei der Muskelkontraktion zu schützen. Zu diesem Zweck bindet das Aktinfilament des Zytoskeletts an dem N-terminalen Ende des Dystrophins. Das Dystrophin wiederum bindet am β -Dystroglycan, einem transmembranalen Protein, das einen Teil des Dystrophinglycoproteinkomplexes (DGK) darstellt. Zu diesem DGK gehören des weiteren das α -Dystroglycan, die α -, β -, γ -, δ -Sarkoglykane sowie die α -, β 1-, β 2-Syntrophine, die funktionell an der Stabilität des Sarkolemms beteiligt sind. Das oben erwähnte β -Dystroglycan bindet an dem α -Dystroglycan das die Verbindung zur

Basalmembran herstellt. Der DGK wiederholt sich periodisch alle 130 nm entlang des Sarkolemms (Campbell et al., 1995; Ohlendieck et al., 1996; Ozawa et al., 1995; Vainzof et al.; 1996).

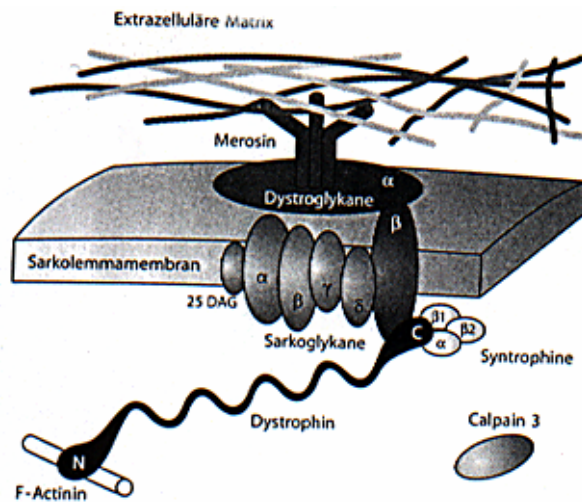


Abb. 1: Molekulare Struktur der Muskelzellmembran

Bis auf das δ -Sarkoglykan weisen alle Sarkoglykane in ihrer extrazellulären Domäne cysteinhaltige Wiederholungen auf. Diese sind homolog zu dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors beziehungsweise zum LDL-Rezeptor. Es wird deswegen ein möglicher Einfluss auf die Homöostase, die Wachstumsregulation und auf die intrazelluläre Signalübertragung der Muskelzelle vermutet. Da bei einem Defekt in einem Sarkoglykan-Gen der komplette Sarkoglykankomplex durch Mangel oder Fehlen von Strukturproteinen betroffen ist, werden die einzelnen Sarkoglykane als funktionelle Einheit betrachtet. McNally (1995) hat in einer Untersuchung festgestellt, dass die mRNA für Adhelin in der Herzmuskulatur kürzer als die in der Skelettmuskulatur ist. Er vermutet einen Zusammenhang zwischen der verkürzten mRNA und den minder schweren dystrophen Vorgängen an der Herzmuskulatur im Vergleich zur Skelettmuskulatur.

1.3.3. Diagnostik

In der molekulargenetischen Routinediagnostik ist der Nachweis der ursächlichen Punktmutation sehr aufwendig (die Genorte mit ihren Produkten sind in der Tabelle 1 zusammengefasst). Es ist daher sinnvoller, durch einen Adhalinantikörper (α -Sarkoglykan) den Mangel oder das Fehlen von Adhalin in der Muskelbiopsie nachzuweisen. Bei einem Mangel an einem Protein kommt es fast immer zur Reduktion der anderen am Sarkoglykankomplex beteiligten Proteine. Auch bei einem Mangel an Dystrophin können die anderen Proteine des DGK reduziert vorliegen (Amalfitano et al., 1997; Brown et al., 1997; Watkins et al., 1997; Winders et al., 1997).

Formen	Genort	Genprodukt	Erb- gang	Manife- station.	Symptome (Besonderheiten)
LGMD 1A	5q22.3- 31.3	Myotilin	AD	18-35 Jahre	prox. Beinmusk. ist mehrere Jahre vor prox. Armmusk. betroffen.
LGMD 1B	1q11- 21	Lamin A/C	AD	4-30 Jahre	Hüft- und prox. Oberschenkelmusk., später prox. Armmusk.
LGMD 1C	3p25	Caveolin-3	AD	5 Jahre	Prox. Muskulatur; Muskelkrämpfe
LGMD 1D	6q23	unbekannt	AD		Familiäre dilatative Kardiomyopathie mit Überleitungsstörungen
LGMD 1E	7q	unbekannt	AD		

Formen	Genort	Genprodukt	Erb- gang	Manife- station	Symptome (Besonderheiten)
LGMD 2A	15q15.1- 21.1	Calpain 3	AR	2,5-40 Jahre	Prox. Bein-/Hüftmusk. Oft 2-5 Jahre vor periscap. Musk. betroffen; Rumpfschwäche
LGMD 2B	2p13	unbekannt	AR	13-35 Jahre	prox. Bein-/Hüftmusk, später M. trizeps surae, 2-10 J. danach Schulterm.
LGMD 2C	13q12	γ -Sarkogl.	AR	3-12 Jahre	Becken früher als Schultermusk.
LGMD 2D	17q21.2	α-Sarkogl. (Adhalin)	AR	1-16 Jahre	früh: Duchenne-ähnlich spät: Beckengürtel
LGMD 2E	4q12	β -Sarkogl.	AR	3-12 Jahre	Beckengürtel vor Schultergürtel betroffen;
LGMD 2F	5q33-34	δ -Sarkogl.	AR	2-10 Jahre	Duchenne-ähnlich
LGMD 2G	17q11-12	Thelethonin	AR	9-15 Jahre	Prox. Bein-/Hüftmusk; M. tib ant.; prox Arm-/ Schultermusk.
LGMD 2H	9q31-34.1	unbekannt	AR		
LGMD 2I	19q13.3	unbekannt	AR		

Tab 1: Formen der Gliedergürtel Muskeldystrophie

1.4. myotone Dystrophie Curschmann-Steinert (MD)

1.4.1. Epidemiologie und Klinik

Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich bei der myotonen Dystrophie (MD) um die häufigste degenerative Muskelerkrankung des Erwachsenenalters. Sie wird autosomal-dominant vererbt und wurde bereits 1909 durch Steinert als Myotonica atrophica von der Myotonica congenita abgegrenzt. Curschmann beschrieb dann 1912 als erster, dass die myotone Dystrophie eine Multisystemerkrankung ist, deren Symptomatik über die Muskulatur hinausgeht: Katarakte, Hodenatrophien, Herzrhythmusstörungen und psychische Auffälligkeiten sind häufig. Auf die kongenitalen Fälle der myotonen Dystrophie bei kleinen Kindern wurde 1960 von Vanier hingewiesen. Neben der milden MD (Katarakt MD) und der klassischen adulten Form der MD wird sie als dritte Form der Erkrankung unterschieden.

Die Häufigkeit schwankt zwischen den ethnischen Gruppen sehr stark. Für Nordamerika und Westeuropa liegt die Prävalenz bei 1 : 20 000, bei einer Inzidenz von circa 1 : 7 500 (Harper et al, 1989). Bei der schwarzen Bevölkerung Afrikas liegt sie deutlich darunter. Die Penetranz der Erkrankung ist unter Einbeziehung der milden Variante vollständig. Das Manifestationsalter ist je nach Form der Erkrankung unterschiedlich. Es schwankt von den ersten Lebensmonaten bei der kongenitalen MD bis zum Erwachsenenalter bei den milden Verlaufsformen mit schwächerer Symptomatik. So hat sich bei ca. 14 % derjenigen, von der klassischen Form Betroffenen, die Erkrankung bis zum 16. Lebensjahr manifestiert (Harper et al., 1989).

Die Hauptbeschwerden der myotonen Dystrophie werden von einer progredient verlaufenden Muskelschwäche und einer Muskelatrophie verursacht. Typischerweise zeigen sie eine fazio-zerviko-distale Verteilung, bei der zunächst die Mm. masseter und temporalis von der Atrophie betroffen sind. Im Gesicht erstreckt sich die Symptomatik auch auf die äußere Augenmuskulatur, was zu Ophthalmoparesen führen kann (Schöls et al., 1998). Dysphagien,

Aspirationspneumonien und eine nasale Sprache können durch eine Mitbeteiligung der glosso-pharyngealen Muskulatur entstehen. Unter Einbeziehung des M. sternokleidomastoideus dehnt sich die Muskelschwäche meistens auf den Schultergürtel aus. Die Unterarmmuskulatur, insbesondere der M. brachioradialis, ist ebenfalls betroffen. Am Bein ist vor allem die Funktion der Fuß- und Zehenheber sowie der mediale Teil des M. gastrocnemicus eingeschränkt. In Folge der muskulären Veränderungen können sich ein pes excavatus oder Skoliosen ausbilden. Auch das Zwerchfell und die Interkostalmuskulatur werden durch die dystrophen Vorgänge funktionell eingeschränkt, was unter Umständen eine alveoläre Hypoventilation verursacht. Entsprechend zu der muskulären Verteilung der Symptomatik nehmen auch die Muskeldehnungsreflexe ab.

Das namensgebende Leitsymptom der Erkrankung ist die Myotonie. Sie bezeichnet eine durch Spontanaktivität fortgesetzte Muskelkontraktion. Es wird dabei die Aktionsmyotonie, die nach Beendigung einer willkürlichen Muskelinnervation eintritt, von der Perkussionsmyotonie unterschieden. Dabei kann nach einem mechanischen Druck auf den Muskel eine Myotonie ausgelöst werden. Klinisch wird die Myotonie durch eine verlängerte Erschlaffungsphase des Muskels deutlich. Der Patient kann zum Beispiel nach einem Händedruck die Hand nicht mehr schnell öffnen. Durch wiederholte Kontraktionen der betroffenen Muskeln schwächt sich aufgrund des „warm-up-Effekts“ das Phänomen ab (Mortier et al., 1994).

Wie bereits vorweggenommen, werden mit der myotonen Dystrophie einige typische Symptome assoziiert, die bei einer Vielzahl der Patienten einzeln oder in Kombination vorliegen. Häufig entwickeln die Patienten, infolge endokrinologischer Störungen eine Stirnglatze, die in Verbindung mit dem durch atrophisch Paresen, apathisch scheinenden Gesichtsausdruck, zum typischen Erscheinungsbild beiträgt. Als weitere Folge der hormonellen Störung ist eine mögliche Gynäkomastie oder eine Hodenatrophie bei nur gering eingeschränkter Fruchtbarkeit schon häufiger beschrieben worden. Am Auge entstehen sehr oft Katarakte mit farbigen, staubförmigen (opaleszierenden) Einlagerungen in der subkapsulären Linsenregion

(Damian et al., 1994) sowie Retinadegenerationen und eine meist beidseitige Ptosis. Kardiale Komplikationen wie Bradykardie, Hypotonie, paroxysmales Vorhofflimmern und Überleitungsstörungen kommen bei bis zu 90 % der Patienten vor. Die häufigsten Überleitungsstörungen sind Linksschenkel- und atrioventrikuläre Blockierungen. Deutlich seltener treten dilatative Kardiomyopathien auf (Harper et al., 1989).

Bei etwa 5 % der Betroffenen entwickelt sich ein Diabetes mellitus. Ursächlich dafür scheint ein Insulin-Rezeptor Defekt an der Skelettmuskelmembran, der eine Insulinresistenz zur Folge hat (Savkur et al., 2001). Der Magen-Darm-Trakt ist durch Motilitätsstörungen und Funktionsstörungen der Sphinkteren betroffen. Außerdem neigen die Erkrankten zur Bildung von Gallensteinen. Häufig leiden Kinder unter rezidivierenden abdominellen Schmerzen und Obstipation (Lenard et al., 1977). Bei einem Teil der Patienten ist eine axonale Polyneuropathie nachweisbar. Ein Drittel der Betroffenen zeigt kognitive Defizite, die im MRT mit Hirnvolumenverminderung und fokalen Läsionen der weißen Substanz einhergeht (Damian et al., 1994). Aus psychiatrischer Sicht werden die Patienten durch Stimmungsschwankungen und Antriebsarmut auffällig. Ihr mittlerer IQ liegt bei ca. 80.

Bei der **milden MD** mit oligosymptomatischer Verlaufsform, kann sich als einziges klinisches Merkmal nur eine Katarakt entwickeln. Es entstehen zunächst punktförmige Trübungen in irisnahen Bereichen. Diese breiten sich speichenartig, aber unter Aussparung des Linsenzentrums, bis zur reifen Katarakt aus. Äthiologisch ist diese von Katarakten anderer Genese nicht zu unterscheiden (Schöls et al., 1998). Die Myotonie lässt sich bei manchen Patienten mit der milden Variante nur im EMG nachweisen.

Die **kongenitale Form der MD** fällt schon während der Schwangerschaft wegen der abgeschwächten Kinderbewegung und des Polyhydramnion auf. Die Frühabortrate liegt über der Norm. Nach der Geburt ist das Trinken und Schlucken gestört. Häufig sind die Kinder postnatal hypoton („floppy infant“) und haben eine

eingeschränkte Atmung (Harper et al., 1989), was zu einer Mortalitätsrate von circa 25 % in den ersten 18 Lebensmonaten führt. Die Myotonie kann in den ersten Lebensjahren zum Teil ganz fehlen. Charakteristisch ist ein dreiecksförmiger Mund aufgrund der Gesichtsmuskelschwäche. Häufig haben die Patienten congenitale Klumpfüße. Die motorische Entwicklung ist unverkennbar verlangsamt. Später entstehen ausgeprägte Behinderungen und Begabungsmängel, die deutlich stärker sind als bei der klassischen Form der MD.

Die Histologie der Muskelbiopsie zeigt beim Säugling mit kongenitaler MD starke Reifungsverzögerungen der Muskelfasern. Diese Veränderungen können aber bei noch ganz kleinen Kindern, bis zu 12 Monaten, fehlen. Beim Erwachsenen finden sich vermehrt zentrale Kerne, Kernreihen, Ringbinden, intrafusale Fasern und eine Typ-1-Muskelfaseratrophie (Mortier et al., 1994). Im EMG stellt sich die Myotonie durch repetitive, spontane Aktionspotentiale in Folge eines willkürlich ausgelösten Potenzials dar (siehe Abb. 2). Die Potenziale zeigen bei der MD eine niedrige Frequenz (- 60 Hz) mit wenig Schwankungen.

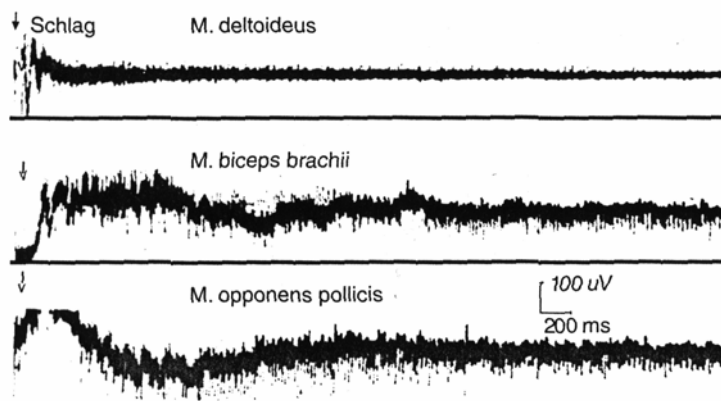


Abb. 2: Hochfrequente myotone Potentiale, nach Perkussion verschiedener Muskeln

1.4.2. Genetik und Pathophysiologie

Da die Ergebnisse der Biopsie und des EMG nur Hinweise auf die Diagnose liefern und das klinische Bild der Erkrankung sehr variabel ist, wird die Diagnose mit Hilfe einer Gen-Analyse gesichert.

Die Lokalisation der myotonen Dystrophie wurde von Smeets, Davies, Roses und Brunner 1989 auf dem langen Arm von Chromosom 19 gefunden. Von Harley (1991) wurde der Gen-Locus auf die Region 19q13.2-q13.3 eingegrenzt. Ursächlich für die myotone Dystrophie ist eine verlängerte und instabile CTG-Repeat (Cytosin-Tymin-Guanin) Sequenz am 3'-Ende einer nicht transkribierten Region des DMPK-Gens (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992).

Dieses Gen codiert für ein Protein mit starken Ähnlichkeiten zu einer Proteinkinase. Es besteht aus 624 Aminosäuren und wird als Dystrophia myotonica-Proteinkinase (DMPK) bezeichnet (Buxton et al., 1992). Normalerweise hat das Repeat eine Größe von ca. 5 – 37 CTG-Repeats (Boucher et al., 1995), wobei in etwa 90 % der Gesunden eine Größe von unter 19 CTG-Repeats haben. Betroffene tragen Allele einer Größe von 50 bis mehr als 2000 Repeats (Harley et al., 1992). Auch wenn bei der myotonen Dystrophie, wie in Abbildung 3 ersichtlich, die Repeatzahl mit dem Phänotypen eng korreliert, sind Aussagen über Manifestationszeitpunkt und Krankheitsverlauf nur sehr schwer zu treffen. Insbesondere die assoziierten Symptome wie Stirnglatze, kardiale Komplikationen und Mitbeteiligung der glatten Muskulatur ist nicht primär von der Repeatlänge abhängig. Diese Symptome scheinen eher familiär gehäuft aufzutreten (Brunner et al., 1992).

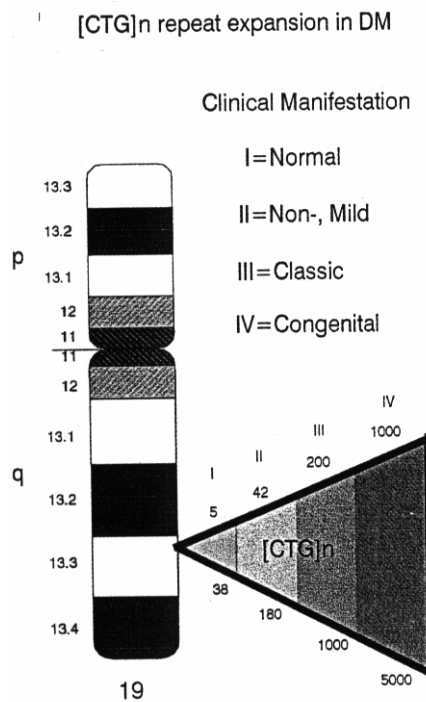


Abb. 3: Korrelation der Repeat-Länge mit dem Schweregrad der klinischen Manifestation

Aufgrund somatischer Instabilität schwankt die Repeatzahl zwischen den einzelnen Geweben (Thornton et al., 1994) und vergrößert sich im Laufe des Lebens. Die Größenveränderung bei Vererbung des Repeats ist sowohl vom Geschlecht des Trägers als auch von der bestehenden Repeat-Länge abhängig. So werden CTG-Expansionen von bis zu 150 Einheiten von väterlicher und mütterlicher Seite mit der ähnlichen Vergrößerung vererbt. Bei mehr als 150 Repeateinheiten wird meist nur noch von mütterlicher Seite aus ein vergrößertes Allel vererbt, während vom Vater oft auch ein verkleinertes Allel weitergegeben wird. Auf diese Weise nimmt bei mütterlicher Vererbung die Repeatgröße von Generation zu Generation stetig zu (Levedan et al., 1993). Das scheint auch die Ursache dafür zu sein, dass die kongenitale MD, mit sehr großen Repeat-Expansionen, fast immer von mütterlicher Seite aus vererbt wird. Die Krankheit zeigt Antizipation, das heißt sie manifestiert sich in betroffenen Familien von Generation zu Generation in einem früheren

Lebensalter (Ashizawa et al., 1994). Auch nacheinander geborene Kinder einer erkrankten Mutter sind unterschiedlich stark betroffen, wobei die jüngeren in der Regel den schwereren Krankheitsverlauf haben (Andrews und Wilson 1992, Koch et al., 1991).

Bezüglich des Erbgangs scheint es sich bei der myotonen Dystrophie eindeutig um eine dominante Genmutation zu handeln, da der Krankheitsverlauf von homozygoten Allelträgern nicht schwerer ist als der von heterozygoten (Cobo et al., 1993; Martorell et al., 1996).

Der genaue pathogenetische Zusammenhang zwischen der CTG-Repeatexpansion und den muskulären Veränderungen bei der myotonen Dystrophie ist noch unklar. Bisher wurde bei Patienten mit myotoner Dystrophie ein reduzierter mRNA Gehalt und eine verminderte Proteinsynthese („loss of function“) für das DMPK-Gen im Skelett- und Herzmuskel gefunden (van der Ven et al., 1993). Die Ursache dafür scheint eine Ansammlung von CUG-mRNA im Kern zu sein, deren Export aufgrund von Wechselwirkungen mit anderen CUG-haltigen mRNAs noch weiter erschwert wird. Aufgrund der mangelhaften Expression der DMPK könnte es zu Störungen der Phosphorylierung von Ionenkanälen und von Signaltransduktionswegen kommen. Es sind jedoch auch schon erhöhte Werte für die mRNA des DMPK-Gens in Kindern mit der kongenitalen Form gefunden worden.

Da die Studien über eine Veränderung der DMPK-Expression sehr unterschiedlich in ihrer Aussage sind, und sich nicht alle Symptome durch eine Störung in der DMPK-Expression erklären lassen, werden mehrere Hypothesen über die Pathomechanismen der Myotonen Dystrophie und die Beeinflussung der Transkription benachbarter Gene (DMAHP, DMR-N9; siehe unten) diskutiert.

Tierversuche lieferten den Hinweis, dass eine regulative Beeinflussung des DMAHP-Gens der mögliche Auslöser der Katarakt sein könnte. Dem am anderen

Ende des DMPK-Gens gelegenen DMR-N9-Gen, wird eine Bedeutung bei der Pathogenese der assoziierten Infertilität beigemessen.

Zusammengefasst sind die aktuellen Theorien in (Abb. 4):

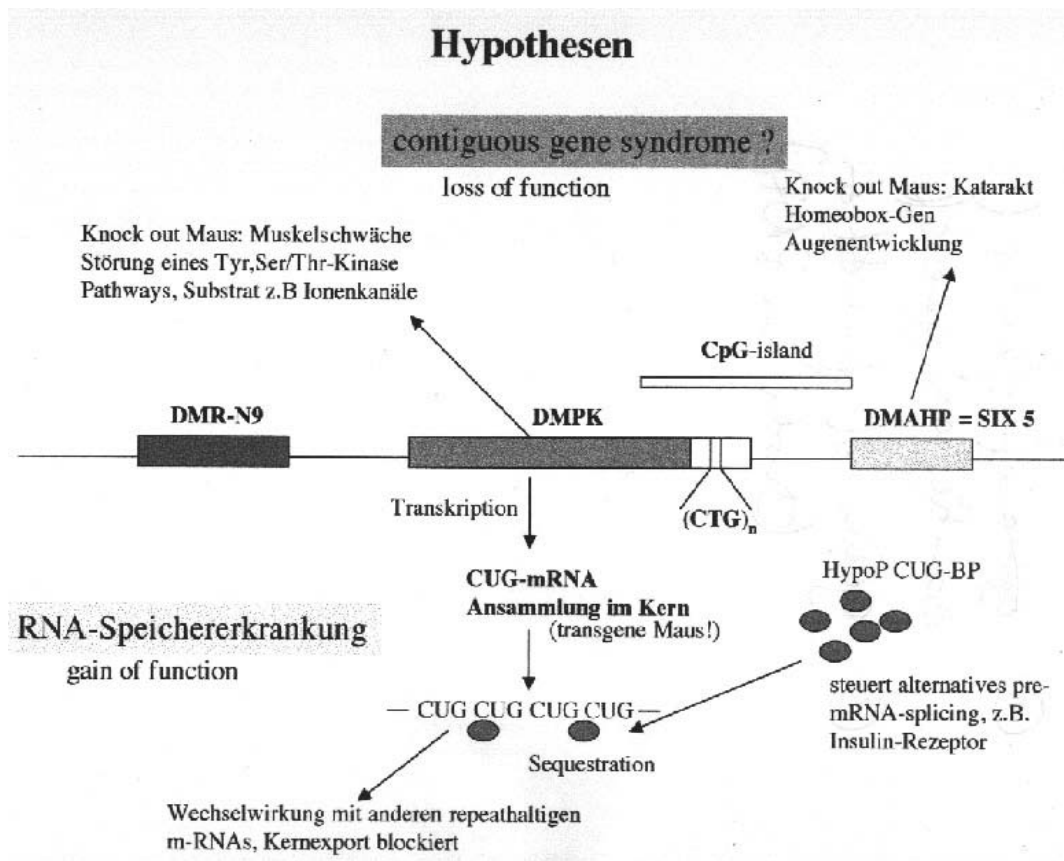


Abb. 4: Hypothesen der molekularen Störungen bei myotoner Dystrophie

1.4.3. Diagnostik

Nachweisen lässt sich die Repeat-Expansion in einer Eco RI bzw. Bgl II gespaltenen Patienten-DNA, die nach elektrophoretischer Auftrennung und Southern-Blott mit der DNA-Sonde p5B 1.4. hybridisiert wird. Das vergrößerte Eco RI Fragment wird durch radioaktive Markierung mit anschließender Darstellung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

1.5. tabellarisch Darstellung der Erkrankungen

	Fazioscapulo-humerale Muskeldystrophie	Gliedergürtel Muskeldystrophien	myotone Dystrophie
genetische Grundlage	Eco RI-Fragment < 35kb aus Reg. 4q35	Mutation in einem Strukturproteingen	CTG-Repeat-Expansion in Reg. 19q13.2-q13.3
Manifest.-Alter	meist bis zur 2. Dekade	Jugend-, bis Erwachsenenalter	wenige Monate bei der congenitalen MD, bis Erwachsenenalter bei milden Formen
primäre Lokalisation	Gesichtsmuskulatur, Schultergürtel	Schulter-, und/oder Beckengürtel Muskulatur	Gesichtsmusk. bes.: M. orbic. oculi, Pharyngealmusk., distale Gliedergürtelmusk.
Verlauf	Fuß-Extensoren, Oberarmmuskulatur, evtl. abdominelle Muskulatur; oft asymmetrische Verteilung der Symptome	unterschiedlich schnelle Progredienz in der betr. Muskulatur, auch mit asymmetrischer Verteilung der Symptomatik	Progredienz der Erkrankung unter Ausdehnung der Symptomatik auf die Atemmuskulatur, Myotonie
Muskel-Biopsie, Labor (CK)	Faserhypertrophie mit eingestreut stark atrophischen, angulären Fasern; Mottenfraß-Fasern; entzündliche perivaskuläre Infiltrate; keine bis leichte Erhöhung der CK	dystrophe oder unspezifisch myopathische Muskelfaserveränderungen; CK bis zum 200-fachen der Norm erhöht;	bei kongenitaler MD: starke Reifungsverzögerungen der Muskelfasern; beim Erwachsenen: vermehrt zentrale Kerne, Kernreihen, Ringbinden, intrafusale Fasern und eine Typ-1-Muskelfaseratrophie; CK normal bis 10-fach erhöht;

EMG	Myopathische Veränderungen; mögl. hochfrequente „pseudomyotone“ Entladungen	Das EMG zeigt Merkmale im Sinne einer Myopathie	Myotone Entladungen mit geringer Frequenz (-60 Hz); myopathische Potentiale in paretischen Muskeln
assozierte Symptome	Hörverlust, Retinadegeneration, geistige Retardierung; kardiale Komplikationen sehr selten aber beschrieben	kardiale Komplikationen	Katarakt, Überleitungsstörungen, Stirnplatte, Hodenatrophie, Insulinresistenz, ZNS-Beteiligung, GIT-Motilitätsstörungen, Megacolon;

Tab. 2: Gegenüberstellung von FSHD, LGMD, MD

2. Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit wird überprüft, inwieweit bei einer Patientengruppe, die molekulargenetisch negativ auf fazioscapulothumerale Muskeldystrophie untersucht wurde, differentialdiagnostisch eine myotone Dystrophie in Frage kommt.

Der zweite Abschnitt hat zum Ziel, zu kontrollieren, ob im Patientenkollektiv derer, die negativ auf eine häufige Mutation im α -Sarkoglycogen (Adhalingen) getestet wurden, differentialdiagnostisch eine fazioscapulothumerale Muskeldystrophie in Betracht zu ziehen ist.

Klinisch zeigten die Patienten eine deutliche Überlappung der Symptomatik.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Zentrifugen	Haereus Sepatech Biofuge 15 Haereus Sepatech Minifuge RF Hettich Universal Zentrifuge Hettich EBA 12 Kontron Instruments Centrikon T-324
Mikrowelle	Fa. Siemens
Rocker	GFL 3013
Vortexer	GLW L46
Röntgenfilmentwickler	Protec Compact 35
Photometer	Pharmacia Biotech
Netzgerät	Voltcraft DC power supply Consort E 431
Gelbecken für Probegele für Hauptgele	Life Technologies Horizon 11.14 Life Technologies Horizon 20.25
Waage	Mettler PE 3600
Pipetten	Eppendorf References
Geigerzähler	Berthold LB 122
Heizofen	Fa. Bachofer
Heizblock	Fa. Liebisch
Wasserbad	WTE var. 3185

3.1.2. Pufferlösungen

Lysispuffer	NH ₄ Cl	155 mM	8,29 g	
	KHCO ₃	10 mM	1,00 g	
	Na ₂ EDTA	25 mM	0,034 g	auf 1 l a. d.

SE-Puffer (pH = 8)	NaCl	75 mM	4,39 g	
	Na ₂ EDTA	25 mM	8,41 g	auf 1 l a. d.

TE-Puffer (pH = 8)	Tris/HCl	10 mM	1,21 g	
	EDTA	1 mM	0,34 g	auf 1 l a. d.

50 x TAE -Puffer (pH = 8)	Tris-Puffer		242,00 g	
	Essigsäure		57,10 ml	
	0,5 M EDTA		100,00 ml	auf 1 l a. d.

10 x TBE-Puffer (pH=8,5)	Tris-Puffer		242,00 g	
	Borsäure		61,84 g	
	Na ₂ EDTA		7,44 g	auf 1 l a. d.

20 x SSC (pH = 7 mit HCl)	NaCl		175,30 g	
	NaCitrat x 2 H ₂ O		88,20 g	auf 1 l a. d.

Lösung 1	32% HCl		120,00 ml	auf 5 l a. d.
----------	---------	--	-----------	---------------

Lösung 2	NaCl		438,20 g	
	NaOH		100,00 g	auf 5 l a. d.

Stop-Puffer	EDTA	1,85 g
	Saccharose	25,00 g
	Bromphenolblau	0,05 g auf 50 ml.

Church-Puffer (pH =7,2 mit H ₃ PO ₄)	20 % SDS	175,00 ml
	1 M Na ₂ HPO ₄	250,00 ml
	EDTA	0,186 g auf 0,5l a.d.

Strip-Puffer	20 x SSC	5,00 ml
	20% SDS	25,00 ml auf 1 l a. d.

Waschlösungen 1	20 x SSC	50,00 ml
	20 % SDS	2,50 ml
2	20 SSC	12,50 ml
	20% SDS	2,50 ml
3	20 SSC	2,50 ml
	20% SDS	2,50 ml
		auf 500 ml a. d.

LB-Medium (pH=7,5 mit 1M NaOH)	Tryptone	10 g
	Hefe Extrakt	5 g
	NaCl	10 g

3.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

SDS	Fa. Amersham Life Science
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH
0,1 M Spermidin	Fa. Sigma
Proteinase K (500 mg in 50 ml a. d.)	Fa. Merck
Agarose	Fa. Biozym
Sephadex G – 50 (10 g in 100 ml TE-Puffer)	Amersham Pharmacia Biotech
λ -DNA	Fa. Boehringer Mannheim
radioaktives Nuklid <i>[α-P 32]d CTP 10 MBq / 27 μl</i>	Fa. Hartmann Analytik
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Fa. Roth
Restriktionsenzym <i>Eco RI 20000 U / ml</i>	Fa. Biolabs
Restriktionsenzym <i>Bln I 10000 U / ml</i>	Fa. Takara
Enzym-Pufferlösung	Fa. Takara
Restriktionsenzym <i>Pst I 20000 U / ml</i>	Fa. Biolabs
Restriktionsenzym <i>Sac I 20000 U / ml</i>	Fa. Biolabs
Enzympuffer <i>Sac I</i>	Fa. Biolabs
100 bp DNA-Ladder	Fa. Gibco BRL
low DNA mass-ladder	Fa. Gibco BRL
Präparationskit zur Sondenherstellung	Fa Qiagen (Qiagen Plasmid Kit midi)
Nylonmembran zum Blotten	Fa. Amersham,Hybond N+
Röntgenfilme	Fotochemische Werke GmbH, x-Ray Retina
1 ml Spritzen	Fa Braun Melsungen, Omnifix-F 1 ml

Oligolabeling-Kit	Fa. Amersham
Filtercap	Millipore Ultrafree-MC Filter Unit
Glaswolle	
500 ml Hybridisierungskolben	

3.2. Methoden

3.2.1. Übersicht über die Methodik

Um die im Falle einer FSHD vorliegende Deletion auf Chromosom 4q35 und die im Rahmen einer myotonen Dystrophie vorhandene CTG-Repeatexpansion auf Chromosom 19q nachzuweisen, müssen die entsprechenden DNA-Fragmente auf ihre Größe untersucht werden. Dazu wird als Untersuchungsmaterial 10 ml Vollblut verwendet. Daraus wird die DNA isoliert und mit Hilfe spezifischer Restriktionsenzyme in Fragmente zerschnitten. Die gespaltene DNA wird anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Southern auf eine Nylonmembran geblottet. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird der Filter mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Nachdem überschüssige Aktivität durch Waschen entfernt wurde, wird der Filter auf einen Röntgenfilm aufgelegt, auf dem nach zwei Tagen das Ergebnis ablesbar ist.

3.2.2. DNA-Extraktion aus Vollblut

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung werden 10 ml Vollblut verwendet, das aufgrund des zugeführten Citrats oder EDTA nicht koaguliert hat. Zunächst werden die Erythrozyten von den kernhaltigen Lymphozyten getrennt. Dazu wird die Probe mit ca. 30 ml gekühlten Lysis-Puffer versetzt und unter mehrmaligem Wenden 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wird das Falcon-Röhrchen bei 4 °C und 2000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Am Boden des Röhrchens setzt sich ein Lymphozyten-Pellet ab. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wird

abgegossen und die Reste auf ein Tuch abgetropft. Zum Pellet wird nun erneut Lysis-Puffer gegeben und unter oben genannten Bedingungen nochmals zentrifugiert. Das so gereinigte Pellet wird mit 5 ml SE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konz: 500 mg in 50 ml a. d.) und 250 µl 20 % SDS gut gemischt über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Lymphozytensuspension werden nun 2,5 ml SE-Puffer und 2,1 ml gesättigte NaCl-Lsg. zugegeben und kräftig gevortext. Um ausgefallene Salze zu lösen wird die Suspension 10 min bei 55 °C inkubiert und im Anschluss bei Raumtemperatur und 4000 U/min für 15 min zentrifugiert. Die gereinigte DNA befindet sich im Überstand und wird in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Durch Zugabe des doppelten Volumens 100 % Ethanol und Schwenken des Röhrchens fällt die DNA als Flocke makroskopisch sichtbar aus. Dieser DNA-Faden wird mit einer gläsernen Einmalpipette, deren Spitze im Bunsenbrenner zu einem Haken gebogen wurde aus der Lösung gefischt und kurz in 70 % Ethanol getaucht. Je nach Größe der Flocke wird die DNA in 100 – 1000 µl TE-Puffer über Nacht gelöst.

3.2.3. DNA-Restriktionsverdau

Vor der Spaltung muss die Konzentration der DNA-Probe photometrisch ermittelt werden um die Menge des benötigten Restriktionsenzym abschätzen zu können. Ideal sind Konzentrationen um 500 µg / ml DNA. Ermittelt wird die Konzentration über die Extinktion am Absorptionsmaximum, das bei Nukleinsäuren bei 260 nm liegt, wobei eine Extinktion von 1,00 einer DNA-Konzentration von 45-50 µg DNA/ ml Lösung entspricht (Lange und Wöhrmann 1979).

Die Spaltung erfolgt mittels spezifischer Restriktionsenzyme, wobei man zur Diagnostik einer myotonen Dystrophie die DNA mit dem Enzym *Eco RI* spaltet. Zum Nachweis einer FSHD benötigt man sowohl einen Doppelverdau mit *Eco RI* und *Bln I* als auch den Verdau mit *Bln I*.

Ansatz der Spaltung :

Aqua dest.	zum Gesamtvolumen von 60 μ l auffüllen
10 x Enzympuffer	6 μ l
Spermidin	2 μ l
DNA	10 μ g
Enzym	50 U / 10 μ g DNA

Als Enzympuffer wird im Doppelverdau der zum Enzym Bln I gehörige Puffer verwendet. Den Ansatz gut mischen und kurz abzentrifugieren. Im Anschluss wird er mindestens 3 Stunden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Um zu bestimmen ob der Ansatz gut durchgespalten ist, wird ein kleiner Anteil der Probe elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wird ein 0,7 %iges Agarosegel mit der Biozym Agarose, einen Tropfen Ethidiumbromid und 100 ml 1 x TAE-Puffer in einen kleinen Gelschlitten gegossen. 3 μ l der gespaltenen DNA werden mit 1 μ l Stop-Puffer und 6 μ l aqua dest auf einer Mikrotiterplatte versetzt. Dieser Ansatz wird auf dem Gel aufgetragen und bei 90 – 100 V etwa 30 min aufgetrennt. Als Laufpuffer zur Gelelektrophorese wird 1 x TAE verwendet. Die Vollständigkeit der Spaltung wird auf einem UV-Schirm kontrolliert (siehe Abb. 5) und gegebenenfalls mit 1-3 μ l Restriktionsenzym und anschließender Inkubation unter obigen Bedingungen fortgeführt. Dieser Schritt muss so lange wiederholt werden, bis die DNA gleichmäßig verdaut ist.

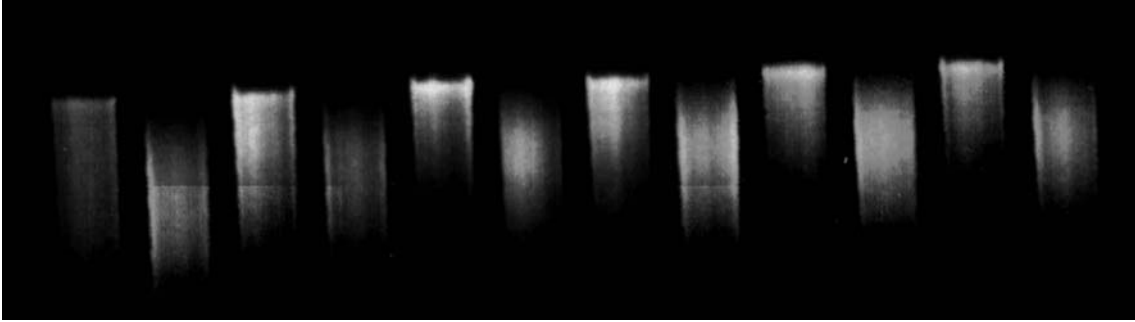


Abb. 5: Probegel unter UV-Schirm; Doppelverdau der DNA mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Bln I*

3.2.4. Horizontalgelelektrophorese und Southern-Blott

Als Gel für die Elektrophorese wird ein 0,7%iges Agarosegel mit Biozym DNA Agarose hergestellt. Zur Diagnostik der FSHD werden 500 ml 1x TAE-Puffer und ein Kamm mit einer Zinkenbreite von 8 mm verwendet. Bei der myotonen Dystrophie nimmt man 400 ml 1 x TAE-Puffer und einen Kamm mit 6 mm Zinkenbreite. Der 1 x TAE-Puffer wird ebenso als Laufpuffer verwendet, der täglich gewechselt werden muss. Es muss darauf geachtet werden, dass das Gel nicht zu heiß und blasenfrei in den Gelschlitten (20 x 25 cm) gegossen wird.

Zu jedem Ansatz mit gespaltenen DNA werden 6 µl Stop-Puffer pipettiert und anschließend in die Taschen des ausgehärteten Gels gegeben. Die Zinkenbreite des Kamms beträgt für den Nachweis der FSHD 8 mm, für die MD 6 mm. Zum Schluss 30 µl *Hind III* gesplattene λ-DNA als Größenmarker auftragen und die Spannung anlegen. Um das Gel nicht zu überhitzen, wählt man eine Spannung von 30 – 40 V, die bei der FSHD 3 Tage bei der MD 2 Tage angelegt wird. Nach Beendigung der Laufzeit wird das Gel in einer Wanne mit 2 Tropfen Ethidiumbromid und 1 x TAE-Puffer für 15 min auf dem Rocker gefärbt. Das gefärbte Gel kann jetzt auf dem UV-Schirm überprüft (siehe Abb. 6), fotografiert und zum Blotten passend zurechtgeschnitten werden.

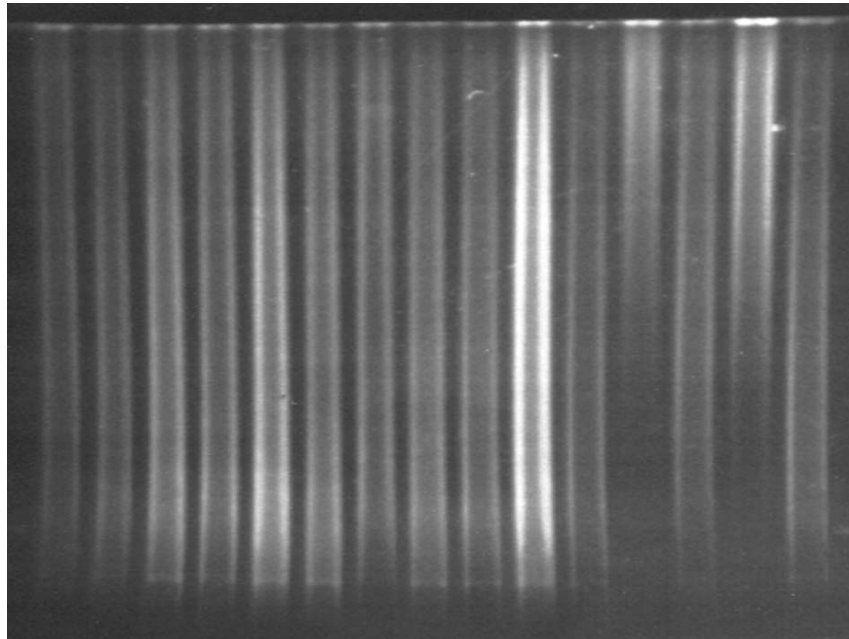


Abb. 6: Hauptgel zur Kontrolle auf dem UV-Schirm, vor dem Southern-Blott

Vor dem Blotten wird das Gel in Lösung 1 für 10 min auf dem Rocker depurinisiert. Danach 2 x 10 min ebenfalls auf dem Rocker mit Lösung 2 denaturiert. Die im Gel aufgetrennte DNA wird nun nach Southern auf einer Nylonmembran fixiert. Der Aufbau des Blotts ist von unten nach oben aufgeführt:

- Wanne mit ca. 1000 ml 0,4 M NaOH
- Plexiglasplatte als Brücke
- 2 dicke angefeuchtete Filterpapierbögen (35 x 22 cm)
- Plastikabdeckungen um die das Gel überragenden Filterpapierränder abzudecken
- Agarosegel
- Nylonmembran (muss luftblasenfrei aufgelegt sein)
- 2 der Gelgröße entsprechend zugeschnittene dünne Filterpapiere, die mit Lösung 2 angefeuchtet sind

- 3 der Gelgröße entsprechend zugeschnittene dünne Filterpapiere (trocken)
- mehrere Schichten gefalteter Zellstoff
- Plexiglasplatte als Abdeckung
- Ca. 500 g Gewicht

Den Aufbau über Nacht stehen lassen.

Am nächsten Tag wird die Nylonmembran 2 mal 15 min mit 2 x SSC auf dem Horizontalschüttler neutralisiert.

3.2.5. Herstellung der DNA-Sonde

Die DNA-Sonde wird mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Präparations- Kit hergestellt. Das Verfahren orientiert sich am QIAGEN Plasmid midi Protokoll für high-copy Plasmids. Die Rezepte für die im Kit enthaltenen Puffer sind in der Anleitung des Präparationssets enthalten.

Zunächst wird 50 ml Startlösung, bestehend aus einer Kolonie des Trägerkeims *E. coli* DH 5 α , 100 $\mu\text{g/ml}$ Startlösung Ampicillin zur Selektion und dem LB-Nährmedium hergestellt, die unter ständigem Schütteln bei 37°C für 12 – 16 Stunden inkubiert wird. Bei 6000 g und 4 °C werden anschließend die Bakterien durch 15 min zentrifugieren zerstört. Das Pellet das dabei entsteht, wird mit 2 ml Puffer P1 resuspendiert. Dazu werden 2 ml Puffer P2 gegeben, gut geschüttelt und danach für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt 2 ml Puffer P3 hinzufügen, erneut gut schütteln, und 30 min auf Eis stellen. Im Anschluß wird bei 4 °C und 20000 g für 30 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird unter obigen Bedingungen nochmals 15 min zentrifugiert um von Rückständen des Keims gesäubert zu sein. Er enthält das zur Sondenpräparation nötige Plasmid.

Dieser Überstand wird in die Säule QIAGEN-tip 100 gegossen, die zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde. Wenn die Flüssigkeit durch die Säule geflossen ist wird die Säule 2-mal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Das Plasmid, das nun der

Säule anhaftet, wird mit 3 ml QF-Puffer eluiert und anschließend mit 0,1 ml Natriumacetat versetzt. Durch Zugabe von 2,2 ml Propanol wird die DNA gefällt und danach bei 15000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit 500 µl 70%iges Ethanol gewaschen, nochmals kurz zentrifugiert und an der Luft umgedreht getrocknet. Die Plasmid-DNA als Pellet wird in 500 µl aqua dest. einige Stunden lang gelöst.

Das gelöste Plasmid wird nun mit den Restriktionsenzymen *Sac I* und *Pst I* gespalten. Zunächst werden 50 µl Enzympuffer des Enzyms *Sac I* und 15 µl *Sac I* hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 12 µl *Pst I* nochmals 30 min in das Wasserbad stellen. Das gespaltene Plasmid wird jetzt in einem 0,7%igen Probegel, bestehend aus 100 ml TBE-Puffer, 0,7 g Biozym Agarose und 2 Tropfen Ethidiumbromid, auf seine Größe getestet. Als Bezugsgröße wird eine 100 bp DNA-ladder verwendet. 5 µl der Plasmidprobe werden mit 2 µl Stop-Puffer versetzt und aufgetragen. Von der 100 bp DNA-ladder werden 10 µl in die Spur gegeben. Das Gel wird ca. 30 min an 90 - 100 V angeschlossen und danach auf dem UV-Schirm kontrolliert. Wenn die Bande des gespaltenen Plasmids der 500 bp Bande entspricht (siehe Abb. 7), wird die gesamte Probe auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt. Es sollten jedoch nicht mehr als 20 µl in jede Tasche gegeben werden. Das Gel, wie oben beschrieben, laufen lassen und im Anschluss die 500 bp Bande aus dem Gel ausschneiden und bei -20 °C einfrieren. In dieser Bande befindet sich die gewünschte DNA-Sonde, die noch aus dem Gel isoliert werden muss.

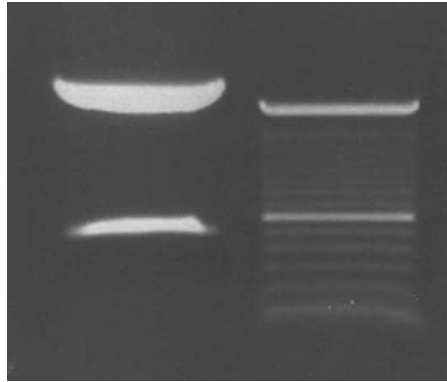


Abb. 7: 1 kb DNA-Leiter; Bande der Sonde in Höhe der 500 bp-Markerbande;

Die Gelschnipsel werden bei 40 °C im Wasserbad für 10 min aufgetaut, danach erneut bei –20 °C für 30 min eingefroren und nochmals wie oben im Wasserbad inkubiert. Das Gel wird bei diesem Vorgang gebrochen, so dass sich die Sonde bei 10000 min⁻¹ abzentrifugieren lässt. Um die Sonde möglichst ohne Rückstände abzentrifugieren zu können, verwendet man ein Filtercap mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die DNA wird nun aus dem Filtrat, das beim Zentrifugieren entstanden ist, mit Propanol und Natriumacetat gefällt. Der Vorgang ist identisch zur Fällung des Plasmids und wurde bereits oben beschrieben. Das Pellet wird jedoch im Anschluss an die Reinigung mit Ethanol in maximal 100 µl aqua dest. gelöst. Um die Sonde später in der geeigneten Menge einsetzen zu können wird ihre Konzentration in Lösung bestimmt. Dazu müssen erneut 4 µl der Sonde auf dem 0,7%igen TBE-Agarosegel aufgetragen werden. Als Bezugsgröße werden 4 µl low DNA mass-ladder verwendet. Nach einer Laufzeit des Gels von 30 min bei 30 – 40 V kann die Konzentration der Sonde im Helligkeitsvergleich der Banden abgeschätzt werden. Bei Bedarf kann die Sonde weiter verdünnt oder erneut gefällt werden.

3.2.6. Strippen der Membran

Ein Teil der DNA-Proben, die für diese Arbeit untersucht wurden, waren bereits von vorangehenden Untersuchungen gespalten und auf einer Membran fixiert. Jedoch wurde die DNA mit einer anderen Sonde hybridisiert, die zunächst abgewaschen, gestrippt werden muss um eine erneute Hybridisierung zu ermöglichen. Dazu werden ca. 400 ml des Strip-Puffers aufgekocht und über die Membran gegossen. In dieser Lösung wird die Membran 15 min auf dem Rocker geschüttelt. Ist danach keine radioaktive Strahlung der Membran mehr festzustellen, muss sie 2 mal mit 2 x SSC neutralisiert werden.

3.2.7. Labeln der DNA-Sonde

Zur radioaktiven Markierung der Sonde wird hier der Oligolabeling-Kit der Firma Amersham verwendet. Er enthält das „reagent-mix“ (dATP, d TTP, dGTP, random-hexadeoxyribonukleotides) und das Kleenow-Enzym (großes Fragment der DNA-Polymerase I). Das Verfahren („random-priming“-Methode) beruht darauf, dass die Nukleotide des Hexanukleotidgemischs zufällig auf der denaturierten DNA binden. Durch das Kleenow-Enzym wird der unvollständige Komplementärstrang mit den Nukleotiden aus dem „reagent-mix“ und dem radioaktiven Nukleotid [α P 32] dCTP aufgefüllt.

Als Ansatz werden 50 ng DNA-Sonde und 0,2 μ l λ -DNA in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die hier verwendete Sonde hatte eine Konzentration von 15 ng / μ l , das entsprach in etwa 3,3 μ l. Der Ansatz wird mit aqua dest. auf ein Volumen von 35 μ l aufgefüllt und bei 100 °C für 3 min auf dem Heizblock denaturiert.

Im Anschluss sofort auf Eis stellen und Folgendes dazu pipettieren:

Kleenow-Enzym	1 μ l
reagent-mix	10 μ l
[α P 32] dCTP	4 μ l

Nach kurzem Vortexen wird die Sonde im Wasserbad bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Währenddessen wird eine Sephadex G50-Säule zur Reinigung der Sonde hergestellt. Dazu wird in eine 1 ml Spritze (ohne Stempel) Sephadex G50-Lösung gegeben und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis sich in der Spritze eine weiße Säule bis fast unter die Öffnung gebildet hat. Die Säule zweimal mit 100 μ l TE-Puffer, der durch die Säule zentrifugiert wird, äquilibrieren. Nach Abschluss der Inkubation wird die Sonde auf 100 μ l mit TE-Puffer aufgefüllt und auf die Sephadex G50-Säule pipettiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 3000 min^{-1} wird die Sonde von überschüssigem [α P 32] dCTP gereinigt. Das überschüssige radioaktive Nukleotid verbleibt in der Sephadex G50-Säule, während die Sonde in einem neuen Eppendorfgefäß aufgefangen wird. Direkt vor ihrer Verwendung muss die Sonde 10 min auf dem Heizblock bei 100 °C denaturiert werden.

3.2.8. Hybridisieren, Waschen und Entwickeln der Nylonmembran

Zunächst wird die Membran im Hybridisierungs-Puffer vorhybridisiert. Dazu wird die Membran (ohne Luftblasen) an der Innenwand des Hybridisierungskolbens angelegt und mit 20 ml Church-Puffer in einem Heizofen mit Drehvorrichtung 60 min bei 65 °C inkubiert. Danach wird die frisch denaturierte DNA-Sonde in den Kolben gegeben und bei den selben Bedingungen wie oben über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird die überschüssige „heiße“-Sonde von dem Filter gewaschen. Zu Beginn des Vorgangs wird der Filter im Kolben unter Drehen im Ofen mit Waschlösung 1 für 10 min gewaschen. Die Lösung im Kolben durch Waschlösung 2 ersetzen und noch einmal 7 min waschen. Mit Waschlösung 3 wird jetzt so lange weitergewaschen bis nur noch 100 counts mit dem Geigerzähler auf der Membran messbar sind. Danach wird die Membran in einer Kunststoff-Folie möglichst luftblasenfrei eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit einem Röntgenfilm zusammen aufgelegt. Nach zweitägiger Lagerung im Eisfach bei -70 °C ist der Röntgenfilm in der Regel richtig belichtet und kann entwickelt werden. Es wurde hier ein vollautomatischer Röntgenfilmentwickler verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Differentialdiagnostik, myotone Dystrophie

In diesem ersten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob in einem Patientenkollektiv, das molekulargenetisch keinen Hinweis auf eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie lieferte, differentialdiagnostisch eine myotone Dystrophie in Betracht kommt. Dazu wurden 96 anonymisierte Patientenproben, die im Humangenetischen Institut der Universität Würzburg negativ auf FSHD getestet wurden, weiter auf myotone Dystrophie untersucht. Klinisch zeigten die Patienten eine auffällige Überschneidung der Symptomatik, wie später exemplarisch dargestellt wird.

Im Rahmen der Untersuchung wurde bei 33 der 96 Patientenproben ein Restriktionsverdaut mit dem Restriktionsenzym Eco RI aus aufgetauter Leukozyten-DNA, anschließender Gelelektrophorese und Southern-Blott durchgeführt. Die Membran des Blotts wurde mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde p5B 1.4 hybridisiert.

Für die Untersuchung der restlichen 63 Patienten wurde die Blott-Membran der ursprünglichen Diagnostik auf eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie verwendet. Dazu wurde, wie im Methodenteil erläutert, die alte DNA-Sonde mit Hilfe eines „Strippers“ abgewaschen. Die gereinigte Membran wurde anschließend ebenfalls mit der radioaktiven DNA-Sonde p5B 1.4 hybridisiert.

Ein Befund ergibt sich durch die Größenbestimmung des CTG-Repeatblocks am 3'-Ende des DMPK-Gens auf Chromosom 19q. Dieser Abschnitt wird mit der oben erwähnten Sonde p5B 1.4 markiert. Zeigt dieser Abschnitt eine Expansion auf über 50 Repeateinheiten, kann die Diagnose einer myotonen Dystrophie gestellt werden.

Von den 96 getesteten Patienten zeigten 95 eine normale Allelgröße in der entscheidenden Region. Aufgrund dessen kann für die betreffenden Patienten eine myotone Dystrophie molekulargenetisch ausgeschlossen werden.

Bei einer der untersuchten Proben zeigte sich ein vergrößertes CTG-Repeat mit circa 600 CTG-Repeat-Einheiten (siehe Abb. 10). Für den betreffenden Patienten kann die Diagnose einer myotone Dystrophie molekulargenetisch gestellt werden.

Auf den drei nachfolgend abgebildeten Southern-Blott Aufnahmen ist das Ergebnis der Untersuchung von den 33 Patientenproben, die aus Leukozyten-DNA aufbereitet wurden, dargestellt.

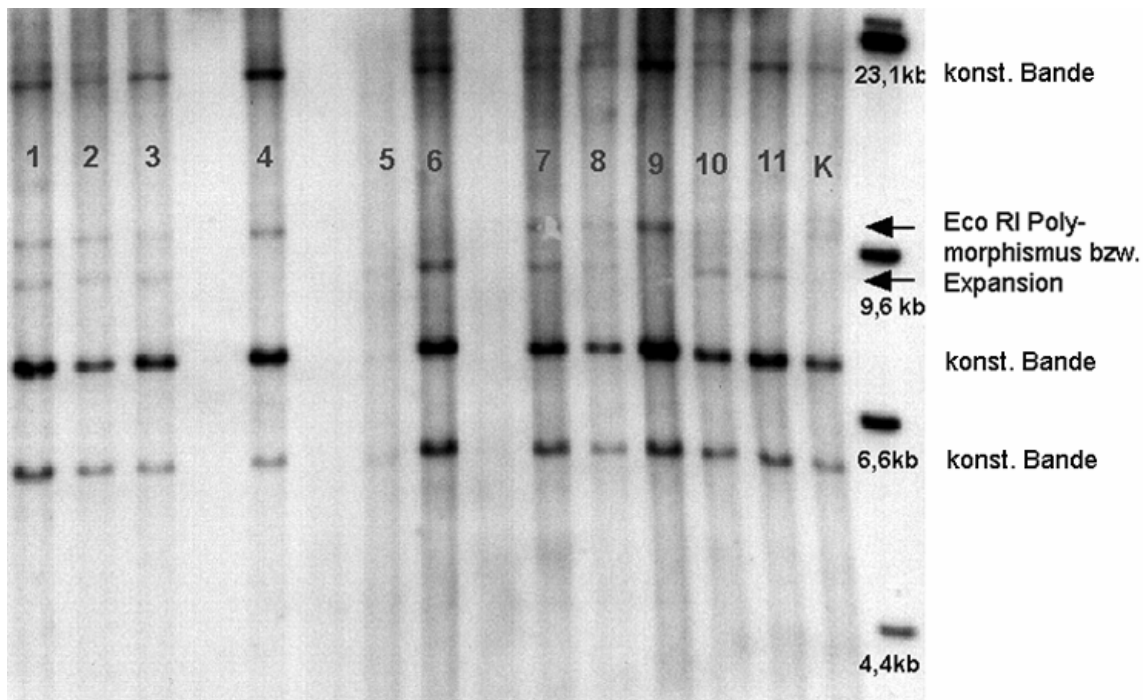


Abb. 8: Blott myotone Dystrophie #1

In Abb. 8 sind 11 Spuren vorhanden, die eine Auswertung zulassen. Alle Proben sind negativ. Die letzte (Ko) Spur ist eine Positivkontrolle. Entscheidend für die Auswertung sind die beiden, direkt unter der Nummerierung liegenden Banden. Bei der Kontrolle ist ein leicht vergrößertes Allel zu sehen.

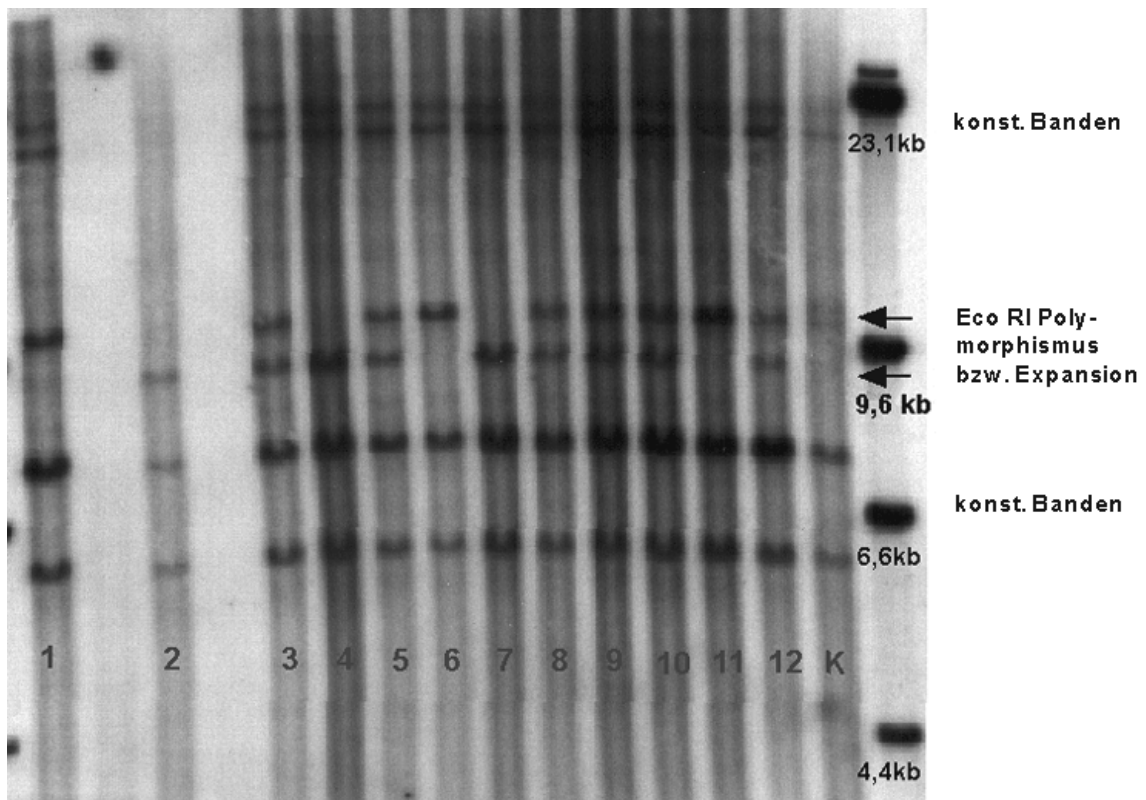


Abb. 9: Blott myotone Dystrophie #2

Die 12 auswertbaren Spuren (Abb. 9) zeigen keine CTG-Repeatexpansion. Die Kontrollspur (Ko) zeigt eine leichte Vergrößerung.

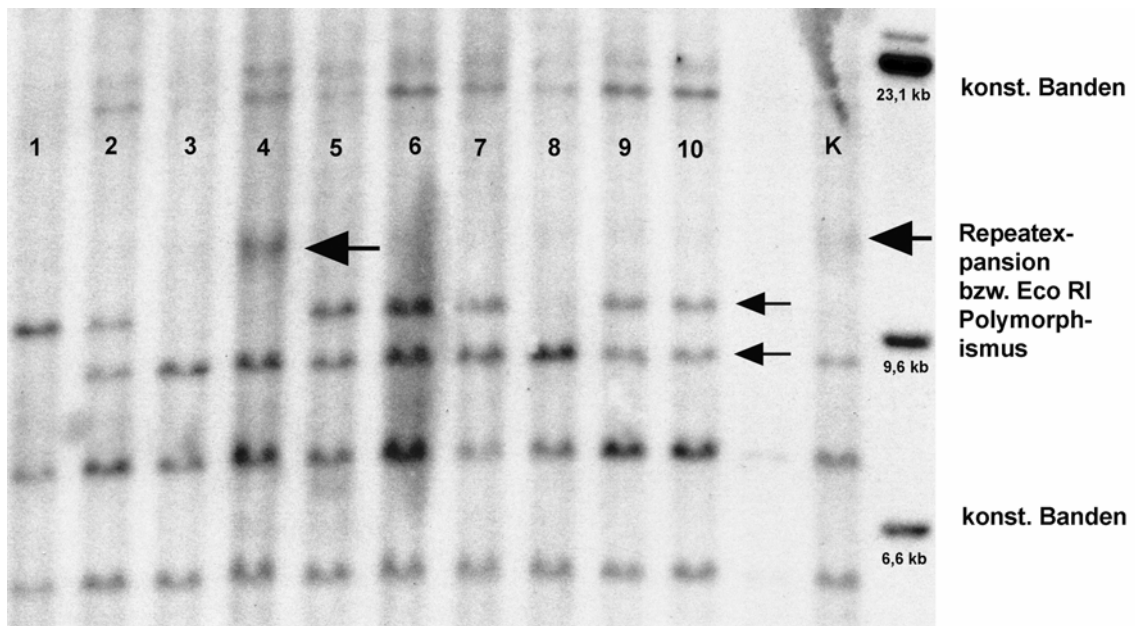


Abb. 10: Blott myotone Dystrophie #3

Abbildung 10 stellt 10 auswertbare Spuren dar. In Spur 1-3 und 5-10 sind normal große CTG-Repeats vorhanden. In Bahn 4 liegt eine deutliche Repeatexpansion vor.

In den folgenden Aufnahmen, sind Beispiele der ursprünglichen FSHD-Blotts abgebildet, die nach dem „Strippen“ ebenfalls mit der Sonde p5B 1.4 hybridisiert wurden:

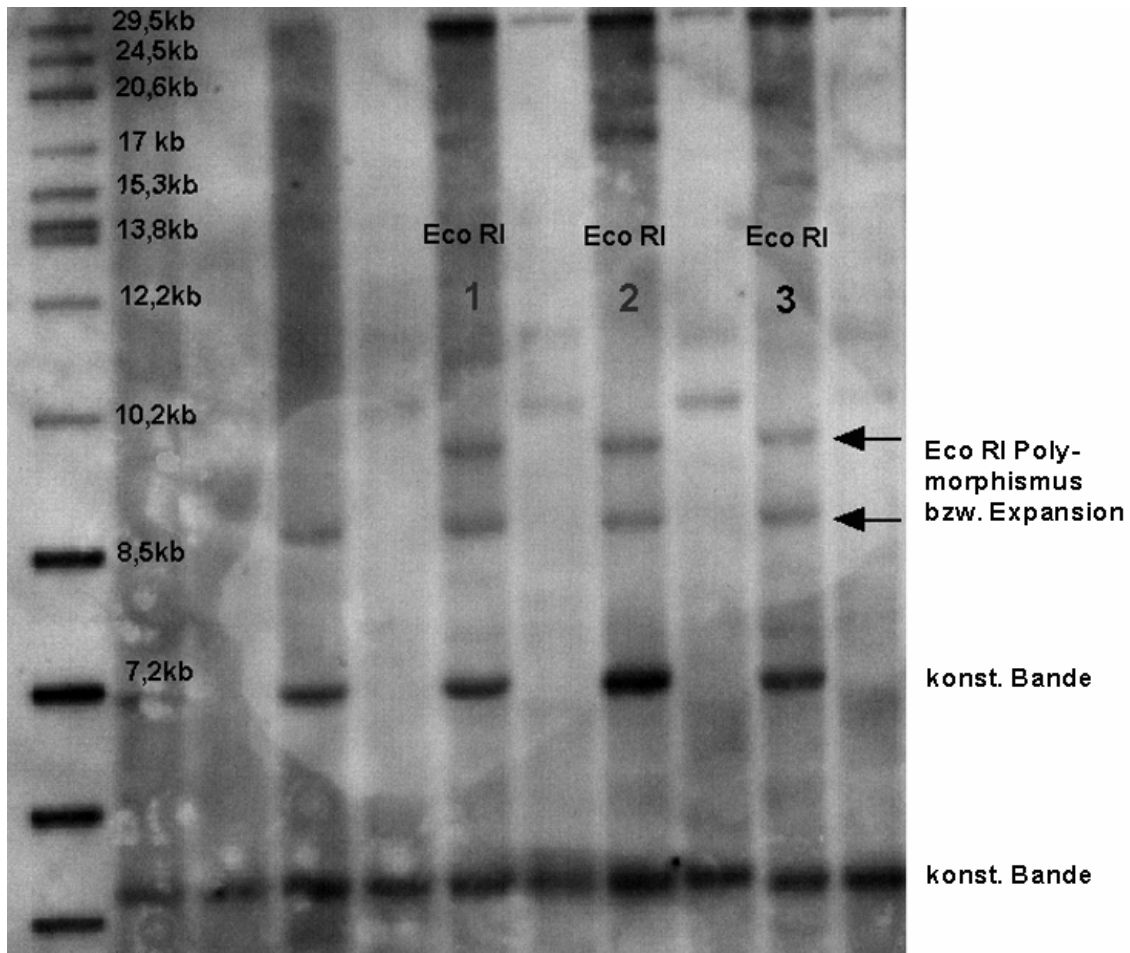


Abb. 11: FSHD-Blott, hybridisiert mit Sonde für myotone Dystrophie #1

Die in den Abbildungen 11-14 dargestellten Blott zeigen einen Doppelverdau mit Eco RI und Bln I. Wichtig für die Auswertung sind die direkt unter den Zahlen gelegenen Spuren. Sie enthalten den Eco RI Restriktionsverdau. Die entscheidenden Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

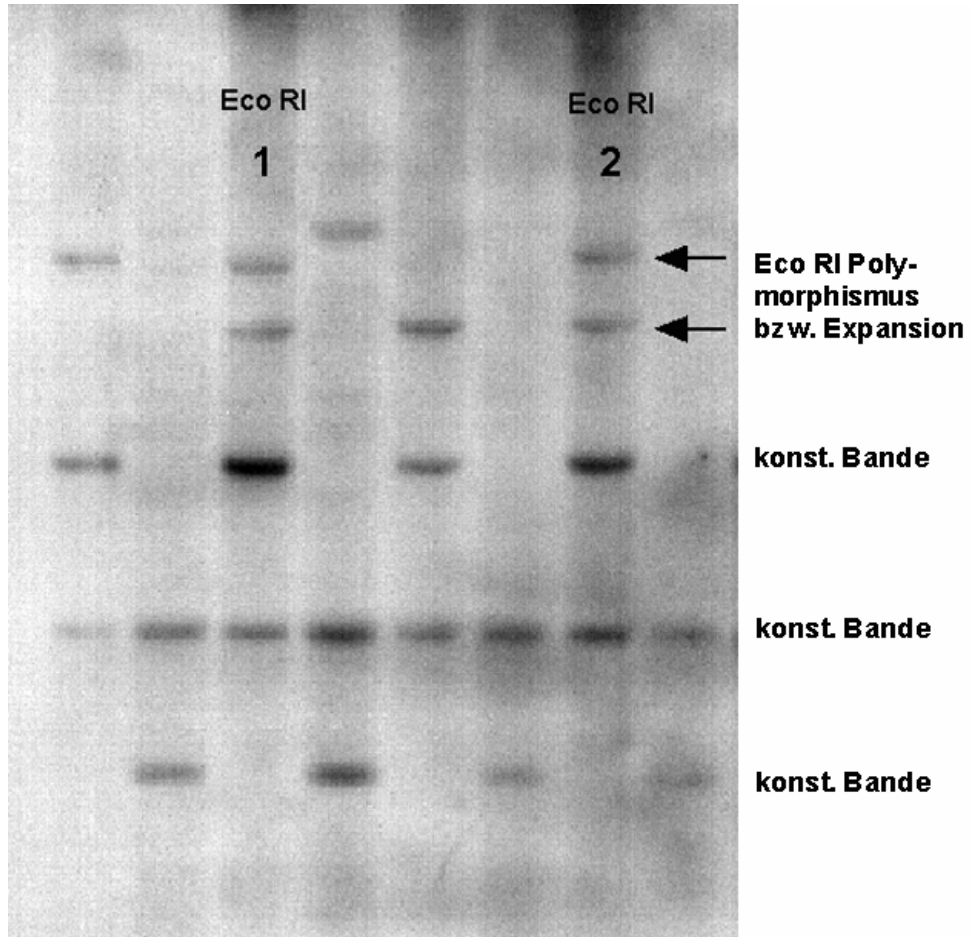


Abb. 12: FSHD-Blott, hybridisiert mit Sonde für myotone Dystrophie #2

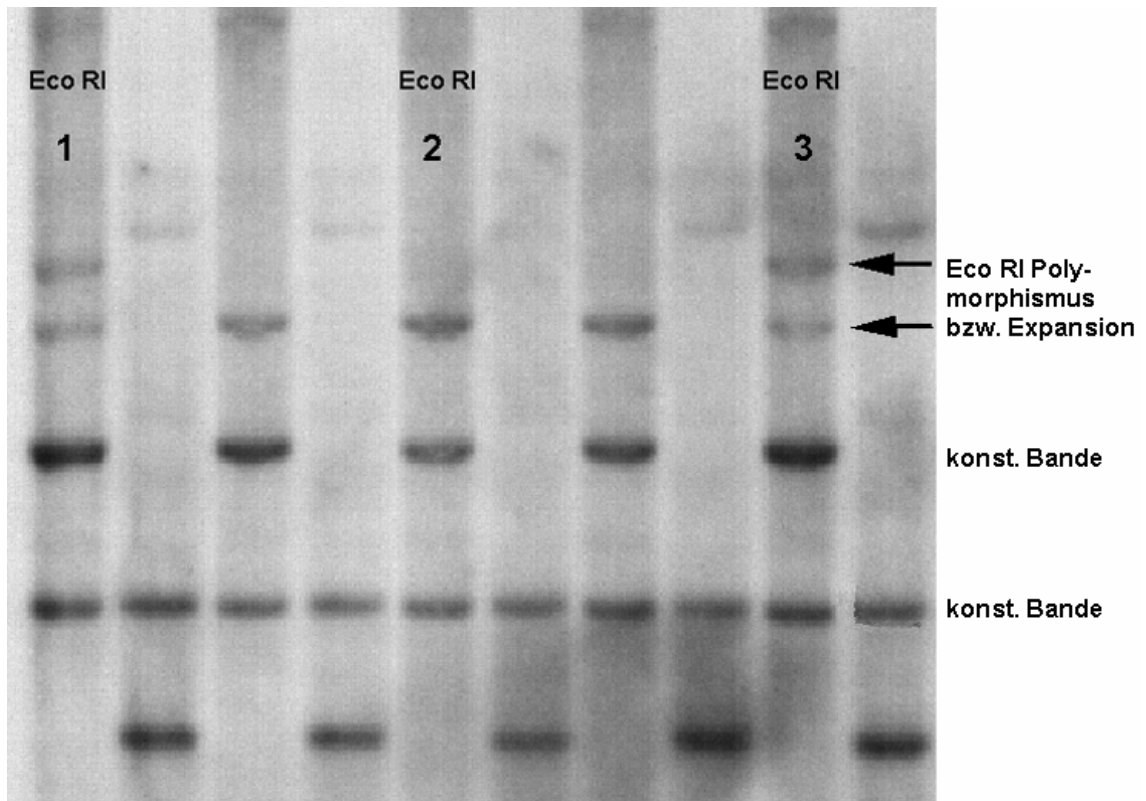


Abb. 13: FSHD-Blott, hybridisiert mit Sonde für myotone Dystrophie #3

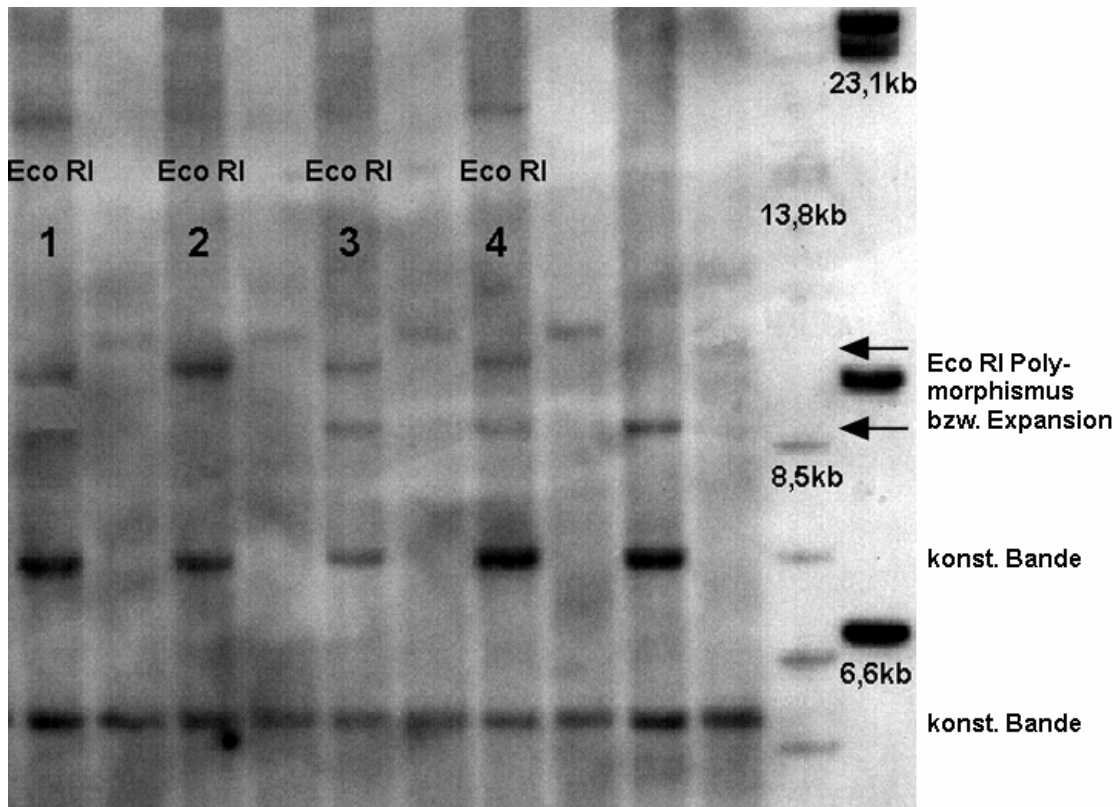


Abb. 14: FSHD-Blott, hybridisiert mit Sonde für myotone Dystrophie #4

Auf die Symptomatik des Patienten bei dem die Diagnose myotone Dystrophie gestellt wurde (Abb. 10; Spur 4), soll nun kurz eingegangen werden:

Es handelt sich um einen 34-jährigen Mann, der anamnestisch angibt, erstmals etwa im 12. Lebensjahr eine Verkrampfung der Handmuskulatur bemerkt zu haben. Vor ca. 3 - 4 Jahren sei ihm dann eine rechtsbetonte Fußheberschwäche aufgefallen. Darüber hinaus bemerkte er eine zunehmende Atrophie der Oberschenkel- und Schultergürtelmuskulatur. Des weiteren gibt er an, dass sein Vater an einer Katarakt leidet.

Neurologisch fällt bei dem Patienten eine facies myopathica, eine temporale Atrophie, ein hoher Gaumen und eine deutliche Schwächung der distalen

Unterarmmuskulatur, insbesondere der Handstrecker- und Beuger auf. Außerdem zeigt der Patient eine beidseitige scapula alata.

Das Labor ermittelte eine CK von 232 U/l und eine γ -GT von 32 U/l. Die restlichen Routineparameter lagen im Normbereich.

Das EMG vom M. deltoideus (re.) zeigte nur wenige myotone Entladungen. Im M. extensor digitorum communis (re.) konnten ausgeprägte myotone und pseudomyotone Entladungen nachgewiesen werden. Die Willküraktivität war im M. deltoideus (re.) normal. Für den M. extensor digitorum communis (re.) war sie nicht beurteilbar.

Insgesamt ergibt sich bei diesem Patienten ein gemischtes klinisches Bild. Er zeigt einerseits Merkmale einer myotonen Dystrophie, wie die facies myopathica, die Fußheberschwäche, die Atrophie der Unterarmmuskulatur sowie myotone Potentiale. Andererseits fällt eine relativ stark ausgeprägte proximale Muskelschwäche mit einer für die fazioscapulohumerale Muskeldystrophie relativ typischen Schulterkonfiguration, sowie eine präaxilläre Falte auf.

4.2. Differentialdiagnostik, fazioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD)

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden 25 anonymisierte Patientenproben differentialdiagnostisch auf eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie untersucht. Bisher wurden die Proben vom Humangenetischen Institut der Universität Würzburg molekulargenetisch auf eine häufige Mutation im α -Sarkoglykangen (Adhalingen) getestet. Es lag bei den untersuchten Patientenproben keine Mutation vor. Klinisch zeigen die Patienten ein Bild, welches die Differenzierung der beiden Erkrankungen erschwert.

Für die Untersuchung der 25 Proben wurde aus aufgetauter Leukozyten-DNA ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Eco RI durchgeführt. Des weiteren wurde ein Doppelverdau mit den Enzymen Bln I und Eco RI zum Ausschluss der Kreuzhybridisierung mit Chromosom 10 gemacht (siehe Kap. 1.2.2.). Im Anschluss wurde die geschnittene DNA in einer Horizontalgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Dort wurde sie mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde, p13E-11 hybridisiert. Das Ergebnis wurde durch Entwicklung des, mit der radioaktiv markierten Nylonmembran, belichteten Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Nachweisen lässt sich eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie durch ein verkürztes Eco RI-Fragment von weniger als 35 kb aus dem Bereich 4q35. Das entsprechende Fragment des Doppelverdaus ist nochmals um ca. 3 kb kleiner. Fragmentgrößen zwischen 35 - 48 kb liegen im Grenzbereich und müssen mit Vorsicht betrachtet werden (Vitelli et al., 1999).

Die Untersuchung zeigte bei 18 der 25 getesteten Patienten ein Eco RI-Fragment mit mindestens 48 kb. Für diese Patienten kann eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie molekulargenetisch ausgeschlossen werden.

Bei zwei der Proben ergab sich ein grenzwertiges Ergebnis, mit Eco RI-Fragmenten im Bereich von 35 - 48 kb.

Molekulargenetisch bestätigt werden konnte eine FSHD bei 5 Patienten. Es fanden sich Eco RI-Fragmente mit einer Größe unter 35 kb aus der Region 4q35.

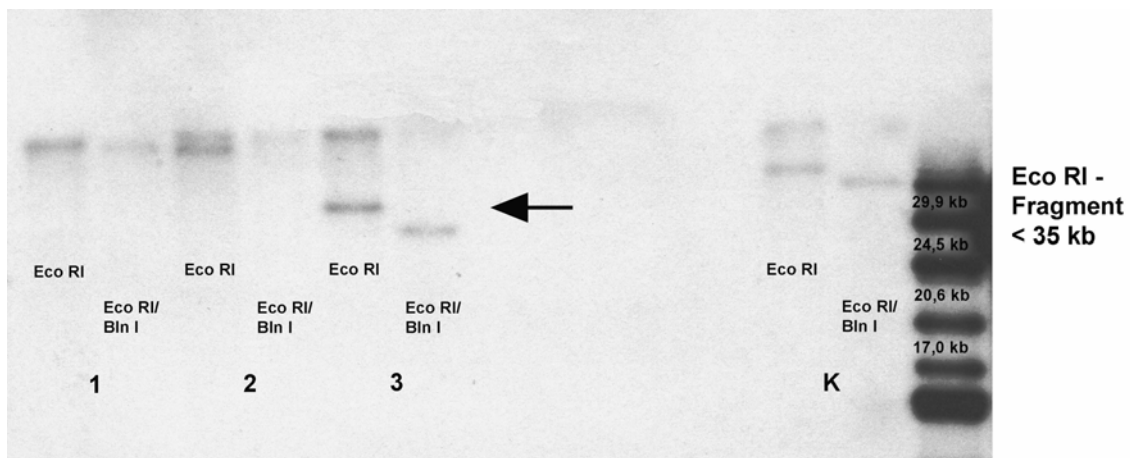


Abb.: 15: Blott FSHD

In Abbildung 15 ist das Ergebnis von 3 Patientenproben dargestellt. Für Probe 3 ergeben sich verkürzte Fragmente (Pfeil), die restlichen Proben liegen im Normbereich.

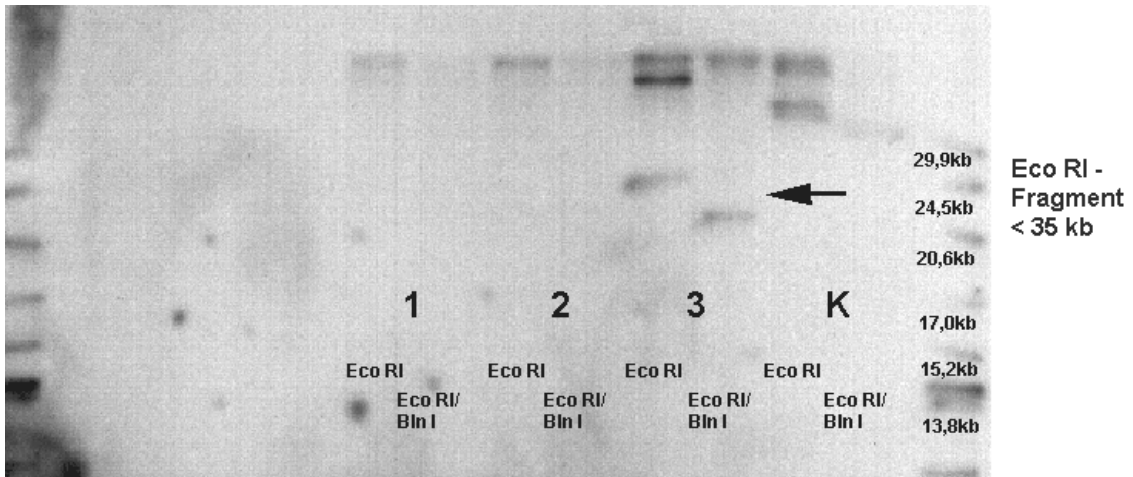


Abb.: 16: Blott FSHD

Bild 16 zeigt verkürzte Fragmente in den Spuren von Probe 3 (Pfeil).

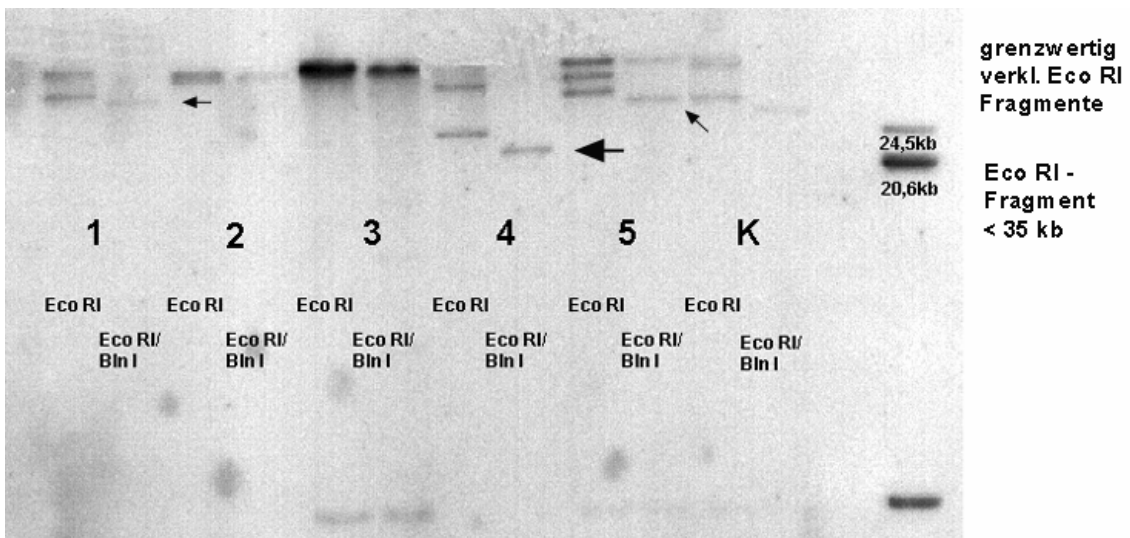


Abb.: 17: Blott FSHD

Die letzte Aufnahme stellt zwei grenzwertige Proben in den Spuren 1 und 5 dar. Bei Probe 4 konnte eine FSHD molekulargenetisch bestätigt werden.

5. Diskussion

In ihrer Symptomatik können sich die FSHD und die myotone Dystrophie ähneln. Vor allem die faziale Beteiligung ist typisch für beide Erkrankungen. Auch eine Retinadegeneration, die mit beiden Krankheiten assoziiert wird, tritt häufig auf. Erst im weiteren Verlauf entwickeln Patienten mit einer myotonen Dystrophie kardiale, pulmonale, endokrine, oder ZNS-Komplikationen. Die Myotonie als diagnostischer Hinweis für eine myotone Dystrophie ist zwar häufig früh zu finden, kann aber auch spät auftreten und ist daher kein absolutes Ausschlusskriterium. Die FSHD hingegen zeichnet sich eher durch die Progredienz der dystrophen Vorgänge ohne Beteiligung des Myokards aus (siehe Tab. 2).

Inwieweit eine Überschneidung der Symptomatik zu einer Fehleinschätzung beim Stellen der Verdachtsdiagnose führt, wurde in dieser Arbeit überprüft.

Wie in den Ergebnissen des ersten Abschnitts dargestellt wurde, konnte bei einer der molekulargenetisch untersuchten Patientenproben, eine CTG-Repeatexpansion nachgewiesen werden. Für diesen Patienten wurde der differentialdiagnostische Verdacht einer myotonen Dystrophie bestätigt. Bei den anderen 95 anonymisierten Patientenproben (96 insgesamt) konnte eine myotonen Dystrophie nicht bestätigt werden.

Die ursprüngliche Verdachtsdiagnose einer fazioscapulohumeralen Muskeldystrophie war bereits zuvor vom Routinelabor des Humangenetischen Instituts der Universität Würzburg molekulargenetisch ausgeschlossen worden.

Dieses doch recht eindeutige Ergebnis mit nur einem positiven Befund bei 96 getesteten Proben spricht dafür, dass in der klinischen Praxis eine Differenzierung sehr wohl möglich ist. Einerseits kann eine genaue Betrachtung des primären Manifestationsortes sowie der Verlauf der Erkrankung Hinweise geben. So ist zum Beispiel der Befall des M. orbicularis oculi sowie der Pharyngealmuskulatur mit

einhergehenden Dysphagien typisch für eine myotone Dystrophie. Andererseits kann gezielte Diagnostik wie ein EMG **mehrer** Muskeln und eine Biopsie weitere Hinweise liefern. Die Kreatinkinase kann bei der myotonen Dystrophie stärker erhöht sein als bei der FSHD, wo sie in der Regel unwesentlich bis mäßig über der Norm liegt.

Bei dem Patienten, der in dieser Untersuchung positiv getestet wurde, war die Verteilung der Muskelsymptomatik sehr unspezifisch (siehe Ergebnisse). Auch das EMG bezüglich myotoner Entladungen war erst Jahre nach Beginn der muskulären Symptomatik positiv.

Deutlich schwieriger scheint die klinische Differenzierung einer Gliedergürtel-Muskeldystrophie von einer FSHD zu sein. Um dies zu überprüfen, wurden 25 Patientenproben (mit der Verdachtsdiagnose LGMD) auf eine FSHD untersucht. Bei allen getesteten Patienten konnte klinisch eine Beteiligung der facialen Muskulatur festgestellt werden. Eine häufige Mutation im Adhalingen wurde zuvor im Humangenetischen Institut der Universität Würzburg ausgeschlossen.

Es konnte, wie bereits erwähnt, bei 5 der 25 differentialdiagnostisch untersuchten Patientenproben ein verkleinertes Eco RI-Fragment in der Region 4q35 nachgewiesen werden. Des weiteren ergaben sich bei 2 Patientenproben grenzwertige Eco RI-Fragmente mit einer Größe zwischen 35-48kb.

Auffällig hierbei ist die relativ große Zahl an falschen Verdachtsdiagnosen. Bedingt ist dies sicherlich durch die große Ähnlichkeit der muskulären Symptomatik beider Erkrankungen. Dies trifft insbesondere zu, wenn die FSHD sich primär am Schulter- oder Beckengürtel manifestiert. Auch der Verlauf der beiden Erkrankungen kann annähernd gleich sein. Des weiteren scheint das Fehlen eines eindeutigen Leitsymptoms, wie die Myotonie bei der myotonen Dystrophie, die Differenzierung noch weiter zu erschweren.

Auch wenn die Fallzahl für den zweiten Teil der Arbeit nicht so groß war wie für den ersten, wird anhand der 5 positiv und 2 grenzwertig getesteten Proben deutlich, dass sich eine fazioscapulohumerale Muskeldystrophie klinisch wie eine Gliedergürtel Muskeldystrophie manifestieren kann und deshalb eine molekulargenetische Differentialdiagnostik sehr hilfreich ist.

6. Literaturverzeichnis

- (1) **Amalfitano, A.**; Rafael, J. A.; Chamberlain, J. S.:
Structure and mutation of the dystrophine gene. In: Brown, S. C.; Lucy, J. A.;
Dystrophin. Gene, protein and cell biology.
Cambridge University Press, Cambridge: 1-26, 1997.

- (2) **Andrews, P. I.**; Wilson, J.:
Relative disease severitiy in sibilings with myotonic dystrophie. J. child
Neurology 7: 161-167, 1992.

- (3) **Ashizawa, T.**; Anvret, M.; Baiget, M.; Barcelo, J. M.; Brunner, H.;
Cobo, A. M.; Dalla piccola, B.; Fenwick, R. G.; Grandell, U.; Harley, H.; Junien,
C.; Koch, M. C.; Korneluk, R. G.; Lavedan, C.; Miki, T.; Mulley, J. C.; Lopez de
Munain, A.; Novelli, G.; Roses, A. D.; Selzer, W. K.; Shaw, D. J.; Smeets, H.;
Sutherland, G. R.; Yamagata, H.; Harper, P. S.:
Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic
dystrophie. Am. J. Hum. Genet. 54: 414-423, 1994.

- (4) **Bailey, R. O.**; Marzulo, D.B.; Hans, M. B.: Facioscapulohumeral muscular
dystrophie: new observations. Acta Neurol Scand. 74: 51-58, 1986.

- (5) **Barbosa, J.**; Nuttall, F. Q.; Kennedy, W.; Goetz, F.:
Plasma insulin in patients with myotonic dystrophie and their relatives.
Medicine 53: 307, 1974.

- (6) **Becker, P. E.**: Die Einteilung der Muskeldystrophien.
Nervenarzt 13: 209-214, 1940.

- (7) **Bengtsson**, U; Altherr, M. R.; Wasmuth, J. J.; Winokur, S. T.:
High resolution fluorescence in situ hybridisation to linearly extended DNA visually maps a tandem repeat associated with facioscapulohumeral muscular dystrophie immediately adjacent to the telomeren of 4q.
Hum. Molec. Genet. 3: 1801-1805, 1994.
- (8) **Boucher**, C. A.; King, S. K. ; Carey, N. ; Krahe, R.; Whinchester, C. L.; Rhaman, S.; Creavin, T.; Meghji, P.; Bailey, M. E. S.; Chartier, F. L.; Brown, S. D.; Siciliano, M. J.; Johnson, K. J.:
A novel homeodomain-encoding gene is associated with large CpG island Interrupted by the myotonic dystrophie unstable (CTG)_n repeat. Hum. Mol. Genet. 4: 1919-1925, 1995.
- (9) **Brook**, J. D.; Mc Currach, M. E.; Harley, H. G.; Buckler, A. J.; Church, D.; Aburatani, H.; Hunter, K.; Stanton, V. P.; Thirion, J. P.; Hudson, T.; Sohn, R. Zelman, B.; Snell, R. G.; Rundle, S. A.; Crow, S.; Davies, J.; Shelbourne, P.; Buxton, J.; Jones, C.; Juvonen, V.; Johnson, K.; Harper, P. S.; Shaw, D. J.; Housman, D. E.:
Molecular basis of myotonicdystrophie: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3-prime en of a trnskript encoding a protein kinase family member. Cell 68: 799-808, 1992
- (10) **Brouwer**, O. F.; Padberg, G. W.; Ruys, C. J. M.; Brand, R.; de Laat, J. A. P. M.; Grote, J. J.:
Hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophie. Neurologie 41: 1878-1881, 1991.
- (11) **Brown**, S. C.; Lucy, J. A.:
Functions of dystrophin. In: Brown, S. C.; Lucy, J. A.; Dystrophin. Gene, protein and cell biology. Cambridge University, Cambridge: 163-200, 1997.

- (12) **Brunner**, H.; Smeets, H.; Coerwinkel-Driessen, M.; van Oost, B. A.; Spaans, F.; Wieringa, B.; Ropers, H. H.:
Linkage map around the myotonic dystrophie locus and evidence for a Charcot Marie Tooth neuropathy locus on chromosome 19. *Cytog. Cell. Genet.* 51: 971, 1989.
- (13) **Brunner**, H. G.; Kornrluk, R. G.; Coerwinkel-Diessen, M.; MacKenzie, A.; Smeets, H.; Lambermon, H. M. M.; van Oost, B. A.; Wieringa, B.; Ropers, H. H.:
Myotonic dystrophie is closely linked to the gene for muscle-type creatine kinase (CKMM). *Hum. Genet.* 81: 308-310, 1989.
- (14) **Brunner**, H. G.; Smeets, H.; Lambermon, H. M. M.; Coerwinkel-Diessen, M.; van Oost, B. A.; Wieringa, B.; Ropers, H. H.:
A multipoint linkage map around the locus for myotonic dystrophie on chromosome 19. *Genomics* 5: 589-595, 1989.
- (15) **Brunner**, H. G.; Hamel, B. C. J.; Rieu, P.; Howeler, C. J. ; Peters, F. T. M.:
Intestinal pseudoobstruction in myotonic muscular dystrophie. *J. Med. Genet.* 29: 791-793, 1992.
- (16) **Brunner**, H. G.:
Genetic studies in myotonic dystrophy. Thesis, University of Nijmegen, 1993.
- (17) **Buxton**, J.; Shelbourne, P.; Davies, J.; van Tongeren, T.; Aslanidis, C.; de Jong, P.; Jansen, G. ; Anvret, M. ; Riley, B. ; Williamson, R. ; Johnson, K. :
Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophie. *Nature* 355: 547-548, 1992.

- (18) **Campbell, K. P.:**
Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679, 1995.
- (19) **Cobo, A.; martinez, J. M.; Martorell, L.; Baiget, M.; Johnson, K.:**
Molecular diagnosis of homozygous myotonic dystrophie in two asymptomatic sisters. *Hum. Molec. Genet.* 2: 711-715, 1993.
- (20) **Curschmann, H.:**
Über familiäre atrophische Myotonie.
Dtsch. Z. Nervenheilkunde 45: 161-212, 1912.
- (21) **Damian, M. S.; Bachmann, G.; Koch, M. C.; Schilling, G.; Stoppler, S.; Dorndorf, W.:** Brain disease an molecular analysis in myotonic dystrophie. *Neuroreport* 5: 2549-2552, 1994.
- (22) **Davies, J.; Siciliano, M. J.; Nimmo, E.; Shelbourne, P.; Buxton, J.; Williamson, R.; Jhonson, K.:** Physical and genetic analyses of cosmids From the myotonic dystrophie region of chromosome 19. *Cytogenet. Cell. Gen.* 51: 983-984, 1989.
- (23) **Emery, A. E. H.:** Population frequencies of inherited neuromuscular disease – a world survey. *Neuromusc. Disorders* 1: 19-29, 1991.
- (24) **Fadic, R.; Sunada; Y.; Waclawik, A. J.; Buck, S.; Lewandoski, P. J.; Campbell, K. P.; Lotz, B. P.:** Deficiency of a dystrophin assotiated glycoprotein (adhalin) in a patient with muscular dystrophie and cardiomyopathie. *New Eng. J. Med.* 334: 362-366,1996.

- (25) **Fitzsimons**, R. B.; Gurwin, E. B.; Bird, A. C.:
Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophie: a general assotiation with genetics and therapeutic implications.
Brain 110: 631-648, 1987.
- (26) **Fu**, Y. H.; Pizzuti, A.; Fenwick, R. G.; King, J.; Rajnarayan, S.; Dunne, P. W.; Dubel, J.; Nasser, G. A.; Ashizawa, T.; de Jong, P.; Wieringa, B. ; Korneluk, R.; Perryman, M. B.; Epstein, H.; Caskey, C. T.:
An unstable triple repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophie.
Science 25: 1256-1258, 1992.
- (27) **Harley**, H. G.; Walsh, K. V.; Rundle, S.; Brook, J. D.; Sarfarazi, M.; Koch, M. C.; Floyd, J. L.; Harper, P. S.; Shaw, D. J.:
Localisation of the myotonic dystrophie locus to 19q13.2-19q13.3 and its relationship to twelve polimorphic loci on 19q. Hum. Genet. 87: 73-80, 1991.
- (28) **Harley**, H. G.; Brook, J. D.; Rundle, S. A.; Crow, S.; Reardon, W.; Buckler, A. J.; Harper, P. S.; Housman, D. E.; Shaw, D. J.:
Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic Dystrophie. Nature 355: 545-546, 1992.
- (29) **Harper**, P. S.: Myotonic Dystrophie.
Philadelphia: W. B. Saunders (pub.) (2nd ed.), 1989.
- (30) **Harris**, S.; Moncrieff, C.; Johnson, K.:
Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward!
Hum. Mol. Genet. 5: 1417,1423, 1996.
- (31) **Hull**, K. L.; Roses, A. D.:
Stoichiometry of sodium and potassium transport in erythrocytes from patients with myotonic dystrophie. J. Physiol. 254: 169-181, 1976.

- (32) **Groenen, P.**; Wieringa, B.:
Expanding complexity in myotonic dystrophy. *Bio Esseys* 20: 901-912, 1998.
- (33) **Jansen, G.**; de Jong, P. J. ; Amemiya, C. ; Aslanidis, C. ; Shaw, D. J. ;
Harley, H. G.; Brook, J. D.; Fenwick, R.; Kornrluk, R. G.; Tsilfidis, C.:
Physical and genetic characterization of the distal segment of the myotonic
dystrophie area on 19q. *Genomics* 13: 509-517, 1992.
- (34) **Jansen, G.**; Mahadevan, M.; Amemiya, C.; Wormskamp, N.; Segers, B.;
Hendriks, W.; O'Hoy, K.; Baird, S.; Sabourin, L.; Lennen, G.:
Characterisation of the myotonic dystrophie region predicts multiple protein
Isoform-encoding mRNA's. *Nat. Genet.* 1: 261-262, 1992.
- (35) **Klesert, T. R.**; Otten, A. D.; Bird, T. D.; Tapscott, S. J.:
Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophie locus reduces
expression of DMAHP. *Nature Genet.* 16: 402-406, 1997.
- (36) **Koch, M. C.**; Grimm, T.; Harley, H. G.; Harper, P. S.:
Genetic risks for children of women with myotonic dystrophie. *Am. J. Hum.*
Genet. 48: 1084-1091, 1991.
- (37) **Kress, W.**; Mortier, W.; Müller-Reible, C. R.; Grimm, T.:
Erkrankungen des Muskels - Muskeldystrophien. *Neurogenetik von O. Rieß,*
Springerverlag: 333-353, 1998.
- (38) **Landouzy, L.**; Dejerine, J.:
De la Myopathie atrophique progressive. *Rev. Med. Franc.* 5:81, 1885.
- (39) **Lange, P.**; Wöhrmann, K. :
Genetisches Grundpraktikum.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1979.

- (40) **Lavedan, C.**; Hofmann-radvanyi, H. ; Shelbourne, P. ; Rabes, J. P. ; Duros, C.; Savoy, D. ; Dehaupas, I.; Luce, S.; Johnson, K. ; Junien, C. :
Myotonic dystrophie : size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 875-883, 1993.
- (41) **Lenard, H. G.**; Goebel, H. H.; Weigel, W.:
Smooth muscle involvement in congenital myotonic dystrophie.
Neuropädiatrie 8: 42-52, 1977.
- (42) **Leon, S. H.**; Schuffler, M. D.; Kettler, M.; Rohrmann, C. A.:
Chronic intestinal pseudoobstructiones as a complication of Duchenne's muscular dystrophie. *Gastroenterology* 90: 455-459, 1986.
- (43) **Lunt, P. W.**; Jardine, P. E.; Koch, M. C.; Maynard, J.; Osborn, M.; Williams, M.; Harper, P. S.; Upadhyaya, M.:
Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or a wheelchair use, with a possible generation effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophie (FSHD). *Hum. Molec. Genet.* 4: 951-958, 1995.
- (44) **Mahadevan, M.**; Tsilfidis, C.; Sabourin, L.; Shutler, G.; Amemiya, C.; Jansen, G.; Neville, C.; Narang, M.; Barcelo, J.; O'Hoy, K.; Leblond, S.; Early-McDonald, J.; de Jong, P. J.; Wieringa, B.; Korneluk, R. G.:
Myotonic dystrophie mutation: an unstable CTG repeat in the 3-prime untranslated region of the gene. *Science* 255: 1253-1255, 1992.
- (45) **Martorell, L.**; Illa, I.; Rosell, J.; Benitez, J.; Sedano, M. J.; Baiget, M.:
Homozygous myotonic dystrophie: clinical and molecular studies of three unrelated cases. *J. Med. Genet.* 33: 783-785, 1996.

- (46) **Mc Nally**, E. M.; Yoshida, M.; Mizuno, Y.; Ozawa, E.; Kunkel, E. M.:
Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on
chromosome 17q 21. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 9690-9694, 1994.
- (47) **Mortier**, W.:
Muskel und Nervenerkrankungen im Kindesalter.
Thieme Stuttgart, 313-319, 1994.
- (48) **Morton**, N. E.; Chung, C. S.:
Formal genetics of muscular dystrophie.
Am. J. Hum. Genet. 11: 360-379, 1959.
- (49) **Ohlendieck**, K.:
Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage
between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle-
fibers. Eur. J. Cell Biol. 69: 1-10, 1996.
- (50) **Ozawa**, E.; Yoshida, M.; Suzuki, A.:
Dystrophin-associated protein in muscular dystrophie.
Hum. Mol. Genet. 4: 1711-1716, 1995.
- (51) **Padberg**, G. W.:
Facioscapulohumeral disease. Thesis. Leiden, Univesity of Leiden, 1982.
- (52) **Reddy**, P. S.; Housman, D. E.:
The complex pathology of trinucleotides repeats.
Curr. Opin Cell Biol. 9: 364-372, 1997.
- (53) **Rieß**, O.; Schöls, L.:
Neurogenetik, Springer-Verlag: 344, 1998.

- (54) **Roses**, A. D.; Yamaoka, L. H.; Hung, W. Y.; Speer, M. C.; Laberge, C.; Thibault, M. C.; Mathieu, J.; Pericak.Vance, M. A.:
Linkage studies in myotonic muscular dystrophie.
Cytogen. Cell. Genet. 51: 1069, 1989.
- (55) **Savkur**, S. R.; Philips, A. V. ; Cooper, T. A.:
Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy.
Nature genetics 29: 40-47, 2001.
- (56) **Sayli**, B. S.; Yaltkaya, K.; Cin, S.:
Faciocapulohumeral muscular dystrophie concentrated in the village Cullar, Nevsehir Turkey. Hum. Genet. 67: 201-208, 1984.
- (57) **Schöls**, L.; Mortier, W.; Rieß, O.: Erkrankungen des Muskels – Dystrophia myotonica Curschmann – Steinert. Neurogenetik von O. Rieß, Springer-Verlag, 1998.
- (58) **Shaw**, D. J.; Chaudhary, S.; Rundl, S. A.; Crow, S.; Brook, J. D.; Harper, P. S.; Harley, H. G.:
A study of DNA methylation in myotonic dystrophie.
J. med. Genet. 30: 189-192, 1993.
- (59) **Shaw**, D. J.; Mc Currach, M.; Rundle, S. A.; Harley, H. G.; Crow, S. R.; Sohn, R.; Thirion, J. P.; Hamshere, M. G.; Buckler, A. J.; Harper, P. S.:
Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophie Locus. Genomics 18: 673-679, 1993.

- (60) **Smeets, H.**; Coerwinkel, M.; Hermens, R.; Brunner, H.; Schonk, D.; Ropers, H. H.; Wieringa, B.: Physical and genetic mapping of loci around the myotonic dystrophie (MD) mutation at 19q13.
(Abstract) Cytogenet. Cell. Genet. 51: 1081, 1989.
- (61) **Stevenson, W. G.**; Perloff, J. K. ;Weiss, J. N. :
Facioscapulohumeral muscular dystrophie : evidence for selective, enetic electrophysiologic cardiac involvement.
J. Amer. Coll. Cardiol. 15: 292-299,1990.
- (62) **Steinert, H.**:
Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwundes der Myotoniker. Dtsch. Z. Nervenheilkunde, 37: 58-104, 1909.
- (63) **Takeya, T. K.**; Hammano, K.; Kawashima, K.:
Facioscapulohumeral muscular dystrophie and hearing loss.
No To Hattatsu 22: 24-29, 1990.
- (64) **Tawil, R.**; Figlewicz, D. A.; Griggs, R. C.; Weiffenbach, B.; FSH Consortium:
Facioscapulohumeral dystrophie: a distinct regional myopathie with a novel molecular pathogenesis. Amm. Neurol. 43: 279-282,1998.
- (65) **Thornton, C. A.**; Griggs, R. C.; Moxley, R. T.:
Myotonic dystrophie with no trinucleotide repeat expansion.
Ann. Neorol. 35: 269-272, 1994.
- (66) **Thornton, C. A.**; Wymer, J. P.; Simmons, Z.; McClain, C.; Moxley, R. T.:
Expansion of myotonic dystrophie CTG repeat reduces expression of flanking DMAHP gene. Nature Genet. 16: 407-409, 1997.

- (67) **van der Ven**, P. F. M.; Jansen, G.; van Kuppevelt, T. H. M. S. M.; Perryman, M. B.; Lupa, M.; Dunne, P. W.; ter Laak, H. P.; Jap, P. H. K.; Veerkamp, J. H.; Epstein, H. F.; Eieringa, B.:
Myotonic dystrophie kinase is a component of neuromuscular junctions.
Hum. Molec. Genet. 2: 1889-1894, 1993.
- (68) **van Deutekom**, J. C. T.; Bakker, E.; Lemmers, R. J. L. F.; van der Wielen, M. J. R.; Bik, E.; Hofker, M. H.; Padberg, G. W.; Frants, R.R.:
Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counselling and etiology of FSHD1. Hum. Molec. Genet. 5: 1997-2003, 1996.
- (69) **Vaintsof**, M.; Passos-Bueno, M. R.; Canovas, M.:
The sarcoglycan-complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Hum. Mol. Genet. 5: 1963-1969, 1996.
- (70) **Vanier**, T. M.:
Dystrophia myotonica in childhood. Brit. Med. J. 2:1284-1288, 1960.
- (71) **Vitelli**, F.; Villanova, M.; Malandrini, A.; Bruttini, M.; Piccini, M.; Merlini, L.; Guazzi, G.; Renieri, A.:
Inheritance of a 38 kb-fragment in a apparently sporadic facioscapulohumeral muscular dystrophie:
Muscle Nerve 22: 1437-1441, 1999.
- (72) **Watkins**, S. C.; Swartz, D. R.; Byers, T. J.:
Localization of dystrophin in skeletal, cardiac and smooth muscle. In: Brown, S. C.; Lucy, J. A.; Dystrophin. Gene, protein and cell biology. Cambridge University, Cambridge: 79-104, 1997.

- (73) **Wijmenga, C.**; Frants, R. R. ; Brouwer, O. F. ; Moerer, P. ; Weber, J. L.; Padberg, G. W.:
Location of facioscapulohumeral muscular dystrophie gene on chromosom 4
Lancet 336: 651-653 , 1990.
- (74) **Wijmenga, C.**; Padberg, G. W.; Moerer, P.; Wiegant, J.; Liem, L.; Brouwer, O. F.; Milner, E. C. B.; Weber, J. I.; van Ommen; G. B.; Sandkuyf, L. A.; Frants, R. R.:
Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophie gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analyses and in situ hybridisation.
Genomics 9: 570-575, 1991.
- (75) **Winder, S. J.**; Knight, A. E.; Kendrick-Jones, J.:
Protein structure. In: Brown, S. C.; Lucy, J. A.; Dystrophin. Gene, protein and cell biology. Cambridge University, Cambridge: 27-55, 1997.
- (76) **Yasukohchi, S.**; Yagi, Y.; Akabane, D.; Terauchi, A.; Tamagawa, K.; Mizuno, Y.:
Facioscapulohumeral dystrophie assotiated with sensoineural hearing loss, tortuosity of retinal arteriols, and early onset and rapid progression of respiratory failure. Brain Dev. 10: 319-324, 1988.
- (77) **Zierz, S.**; Eger, K; Grimm, T.; Mortier, W.;
Facioscapulohumerale Muskeldystrophie. Neurologie in Praxis und Klinik von Hopf, H. C.; Diener, H. C.; Reichmann, H.,
Thieme Stuttgart: 559-562, 1999.

7. Abbildungsverzeichnis

- (1) Molekulare Strukturen der Muskelzellmembran:
Rieß, O.; Schöls, L.; Neurogenetik, Springer-Verlag, 1998.

- (2) Hochfrequente myotone Potentiale, nach Perkussion verschiedener Muskeln:
Mortier, W.; Muskel und Nervenerkrankungen im Kindesalter, Thieme-Verlag Stuttgart, 1994.

- (3) Korrelation der Repeat-Länge mit dem Schweregrad der klinischen Manifestation:
Groenen, P.; Wieringa, B.; Bio Essays 20: 901-912, 1998.

- (4) Hypothesen der molekularen Störungen bei myotoner Dystrophie:
Kress, W.; 2001

Die restlichen Abbildungen wurden selbst erstellt.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Christian Schmid
geboren am 28. Februar 1976
in Memmingen

Eltern: Günther Schmid
Irmgard Schmid, geb. Rest

Schule: 1982 – 1986 Theodor – Heuss – Grundschule,
Memmingen
1986 – 1995 Bernhard – Strigel – Gymnasium,
Memmingen

Wehr-/ Ersatzdienst: 1995 – 1996 Zivildienst, Rettungswache der Johanniter
Unfall – Hilfe e. V., in Kempten i. A.

Studium: 1997 – 2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians – Universität, Würzburg
1999 Physikum
2000 1. Staatsexamen
2003 2. Staatsexamen
2004 3. Staatsexamen

Würzburg, den 15. Juni 2004

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Mueller-Reible für die Überlassung des Themas, sowie für die Betreuung und Korrektur der Arbeit danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. T. Grimm für die Übernahme des Ko-Referates, Dr. W. Kress für die freundliche und geduldige Unterstützung bei der Labor- und Schreibearbeit und den netten MTAs des humangenetischen Labors von Herrn Prof. Dr. Mueller-Reible, die mir jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch Ihre Unterstützung das Medizinstudium ermöglicht haben