

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

**Schätzungen der männlichen und weiblichen Mutationsraten bei  
Duchennescher Muskeldystrophie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Miriam Krüger  
aus Nordhorn

Würzburg, Januar 2005

Referent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Dekan: Prof. Dr.med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2005

Die Promovendin ist Ärztin

**Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung, Ziel der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2. Duchennesche Muskeldystrophie</b>	<b>3</b>
2.1 Klinik und Verlauf	3
2.2 Diagnostik	4
<b>3. Genetik</b>	<b>5</b>
3.1 Erbgang	5
3.2 Mutations-Selektionsgleichgewicht / Neumutationsrate	6
<b>4. Verhältnis der Mutationsrate im männlichen und weiblichen Geschlecht</b>	<b>9</b>
4.1 Bedeutung	9
4.2 Schätzung des Verhältnisses mit Segregationsanalysen	9
4.3 Schätzung des Verhältnisse mit DNA-Analysen	12
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
5.1 Aufnahmekriterien	14
5.2 Verteilung der erfassten Daten	15
5.3 Erfassung der Familienverteilung	17
5.4 Beeinflussung durch autosomal-rezessive Fälle	18
<b>6. Schätzung des Verhältnisses <math>v / \mu</math></b>	<b>21</b>
6.1 Erläuterung der Methodik	21
<b>7. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>8. Diskussion</b>	<b>30</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>34</b>

## 1. Einleitung, Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung des Verhältnisses der männlichen und weiblichen Mutationsraten bei der Duchenneschen Muskeldystrophie (DMD), wobei jeweils zwischen Deletionen und Punktmutationen unterschieden wird.

Bei der Duchenneschen Muskeldystrophie handelt es sich um eine X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit. Es existiert derzeit keine kausale Therapie, die Patienten versterben meist im 2. Lebensjahrzehnt.

Heterozygote Frauen, die in der Regel phänotypisch gesund sind, kommen als Überträgerinnen der Krankheit in Frage.

Bislang gibt es keine absolut verlässlichen direkte Heterozygotentests, es können nicht alle Überträgerinnen identifiziert werden.

Stattdessen wird bei einer genetischen Beratung das Risiko einer Frau, Überträgerin zu sein, berechnet. Hierbei werden zunächst mit Hilfe des Familienstammbaums sowie weiteren Phänotypinformationen wie dem Creatinkinase-Wert (CK), Informationen erfasst.

Für die Berechnung sind dann die Neumutationsrate für DMD im Allgemeinen sowie das Verhältnis der männlichen ( $\nu$ ) und weiblichen ( $\mu$ ) Mutationsraten Grundlage ( $k = \nu / \mu$ ).

Die möglichst genaue Kenntnis des genannten Quotienten  $k$  ist daher wesentlich für die Ermittlung des Heterozygotenrisikos, um eine kompetente genetische Beratung dieser Frauen zu ermöglichen. Es galt ursprünglich die Annahme  $\nu = \mu$  und somit  $k = 1$ .

Für die Neumutationsrate galt nach Haldanes Regel von 1935 (1) für letale X-chromosomal vererbte Krankheiten zunächst der theoretische Wert von  $1/3 I$ , wobei  $I$  = Inzidenz der Fälle.

Mit der Einführung biochemischer Methoden zur Heterozygotenbestimmung wurde bald die Hypothese laut, dass die Neumutationsrate niedriger als der nach Haldanes Arbeit erwartete Wert von  $1/3 I$  liege (Roses et al.1977 (2), Pickard et al.1978 (3), Bucher et al.1980 (4), Lane et al.1983 (5) ). Es folgten weitere Arbeiten mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen.

1990 gelang Barbujani et al. der Nachweis einer signifikanten Abweichung von dem erwarteten Wert von 0,333, der errechnete Wert lag bei 0,229. Neben dem Einfluss vorhandener Keimzellmosaike gaben sie auch die Ungleichheit der männlichen und weiblichen Mutationsraten als eine mögliche Erklärung an. **(6)**

Es folgten somit Studien zur Berechnung von  $k$ , die auch nach den verschiedenen Mutationstypen (Deletionen, Punktmutationen) unterschieden.

So erhielten Grimm et al. in ihrer 1994 durchgeführten Studie unter der Berücksichtigung des Vorhandenseins von autosomal-rezessiven Fällen Werte von  $k = 0,3$  (95% Vertrauensbereich 0 - 2,9) für Deletionen,  $k = 40,3$  (95% Vertrauensbereich 2,0 -  $\infty$ ) für Punktmutationen und  $k = 2,4$  (95% Vertrauensbereich 0,5 - 18,9) für die Gesamtzahl der Fälle. **(7)**

Es ließ sich also bereits absehen, dass Deletionen vorwiegend in der Oogenese und Punktmutationen vorwiegend in der Spermatogenese entstehen. Diese Tendenz bestätigten auch die Arbeiten von Sinha et alii 1996 **(8)**, Alcantara et alii 1999 **(9)** sowie Mukherjee et alii 2003 **(10)**.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine erneute Schätzung des Verhältnisses der männlichen und weiblichen Mutationsraten ( $k$ ), ebenfalls unterschieden für Deletionen und Punktmutationen. Im Vordergrund steht hierbei die erneute Durchführung bereits in der Vergangenheit erfolgter Berechnungen anhand nun vorliegender größerer und somit aussagekräftigerer Datenkollektive.

Vor der Erläuterung der durchgeführten Berechnungen wird zunächst auf das Krankheitsbild der Duchenneschen Muskeldystrophie und auf ihre genetischen Grundlagen eingegangen.

## **2. Duchennesche Muskeldystrophie**

### **2.1. Klinik und Verlauf**

Die Duchennesche Muskeldystrophie ist die häufigste vererbte letale Krankheit beim Menschen **(11)**. Es liegen hierbei Mutationen im Dystrophin-Gen vor, die zu einer fehlenden Dystrophinsynthese führen. Hierdurch kommt es zu einer progredient verlaufenden Muskelschwäche.

Durch den X-chromosomalen rezessiven Erbgang erkranken fast ausschließlich Jungen. Es kommt oft bereits im dritten Lebensjahr zu ersten Symptomen, wobei eine verzögerte motorische Entwicklung sowie Paresen der Beckengürtelmuskeln im Vordergrund stehen.

Charakteristisch sind das so genannte „Gowers-Manöver“ (beim Aufstehen Aufstützen der Hände zunächst an den Unter-, dann an den Oberschenkeln), der typische „Watschelgang“ sowie die „Gnomenwaden“, bei denen es sich um eine Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur handelt.

Weitere klinische Merkmale sind eine Hyperlordosierung der Wirbelsäule, Spitzfüße und Minderwuchs.

Später kommt es auch zu einer Beteiligung der Muskeln von Rumpf, Beinen, Schultern und Armen, was zum Zeichen der Scapulae alatae führt.

Die Patienten sind meist im Alter von 10 Jahren rollstuhlpflichtig. **(11)**

Im weiteren Verlauf kommt es zu Beugekontrakturen sowie zu einer progredienten Skoliose. Die durch die ebenfalls betroffene Atemmuskulatur bereits herabgesetzte Vitalkapazität wird hierdurch weiter vermindert. Weitere mögliche Symptome sind eine Kardiomyopathie sowie geringe geistige Retardierungen

Die Patienten sterben oftmals bereits vor Vollendung des 20. Lebensalters **(11)**, meist an pulmonalen Komplikationen.

Grundsätzlich besteht Fortpflanzungsfähigkeit, erkrankte Männer versterben jedoch fast immer, bevor sie Nachkommen zeugen.

Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich. Die Maßnahmen beschränken sich damit auf symptomatische Behandlungen in Form von Krankengymnastik, kontrakturlösenden Eingriffen, dem Einsatz von Kortikosteroiden im Frühstadium sowie der Therapie von Komplikationen.

Bei heterozygoten Frauen kommt es im Allgemeinen nicht zu klinischen Auffälligkeiten, sie kommen allerdings als Überträgerinnen der Erkrankung in Frage. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Prävention im Sinne einer Beratung von eventuellen Konduktorinnen bei Schwangerschaftsfragen.

## **2.2. Diagnostik**

Erster Schritt für die Diagnostik liefert im Allgemeinen die Anamnese. Außerdem hinweisend sind eine erhöhte Creatinkinase, die erhöhte Echogenität im Myosonogramm und myogene EMG-Veränderungen. Der endgültige Nachweis der Diagnose ist möglich über eine Muskelbiopsie, das immunhistologisch nachweisbare Fehlen von Dystrophin sowie über die Molekulargenetik.

### 3. Genetik

#### 3.1. Erbgang

Die Duchennesche Muskeldystrophie hat eine Inzidenz von 1/3.500 männlichen Lebendgeborenen und ist damit eine der häufigsten bekannten schweren Erbkrankheiten.

(12)

Erstmals wurde sie klinisch bereits im 19. Jahrhundert beschrieben (Duchenne, 1868 ; Gowers, 1879). Schon hierbei fiel Gowers auf, dass lediglich Jungen erkranken und klinisch gesunde Frauen die Krankheit an ihre Söhne vererben (12), was die Vermutung einer geschlechtsgebundenen Vererbung nahe brachte.

Für die benigne Variante der Muskeldystrophie, der Beckerschen Muskeldystrophie (BMD), fanden Becker und Kiener 1955 heraus, dass es sich hierbei um einen X-chromosomal-rezessiven Erbgang handelt.

1983/84 gelangen Kingston et al. der Nachweis, dass BMD und DMD durch Mutationen an derselben Stelle des X-Chromosoms verursacht werden. (12)

Auch die Duchennesche Muskeldystrophie wird somit X-chromosomal-rezessiv vererbt. Das bedeutet, dass Jungen, die das betroffene Gen von ihrer Mutter vererbt bekommen, zu hundert Prozent manifest erkranken, da sie nur ein X-Chromosom besitzen.

Mädchen, an die das Gen vererbt wird, die also heterozygot sind, erkranken in der Regel selbst nicht, werden aber zu Überträgerinnen. Diese Konduktorinnen übertragen wiederum das verursachende Gen an 50% ihrer Söhne, die manifest erkranken und an 50% ihrer Töchter, die somit heterozygot werden.

Das DMD-Gen umfasst etwa 2,3 Millionen Basenpaare und ist somit das größte bekannte menschliche Gen. Es kodiert für eine 14 kb große mRNA, aus der als Genprodukt das Protein Dystrophin hervorgeht. (13,14)

### 3.2. Mutations-Selektionsgleichgewicht / Neumutationsrate

Mit dem Begriff Mutationsrate wird die Zahl der Neumutationen pro Genort und Generation beschrieben.

Da bei der Duchenneschen Muskeldystrophie die Patienten fast ausnahmslos versterben, bevor sie Nachkommen zeugen, ist die reproduktive Fitness, also der Beitrag der Individuen ihre Anlagen in den Gen-Pool der nächsten Generation einzubringen, praktisch Null. Die Häufigkeit des DMD-Gens müsste somit nach und nach immer weiter abnehmen, dieses wird jedoch durch die Neumutationen ausgeglichen, wie Haldane zeigte (1). Selektion und Mutation befinden sich also im Gleichgewicht.

Unter der Annahme, dass die Mutationsraten für männliche und weibliche Keimzellen gleich hoch sind, gilt nach Haldanes Formel für die indirekte Schätzung von Mutationsraten in letalen X-chromosomalen Krankheiten:

$$U = 1/3 (1-f) I$$

wobei  $U$  = kombinierte Mutationsrate =  $2\mu + v$  für weibliche und männliche Keimzellen  
 $f$  = effektive Fertilität der Erkrankten

$I$  = Inzidenz (Anzahl Neuerkrankungen in einem Kollektiv oder einer Population während einer bestimmten Zeit) (11)

Bei DMD beträgt die effektive Fertilität Null, so dass sich ergibt:

$$U = 1/3 I$$

Bei Annahme gleicher Mutationsraten für männliche und weibliche Keimzellen würde man also erwarten, dass ein Drittel aller DMD-Patienten Neumutationen sind.

An dieser Stelle sei jedoch zu erwähnen, dass Haldane bereits 1956 selbst darauf hinwies, dass die Mutationsraten wahrscheinlich nicht gleich groß seien, sondern dass die männliche Mutationsrate  $v$  größer zu sein scheint als die weibliche Mutationsrate  $\mu$ . (15)

Durch die Ausarbeitung verschiedener Studien hat sich für die Duchennesche Muskeldystrophie ein durchschnittlicher Wert von  $U=7,1 \times 10^{-5}$  herausgestellt (11) (Abweichungen von  $4,0 \times 10^{-5}$  bis  $10,9 \times 10^{-5}$ , siehe Tabelle 1).

### **Tabelle 1**

Schätzung der Mutationsraten für DMD pro Gen und Generation anhand Haldanes Formel

$$(U = 1/3 (1-f) I) \quad (11)$$

Mutationsrate (x 10 <sup>-5</sup> )	Region / Land	Bezug
9,5	Utah, USA	Stephens und Tyler (1951)
4,3	Northumberland, Durham, GB	Walton (1955)
4,0	Südbaden, BRD	Becker und Lenz (1955, 1956)
6,0	Nordirland	Stevenson (1958)
4,7	Leeds, GB	Blith und Pugh (1959)
8,9	Wisconsin, USA	Morton und Chung (1959)
7,3	Bern, Schweiz	Moser et al. (1964)
6,5	Fukuoko, Japan	Kuroiwa und Miyazaki (1967)
10,9	Northern Area, GB	Gardner-Medwin (1970)
4,6	Polen	Prot (1971)
8,8	Süd-Ost-Schottland	Brooks und Emery (1977)
7,2	Japan	Yasuda und Kondo (1980)
9,4	Italien	Danieli et al. (1978)
6,2	Australien	Cowan et al. (1980)
8,7	Alberta, Kanada	Williams et al. (1983)

Damit hat DMD eine sehr hohe Mutationsrate, deutlich höher als bei anderen vererbaren Krankheiten. Zum Vergleich beträgt beispielsweise die Mutationsrate der Hämophilien  $2,2-3,2 \times 10^{-5}$  und ist damit nur halb so groß. (16)

Eine direktere Methode zur Bestimmung der Mutationsrate wurde von Gardner-Medwin (1970) angewandt. Hierbei wurde die Anzahl der durch Neumutation Erkrankten in einem bestimmten Zeitraum auf die Anzahl aller Geburten in diesem Zeitraum bezogen.

Es galt folgende Formel:

$U = (JXR)/T$ , mit:

U= Mutationsrate

J = Anzahl der ermittelten isolierten Fälle, Patienten über 5 Jahre alt

R = Anteil der isolierten Fälle, bei denen die Mutter nicht Überträgerin war

T = Anzahl der männlichen Geborenen, die in derselben Zeitspanne wie J geboren wurden

und:

$R = 1 - i/d$

wobei: i = Anteil der Mütter isolierter Fälle mit einer CK-Erhöhung

d = Anteil von definitiven Genträgern mit einer CK-Erhöhung

Bei isolierten Fällen handelte es sich um diejenigen Patienten, in deren Familie kein weiterer Fall von DMD existierte.

Bei dieser Methode ergab sich ein Wert von  $10,5 \times 10^{-5}$ , im Vergleich dazu lag der von Gardner-Medwin nach der Haldane-Formel errechnete Wert bei  $10,9 \times 10^{-5}$ . (11)

## 4. Verhältnis der Mutationsrate im männlichen und weiblichen Geschlecht

### 4.1. Bedeutung

Um bei einer genetischen Beratung eine korrekte Risikoberechnung durchzuführen, ist nicht nur die Kenntnis der Gesamtmutationsrate, sondern auch des Verhältnisses der Mutationsraten in weiblichen ( $\mu$ ) und männlichen Keimzellen ( $\nu$ ) wesentlich.

Wäre nämlich die Mutationsrate in männlichen Keimzellen deutlich höher, wäre die tatsächliche Zahl von Neumutationen bei den isolierten Fällen viel geringer als angenommen.

Dieses würde bedeuten, dass der Großteil der Mütter von isolierten Fällen als Überträgerinnen mit einem dementsprechend hohen genetischen Risiko angesehen werden müssten. (11)

Die Schätzung dieses Verhältnisses war bereits Bestandteil vieler Studien. Die meisten dieser Studien griffen hierbei auf klassische Segregationsanalysen zurück, verwendeten also keine Informationen über mit der Krankheit verbundene DNA-Marker.

### 4.2. Schätzung des Verhältnisses mit Segregationsanalysen

Der Anteil der Patienten an den isolierten Fällen, bei denen der Gendefekt durch eine Mutation in der mütterlichen Keimzelle entstanden ist, wird im Folgenden mit  $x$  bezeichnet.

Dieser umfasst also die tatsächlichen Neumutationen, in denen die Mutter des Patienten keine Konduktorin ist.

Um diesen mit Hilfe von Segregationsanalysen zu bestimmen gibt es zwei Ansätze, die auch miteinander kombiniert werden können.

#### 1. Segregationsanalysen ohne Heterozygotentests:

Der erste ist nach Haldane (1956) auf folgender Gleichung aufgebaut:  $x = \mu / (2\mu + \nu)$ , wobei  $\mu$  und  $\nu$  die einzelnen Mutationsraten in weiblichen und männlichen Keimzellen sind.

Verschiedene Segregationsanalysen (Haldane 1956 ; Morton 1958 ; Cheeseman et al. 1958 ; Smith and Kilpatrick 1958) ergaben im allgemeinen Werte, die recht nah an dem bei  $\mu \sim \nu$  erwarteten Wert von 0,33 lagen.

Stärkere Abweichungen gab es lediglich in zwei Studien aus den USA (Lane et al.1983 ; Bucher et al.1980) und in einer Arbeit aus Italien (Danieli et al.1980) (siehe Tabelle 2).

(11)

## **Tabelle 2**

Schätzung des Neumutationsanteils  $x$  bei Patienten mit DMD anhand verschiedener Segregationsanalysen (11)

Autoren	Methode	$x \pm SE$
Cheeseman et al. (1958)	Haldane (A)	$0,510 \pm 0,079^a$
		$0,523 \pm 0,097^b$
	Cheeseman (B)	$0,394 \pm 0,157^a$
		$0,375 \pm 0,195^b$
	Cheeseman (C)	$0,343 \pm 0,141^a$
		$0,399 \pm 0,186^b$
Smith und Kilpatrick (1958)	Maximale Wahrscheinlichkeit	$0,320 \pm 0,145^a$
		$0,394 \pm 0,173^b$
Morton und Chung (1959)	Morton	$0,35 \pm 0,05$
Danieli et al. (1980)	Haldane	$0,293 \pm 0,067$
	Cheeseman (B)	$0,224 \pm 0,085$
	Cheeseman (C)	$0,195 \pm 0,072$
Davie und Emery (1978)	Morton	$0,355 \pm 0,050$
	Geschlechtsverhältnis von Geschwistern von isolierten Fällen	$0,32 \pm 0,12$
Lane et al. (1983)	Cheeseman (B)	$0,127 \pm 0,111$
Yasuda und Kondo (1980)	Maximale Wahrscheinlichkeit	$0,291 \pm 0,046$
Bucher et al. (1980)	Geschlechtsverhältnis von Geschwistern von isolierten Fällen	$0,23 \pm 0,2$
		Segregationsanalyse
Williams et al. (1983)	Segregationsanalyse	$0,274 \pm 0,085^c$
		$0,336 \pm 0,090^d$

<sup>a</sup> Daten aus Nordirland (Stevenson 1958)

<sup>b</sup> Daten aus Utah (Stephens and Tyler 1951)

<sup>c</sup> angenommen, dass  $\pi = 0,95$  (Erfassungswahrscheinlichkeit)

<sup>d</sup> angenommen, dass  $\pi = 0,7$

## 2. Segregationsanalysen mit Heterozygotentests:

Der zweite Ansatz zur Bestimmung von  $x$  stützt sich auf die Ergebnisse von Heterozygotentests.

Viele Studien stimmen mit dem Wert von 0,33 überein (Gardner-Medwin, Caskey et al., Zatz et al., Moser). Vor allem bei Studien, die nicht die CK-Bestimmung oder eine Kombination verschiedener Methoden benutzten, kam es zu abweichenden Werten (Pickard, Bucher) (siehe Tabelle 3). (11)

**Tabelle 3** Schätzung von  $x$  bei Patienten mit DMD anhand von Heterozygotentests (11)

Autoren	Heterozygotentest	$x \pm SE$
Caskey et al. (1980)	CK	$\sim 0,328 \pm 0,062$
Gardner-Medwin (1970)	CK	$0,320 \pm 0,053$
Zatz et al. (1976)	CK	$0,313 \pm 0,039$
Danieli et al. (1977)	CK	$0,250 \pm 0,043$
Moser (1971, 1977)	CK	$0,323 \pm 0,059$
Roses et al. (1977)	CK	$0,330 \pm 0,069$ $0,049 \pm 0,034^a$
Pickard et al. (1978)	Lymphocyte capping	$0,280 \pm 0,090$ $0,133 \pm 0,067^b$
Bucher et al. (1980)	Polyribosomale Proteinsynthese	$0,166 \pm 0,050$

<sup>a</sup> CK, LDH-5 Isoenzym und Heterozygotentest bei weiteren weiblichen Verwandten

<sup>b</sup> Heterozygotentest bei weiteren weiblichen Verwandten

Sowohl Moser als auch Yasuda (11,17) schlossen aus den Ergebnissen dieser Auswertungen, dass die Mutationsraten in weiblichen und männlichen Keimzellen gleich hoch seien, es also keinen Geschlechtsunterschied bei den Mutationsraten gebe.

Moser wies jedoch auch darauf hin, dass dieses im Vergleich mit anderen geschlechtsgebunden vererbaren Krankheiten außergewöhnlich sei. So wurden für die Hämophilie A oder das Lesch-Nyhan-Syndrom bereits durch Untersuchungen festgestellt, dass der Großteil der Mutationen bei der Spermatogenese auftritt.

Vor diesem Hintergrund gewinnen die Ansätze zur Bestimmung des Verhältnisses von  $\mu/v$  mit Hilfe von DNA-Analysen eine große Rolle.

### **4.3. Schätzung des Verhältnisses von weiblichen und männlichen Mutationsraten mit Hilfe von DNA-Analysen**

#### Molekularbiologische Grundlagen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich, individuelle Unterschiede innerhalb des Genoms nachzuweisen. Restriktionsendonukleasen setzen an spezifischen Nukleotidsequenzen der DNA an und spalten sie dort **(18)**. Sie schneiden also immer nach der gleichen Basenfolge und können bei genetischer Veränderung durch Deletion oder Substitution einer oder mehrerer Basen nicht mehr an derselben Stelle schneiden. So kommt es innerhalb einer Population zu Fragmenten unterschiedlicher Länge, so genannten Restriktionslängenpolymorphismen (RFLPs) **(19)**. Diese RFLPs können labortechnisch mittels radioaktiv markierter DNA-Sonden nach dem Verfahren der Southern-Hybridisierung dargestellt werden **(20)**.

Bei diesen Mutationen handelt es sich um solche, die keine phänotypischen Auswirkungen haben, so dass sie keinen Selektionsdruck ausüben und die RFLPs sich somit gleichmäßig in der Bevölkerung ausbreiten. Sie werden als Mendelsches Merkmal mit kodominantem Erbgang weitergegeben, wobei die Allele den verschiedenen Fragmentgrößen entsprechen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es möglich, RFLPs als genetische Marker für Kopplungsanalysen einzusetzen. **(21)**

#### Anwendung

Nach der Klärung der Lokalisation des DMD-Gens auf Xp21 konnten sowohl eng benachbarte als auch innerhalb des Gens liegende RFLPs mit spezifischen DNA-Sonden dargestellt werden. Somit wurde auch für DMD der Gebrauch von RFLPs wesentlich

und eine indirekte Genotypdiagnostik per Kopplungsanalyse ermöglicht. Hierbei findet eine Untersuchung der Familie des Patienten mittels aussagekräftiger RFLPs statt, die es einem ermöglicht, das defekte X-Chromosom zu identifizieren. Somit kann der X-chromosomale Haplotyp innerhalb einer Familie nachvollzogen werden.

Ein Nachteil bei der Verwendung von RFLPs ist allerdings, dass die meisten RFLPs nur zwei Allele aufweisen und der Informationsgehalt somit doch eher gering ist.

Aus diesen Gründen wird die Anwendung von RFLPs heutzutage von Untersuchungen mit so genannten Mikrosatelliten ergänzt und teilweise ersetzt.

Bei entsprechender Untersuchung von drei Generationen innerhalb einer Familie kann der Ursprung des X-Chromosoms eines jeden Patienten auf seine Großeltern zurückverfolgt werden.

Bei Auswertung eines größeren Patientenkollektivs kann so anhand des Anteils der Patienten, die das X-Chromosom des mütterlichen Großvaters geerbt haben, das Verhältnis von weiblichen und männlichen Mutationsraten errechnet werden. (22)

Diese Methode ist weniger anfällig für Störungen als die oben genannten Bestimmungen über Segregationsanalysen oder Heterozygotentests.

Der Vorteil liegt darin, dass nicht nur Familien isolierter Fälle verwendet werden dürfen und dass das Ergebnis nicht durch die Anzahl betroffener Brüder beeinflusst wird.

Außerdem werden hierbei keinerlei Informationen über den Überträger-Status der Mutter des Patienten benötigt.

Eine Bedingung, die allerdings erfüllt werden muss, ist die Möglichkeit von DNA-Analysen beim Patienten, bei seiner Mutter und bei den mütterlichen Großeltern (22).

Karel et al. (23) sowie Müller und Grimm (22) führten erste Berechnungen des Verhältnisses mit Hilfe von DNA-Markern durch.

Sie wiesen jedoch darauf hin, dass für eine endgültige Widerlegung der Nullhypothese von gleichen Mutationsraten bei beiden Geschlechtern eine sehr große Stichprobengröße notwendig sei. In einem kommentierenden Artikel von Krüger 1987 wurde die Anzahl der notwendigen Familien, um die Hypothese  $\mu = \nu$  mit einem 95%igen Signifikanzlevel zu widerlegen, auf 268 festgelegt (24).

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Aufnahmekriterien

Die vorliegende Studie stützt sich auf die 1994 von Grimm et al. durchgeführten Untersuchungen (7).

Die Daten wurden im Institut für Humangenetik, Universität Würzburg gesammelt.

Um in die Studie aufgenommen zu werden, galten folgende Einschlusskriterien:

1. Beim Index-Patient musste eine definitive DMD-Diagnose gestellt worden sein.

Die Diagnose wurde anhand von klinischer Untersuchung, Muskelbiopsie und Serum-Creatinkinase (CK) gestellt.

2. Die Familien waren mit der Fragestellung von Überträger- oder Pränatal-Diagnosen zur Untersuchung gekommen

3. Eine Blutprobe des Patienten musste für ein Deletionscreening vorhanden sein.

4. Blutproben von der Mutter und von beiden mütterlichen Großeltern mussten vorhanden sein, oder der fehlende Haplotyp musste eindeutig anhand der Daten von Mutter und einem der Großeltern rekonstruierbar sein

Es wurden keine weiteren Familieninformationen verwendet, um eine Bias zu familiär gehäuften Fällen zu vermeiden.

Intragenische Rekombinationen in Familien wurden ausgeschlossen. Eine Korrektur durch eine dadurch entstandene Neigung wurde wie in Kapitel 6.1 beschrieben nach der von Müller et al. erklärten Vorgehensweise durchgeführt. (25)

Es war außerdem notwendig, dass die Mutter für mindestens einen Genmarker heterozygot war, da sonst keine eindeutige Feststellung möglich war, welches ihrer X-Chromosomen von ihrem Vater stammt.

War durch ein Crossing-Over im DMD-Gen eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, wurden diese Familien ebenfalls von der Studie ausgeschlossen.

Der großelterliche Ursprung des mutierten Haplotyps konnte in 242 Fällen bestimmt werden, so dass diese Fälle als informativ für die Studie galten.

## 5.2. Verteilung der erfassten Daten

Die Verteilung der großmütterlichen und großväterlichen Haplotypen bei den verschiedenen Mutationstypen (Deletion, Duplikation, Punktmutation) ist in Tabelle 4 wiedergegeben, wobei noch eine Unterteilung in sporadische Fälle (A), Fälle, in denen ein Geschwisterkind des Patienten ebenfalls mitbetroffen ist (Geschwisterfälle) (B) und Fälle, in denen weitere Fälle in der Verwandtschaft auftraten (Familienfälle) (C), erfolgte.

**Tabelle 4** Verteilung der Familien

	Gesamt	Deletion	Punktmutation	Duplikation
(A): Sporadische Fälle	166	80	82	4
GMH	102	56	44	2
GPH	64	24	38	2
(B): Geschwisterfälle	23	12	9	2
GMH	13	10	2	1
GPH	10	2	7	1
(C): Familienfälle	53	26	27	0
GMH	52	26	26	0
GPH	1(KZM)	0	1(KZM)	0
Alle Familien	242	118	118	6
GMH	167	92	72	3
GPH	75	26	46	3

GMH = großmütterlicher Haplotyp

GPH = großväterlicher Haplotyp

KZM = Keimzellmosaik

In die Rubrik „Punktmutation“ gingen neben den eigentlichen Punktmutationen auch die Fälle ein, in denen kleine Deletionen oder kleine Duplikationen vorlagen, die also nicht beim Deletionsscreening erfasst werden konnten.

Das Deletionsscreening erfolgte nach Standardmethoden. (13)

Die Haplotypenanalyse wurde mit insgesamt 15 DNA-Markern durchgeführt, die teilweise innerhalb oder nahe an den Enden des Gens lagen.

Rekombinante Haplotypen wurden ausgeschlossen und die dadurch entstandene Neigung wie in Kapitel 6.1 beschrieben korrigiert. (Müller et al., 25)

Betrachtet man nun die Verteilung der großväterlichen und großmütterlichen Haplotypen im Hinblick auf Unterschiede zwischen den Deletionen und Punktmutationen, so ergibt sich folgende Vierfeldertafel:

	Deletionen	Punktmutationen	Summe
GMH	92,00	72,00	164,00
GPH	26,00	46,00	72,00
Summe	118,00	118,00	236,00

Der dazugehörige Chi-Quadrat-Wert beträgt 7,9946,  $p = 0,0047$ , somit ist  $p < 0,02$ . Wir erkennen also bereits an dieser Stelle einen signifikanten Unterschied in der Verteilung zwischen Deletionen und Punktmutationen.

### 5.3. Erfassung der Familienverteilung

Wie bereits erwähnt, war eine Überträger- oder eine Pränataldiagnose oder deren Kombination eins der Aufnahmekriterien. Hierdurch wurde zwar einer Favorisierung von durch Deletionscreening erfassten Fällen entgegengewirkt, unter Umständen kann hieraus jedoch eine Neigung zu einer bestimmten Familienkonfiguration entstehen.

In einer 1992 in den Niederlanden durchgeführten Studie (26) ergab sich eine Verteilung von 62% sporadischen Fällen, 16% Geschwisterfällen und 22% Familienfällen. In der vorliegenden Auswertung handelt es sich in 69% um sporadische Fälle, in 9% um Geschwisterfälle und in 22% um Familienfälle.

Ein statistischer Vergleich der Konfigurationsverteilung ergibt somit die in Tabelle 5 wiedergegebenen Werte.

**Tabelle 5**

Vergleich der Familienverteilung

	Sporadische Fälle	Geschwisterfälle	Familienfälle	
Erhaltene Werte (vorliegende Arbeit)	166	23	53	
Erwartete Werte (Studie aus den Niederlanden)	150,04	38,72	53,24	
Chi-Quadrat	1,698	6,382	0,001	Summe: 8,081

Hierdurch ergibt sich ein p-Wert von 0,0176. Es ist also  $p < 0,02$ , so dass sich die Werte signifikant von denen der niederländischen Studie unterscheiden. Wir müssen dementsprechend eine Korrektur der Daten durchführen. Die nach dieser Korrektur erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Wie Grimm et al. durch ihre Arbeiten 1990 (27) und 1994 (7) zeigen konnten, werden die Ergebnisse durch das eventuelle Vorhandensein von Keimzellmosaiken nicht weiter gestört.

#### 5.4. Beeinflussung durch autosomal-rezessive Fälle

Ein weiteres Problem, das allerdings berücksichtigt werden muss, ist das Vorhandensein von autosomal-rezessiven Phänokopien innerhalb unserer Daten. Als Beispiel hierfür gilt die Duchenne-ähnliche autosomal rezessive Muskeldystrophie, MIM 253700, deren Häufigkeit als ein Zwanzigstel der Häufigkeit von DMD geschätzt wird. (28,29)

Diese autosomal-rezessiven Fälle werden in unserer Studie lediglich in den Fällen erwartet, in denen keine Mutation im DMD-Gen nachgewiesen wurde und bei denen keine typisch X-chromosomale Familiengeschichte vorliegt. Unter der Annahme, dass bei 5% aller Fälle mit der klinischen Diagnose DMD tatsächlich autosomal-rezessive Phänokopien vorliegen, ergibt sich bei einer Gesamtzahl von 242 Fällen mit Deletionen, Duplikationen und angenommenen Punktmutationen insgesamt:

$$0,05 * 242 = 12,1$$

Diese Fälle können sich nur in den Gruppen der sporadischen Fälle mit angenommener Punktmutation und der Geschwisterfälle mit angenommener Punktmutation befinden.

Da diese laut Tabelle 4 gemeinsam 91 von 242 Fällen umfassen, erhalten wir:

$$12,1 / 91 = 0,132967$$

Wir können den Anteil dieser Phänokopien in den beiden Gruppen also auf ungefähr 13 % schätzen.

Die Anwesenheit von autosomal-rezessiven Phänokopien führt dazu, dass  $k$  überschätzt wird. Daher sollte diesem durch eine Korrektur in den Fällen, in denen keine Strukturanomalie im DMD-Gen nachweisbar ist, entgegengewirkt werden.

Um einen korrekten Wert für  $k$  zu erhalten, müssen wir also entsprechend 13% abziehen.

Die vor dieser Korrektur erhaltenen Daten sind in Tabelle 6A, die Daten nach der Korrektur in 6B wiedergegeben.

**Tabelle 6A**

Verteilung der großmütterlichen und großväterlichen Haplotypen bei Patienten mit Deletionen und Punktmutationen vor der Korrektur wegen autosomal-rezessiver Phänotypen

		Alle	Alle ohne Duplikation	Deletion	Punktmutation	Duplikation
Sporadische Fälle	GMH	102	100	56	44	2
	GPH	64	62	24	38	2
	Alle	166	162	80	82	4
Geschwisterfälle	GMH	13	12	10	2	1
	GPH	10	9	2	7	1
	Alle	23	21	12	9	2
Familienfälle	GMH	52	52	26	26	0
	GPH	1 (KZM)	1	0	1	0
	Alle	53	53	26	27	0
Alle	GMH	167	164	92	72	3
	GPH	75	72	26	46	3
	Alle	242	236	118	118	6

**Tabelle 6B**

Verteilung der großmütterlichen und großväterlichen Haplotypen bei Patienten mit Deletionen und Punktmutationen nach der Korrektur wegen autosomal-rezessiver Phänotypen

(-13,2967033% in den entsprechenden Gruppen)

		Alle	Alle ohne Duplikation	Deletion	Punktmutation	Duplikation
Sporadische Fälle	GMH	96,14	94,14	56	38,14	2
	GPH	58,95	56,95	24	32,95	2
	Alle	155,09	151,09	80	71,09	4
Geschwisterfälle	GMH	12,73	11,73	10	1,73	1
	GPH	9,07	8,07	2	6,07	1
	Alle	21,80	19,80	12	7,80	2
Familienfälle	GMH	52	52	26	26	0
	GPH	1	1	0	1	0
	Alle	53	53	26	27	0
Alle	GMH	160,88	156,88	92	65,88	3
	GPH	69,02	66,02	26	40,02	3
	Alle	229,9	223,9	118	105,9	6

## 6. Schätzung des Verhältnisses $v / \mu$

Als nächster Schritt erfolgte die Schätzung des Verhältnisses der weiblichen und männlichen Mutationsraten, im folgenden  $k$  genannt, sowohl für Deletionen als auch für Punktmutationen.

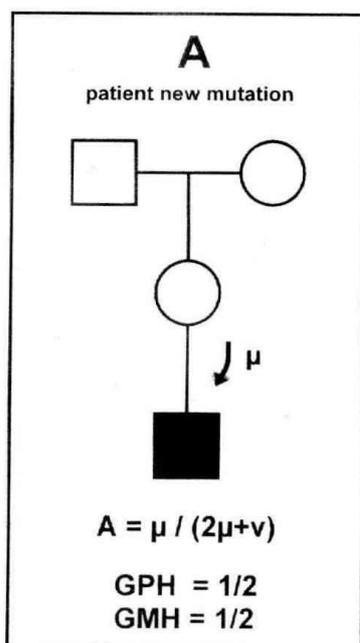
Die Schätzung wurde nach der indirekten Methode von Müller und Grimm (22) mit der von Müller et al. eingeführten und beschriebenen Korrektur (25) durchgeführt.

### 6.1. Erläuterung der Methodik

Die Berechnungen stützen sich auf folgende Grundlagen (7):

Die Mutation, die bei einem DMD-Patienten vorliegt, kann durch folgende Möglichkeiten entstanden sein:

#### A. Neumutation beim Patienten selber:



Mit einer Wahrscheinlichkeit der weiblichen Mutationsrate  $\mu$  auf dem großväterlichen X-Chromosom und mit derselben Wahrscheinlichkeit auf dem großmütterlichen X-Chromosom:

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

$$GPH = 1/2 ; GMH = 1/2$$

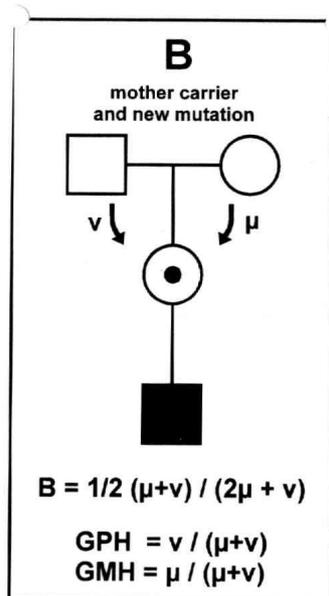
wobei:

GPH = Wahrscheinlichkeit, dass der großväterliche Haplotyp vorliegt,

GMH = Wahrscheinlichkeit, dass der großmütterliche Haplotyp vorliegt,

A = Häufigkeit des Typs in der Bevölkerung

**B. Neumutation bei der Mutter des Patienten, die somit Überträgerin ist:**

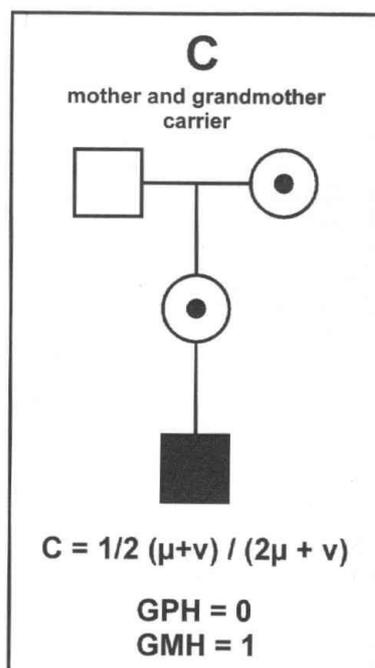


Mit der Wahrscheinlichkeit der männlichen Mutationsrate  $v$  auf dem großväterlichen X-Chromosom oder mit der Wahrscheinlichkeit  $\mu$  auf dem großmütterlichen X-Chromosom:

$$B = 1/2 (\mu + v) / (2\mu + v)$$

$$GPH = v / (\mu + v) ; GMH = \mu / (\mu + v)$$

**C. Die Großmutter ist bereits Überträgerin:**



$$C = 1/2 (\mu + v) / (2\mu + v)$$

$$GPH = 0 ; GMH = 1$$

Die 3 Möglichkeiten lassen sich zusammenfassen zu:

$$\text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) = 1/2 A + v / (\mu + v) B + 0 C$$

Einsetzen ergibt:

$$\begin{aligned} \text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) &= 1/2 [\mu / (2\mu + v)] + [v / (\mu + v)] [1/2 (\mu + v) / (2\mu + v)] \\ &= \mu / (4\mu + 2v) + v / (4\mu + 2v) \\ &= (\mu + v) / (4\mu + 2v) \end{aligned}$$

Für  $k$ , das Verhältnis der weiblichen und männlichen Mutationsraten, gilt:

$$k = v / \mu, \text{ somit } v = k \mu$$

Einsetzen ergibt:

$$\begin{aligned} \text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) &= \mu + k \mu / 4 \mu + 2 k \mu \\ &= (1+k) / (4+2k) \end{aligned}$$

$$\text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) + \text{GMH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) = 1 ,$$

somit gilt entsprechend:

$$\begin{aligned} \text{GMH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) &= 1 - \text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH}) \\ &= 1 - (1+k) / (4+2k) \\ &= (4+2k) / (4+2k) - (1+k) / (4+2k) \\ &= (3+k) / (4+2k) \end{aligned}$$

Dividieren der beiden Gleichungen ergibt:

$$[\text{GPH} / (\text{GPH} + \text{GMH})] / [\text{GMH} / (\text{GPH} + \text{GMH})] = [(1+k) / (4+2k)] / [(3+k) / (4+2k)]$$

$$\text{Somit: } \text{GPH} / \text{GMH} = (1+k) / (3+k)$$

Durch Umformung erhalten wir:

$$(3+k) \text{ GPH} = (1+k) \text{ GMH}$$

$$3 \text{ GPH} + k \text{ GPH} = \text{GMH} + k \text{ GMH}$$

$$3 \text{ GPH} - \text{GMH} = k (\text{GMH} - \text{GPH})$$

$$k = (3 \text{ GPH} - \text{GMH}) / (\text{GMH} - \text{GPH})$$

Wie bereits erwähnt, muss die durch Ausschluss der Fälle mit intragenischer Rekombination aufgetretene Neigung, korrigiert werden. Hierfür wurde ein Faktor  $r$  eingeführt:

$$k = ( [3-r] \text{GPH} - [1-r] \text{GMH} ) / ( \text{GMH} - \text{GPH} ),$$

wobei es sich bei GPH und GMH um die absolute Zahl von großväterlichen bzw. großmütterlichen Haplotypen in unserer Probe handelt und  $r$  die Wahrscheinlichkeit intragenischer Rekombination ist, die wir auf 0,05 setzen (25).

Für die Berechnung von  $k$  gilt also folgende Formel:

$$k = (2,95 \text{GPH} - 0,95 \text{GMH} ) / ( \text{GMH} - \text{GPH} )$$

In einem weiteren Schritt berechnen wir sowohl für Deletionen als auch für Punktmutationen die jeweiligen Anteile, die aus der Oogenese beziehungsweise aus der Spermatogenese stammen.

Generell ist der Anteil von Mutationen, die in der Spermatogenese entstehen, gegeben durch: (7)

$$S = 2k / (4+2k),$$

was sich vereinfachen lässt zu:  $S = k / (2+k)$

Entsprechend ist für die Mutationen, die in der Oogenese entstehen, folgendes gegeben:

$$O = 2 / (2+k)$$

Verwenden wir nun das Verhältnis  $k$ , das wir jeweils für Deletionen und Punktmutationen errechnet haben, mit den oben genannten Formeln, so können wir die jeweiligen Anteile von Deletionen und Punktmutationen bestimmen.

## 7. Ergebnisse

Unter Berücksichtigung sowohl der Anpassung an die niederländische Studie als auch der Korrektur wegen des Vorkommens autosomal-rezessiver Fälle, erhalten wir die in Tabelle 7 dargestellte Verteilung

**Tabelle 7**

Verteilung von großmütterlichen (GMH) und großväterlichen (GPH) Haplotypen nach den Korrekturen

	Alle	Deletionen	Duplikationen	Punktmutationen
GMH	166,30	93,07	3,00	70,22
GPH	74,70	24,93	3,00	46,78

Betrachtet man nun erneut die Verteilung der großväterlichen und großmütterlichen Haplotypen im Hinblick auf Unterschiede zwischen den Deletionen und Punktmutationen, so ergibt sich folgende Vierfeldertafel:

	Deletionen	Punktmutationen	Summe
GMH	93,07	70,22	163,30
GPH	24,93	46,78	71,70
Summe	118,00	118,00	235,00

Der dazugehörige Chi-Quadrat-Wert beträgt 9,851,  $p = 0,0017$ , also  $p < 0,02$ .

Auch nach Durchführung der Korrekturen ergibt sich somit ein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen Deletionen und Punktmutationen.

Für die Berechnungen gilt:

$$k = ( [3-r] \text{ GPH} - [1-r] \text{ GMH} ) / ( \text{GMH} - \text{GPH} ), \text{ mit } r = 0,05 ;$$

$$\text{also: } k = ( 2,95 \text{ GPH} - 0,95 \text{ GMH} ) / ( \text{GMH} - \text{GPH} )$$

Somit erhalten wir folgende Daten:

I. Für alle Fälle:

$$k = ( 2,95 * 74,7 - 0,95 * 166,3 ) / ( 166,3 - 74,7 ) = 0,68$$

$$\text{Vertrauensbereich (95\%)} = 0,08 ; 1,76$$

II. Für Deletionen:

$$k = ( 2,95 * 24,93 - 0,95 * 93,07 ) / ( 93,07 - 24,93 ) = -0,22$$

$$\text{Vertrauensbereich (95\%)} = -0,55 ; 0,32$$

III. Für Punktmutationen:

$$k = ( 2,95 * 46,78 - 0,95 * 70,22 ) / ( 70,22 - 46,78 ) = 3,04$$

$$\text{Vertrauensbereich (95\%)} = 0,77 ; 37,05$$

Für die 6 Fälle, in denen eine Duplikation vorlag, konnte aufgrund der geringen Fallzahl keine getrennte Auswertung erfolgen.

Die errechneten Werte und die dazugehörigen Vertrauensbereiche werden noch einmal in Tabelle 8 zusammengefasst:

**Tabelle 8**

Verhältnis der weiblichen und männlichen Mutationsraten (k) und dazugehörige Vertrauensbereiche (95%) nach durchgeführten Korrekturen  
 Rekombinationsfraktion (r) = 0,05

	k	Vertrauensbereich (95%)
alle Fälle	0,68	0,08 ; 1,76
Deletionen	-0,22	-0,55 ; 0,32
Punktmutationen	3,04	0,77 ; 37,05

Mit den so berechneten Werten für k bzw. den entsprechenden Vertrauensbereichen erhalten wir die folgenden Anteile an Spermatogenese und Oogenese:

**I. Punktmutationen:**

Für den Anteil von Mutationen, die in der Spermatogenese entstehen, gilt:

$$S = k / (2+k)$$

Damit erhalten wir für Punktmutationen:

$$S_{pm} = k_{pm} / (2 + k_{pm}) , k_{pm} = 3,04$$

$$S_{pm} = 3,04 / (2 + 3,04) = 0,6032$$

$$S_{pm} = 60,32 \%$$

Für den Anteil von Mutationen, die in der Oogenese entstehen, gilt:

$$O = 2 / (2 + k)$$

Damit erhalten wir für Punktmutationen:

$$O_{pm} = 2 / (2 + k_{pm}), k_{pm} = 3,04$$

$$O_{pm} = 2 / (2 + 3,04) = 0,3968$$

$$O_{pm} = 39,68 \%$$

Es entstehen also 60,32% der Punktmutationen in der Spermatogenese und 39,68 % in der Oogenese.

## **II. Deletionen:**

Für Deletionen hat sich gezeigt, dass  $k$  gegen 0 geht. ( $k = -0,22$ )

Da für den Anteil der Mutationen, die in der Spermatogenese entstehen, gilt:  $S = k / (2+k)$   
geht  $S$  del gegen 0.

Das bedeutet, dass so gut wie keine Deletionen in der Spermatogenese entstehen.

Für den Anteil der Mutationen, die in der Oogenese entstehen, gilt:  $O = 2 / (2 + k)$

$O$  del geht damit gegen 1.

Das bedeutet, dass fast alle Deletionen in der Oogenese entstehen.

## **III. alle Mutationen:**

Für alle Mutationen (mit Duplikationen) erhalten wir:

$$k = 0,68$$

$$S = k / (2+k)$$

$$S_{\text{ges}} = 0,68 / (2 + 0,68) = 0,2537$$

$$S_{\text{ges}} = 25,37 \%$$

$$O = 2 / (2 + k)$$

$$O_{\text{ges}} = 2 / (2 + 0,68) = 0,7463$$

$$O_{\text{ges}} = 74,63 \%$$

Von allen Mutationen entstehen also 25,37 % in der Spermatogenese und 74,63 % in der Oogenese.

Die erhaltenen Ergebnisse werden noch einmal in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9**

Zusammenfassung der Verteilung des Ursprungs der Mutationen auf Spermatogenese und Oogenese

	Spermatogenese	Oogenese
Punktmutationen	60,32%	39,68%
Deletionen	→ 0%	→ 100%
Alle Mutationen	25,37%	74,63%

Wie bereits erwähnt erfolgte für die Duplikationen keine getrennte Auswertung.

An dieser Stelle sei jedoch auf die Arbeit von Kawamura et alii (30) verwiesen, der zufolge Duplikationen vorwiegend in der Spermatogenese entstehen.

## 8. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutationsraten in weiblichen Keimzellen ( $\mu$ ) und in männlichen Keimzellen ( $\nu$ ) nicht, wie anfänglich angenommen, gleich groß sind. Es ist also  $\mu \neq \nu$ , und somit  $k \neq 1$ .

Insbesondere muss hierbei zwischen Deletionen und Punktmutationen unterschieden werden. Es lässt sich sagen, dass für Deletionen  $\mu > \nu$  gilt, während für Punktmutationen  $\mu < \nu$  gilt ( $k = 3,04$  also  $\nu \approx 3 \mu$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass ca. 60% der Punktmutationen in der Spermatogenese entstehen, während fast die Gesamtheit der Deletionen in der Oogenese entsteht.

Diese Erkenntnis hat für die humangenetische Beratung einer möglichen Konduktorin für die Duchennesche Muskeldystrophie eine große Bedeutung.

Nach Haldanes Formel gilt:

$$U = 1/3 I$$

U = durchschnittliche Mutationsrate

I = Inzidenz

Wäre nun  $\mu = \nu$ , lägen in einem Drittel der Fälle Neumutationen vor, während es sich in zwei Drittel der Fälle bei den Müttern um Konduktorinnen handeln würde.

Die Neumutationsrate lässt sich beschreiben durch:  $x = \mu / (2 \mu + \nu)$

Für die Deletionen gilt  $\mu > \nu$ , wobei  $\nu$  gegen 0 geht.

Der oben genannte Quotient für die Neumutationsrate ( $x$ ) geht damit gegen  $1/2$ . Für Deletionen können wir also davon ausgehen, dass näherungsweise 50% der Fälle tatsächliche Neumutationen sind, während es sich in 50% der Fälle bei den Müttern um Konduktorinnen handelt.

Damit ist die die Zahl der tatsächlichen Neumutationen deutlich höher, während die Zahl der Konduktorinnen deutlich niedriger ist als angenommen.

Für eine Mutter, die ein Kind mit Duchennescher Muskeldystrophie geboren hat, bei dem eine Deletion vorliegt, gilt nun, dass das Risiko, erneut ein krankes Kind zu gebären, signifikant niedriger ist als das geschätzte Risiko unter der Annahme gleicher Mutationsraten in Oogenese und Spermatogenese.

Betrachten wir die Punktmutationen, erhalten wir folgende Ergebnisse

Es gilt  $\mu < \nu$  ;  $\nu = 3 \mu$ .

Neumutationsrate:  $x = \mu / (2 \mu + \nu)$

Somit erhalten wir  $x = 1/5$ .

Für Punktmutationen können wir also davon ausgehen, dass etwa 20% der Fälle tatsächliche Neumutationen sind, während es sich in 80% der Fälle bei den Müttern um Konduktorinnen handelt.

Damit ist die die Zahl der tatsächlichen Neumutationen deutlich niedriger, während die Zahl der Konduktorinnen deutlich höher ist als angenommen.

Für eine Mutter, die ein Kind mit Duchennescher Muskeldystrophie geboren hat, bei dem eine Punktmutation vorliegt, gilt nun, dass das Risiko, erneut ein krankes Kind zu gebären, deutlich höher ist als zunächst angenommen.

Ein weiterer interessanter Punkt ist der Vergleich mit anderen X-chromosomal rezessiv vererbaren Krankheiten.

Durchgeführte Studien haben die Ergebnisse aus Tabelle 10 hervorgebracht.

**Tabelle 10**

Verhältnis der männlichen und weiblichen Mutationsraten bei anderen X-chromosomal rezessiv vererbaren Krankheiten

	$k = v / \mu$	
Lesch-Nyhan-Syndrom	$k \sim 8,75$	Francke et al., 1976 <b>(31)</b>
Ornithine Transcarbamylase Defizienz	$k \sim >1$ $k \sim 4,3$	Bonaiti-Pellie et al., 1990 <b>(32)</b> Tuchmann et al., 1995 <b>(33)</b>
Hämophilie B	$k \sim 11$ $k \sim 3,5$ $k \sim 8,64$	Montandon et al. 1992 <b>(34)</b> Ketterling et al., 1993 <b>(35)</b> Green et al., 1999 <b>(36)</b>
Hämophilie A	$k \sim 6$	Ljung et al., 1999 <b>(37)</b>
X-chrom.myotubul.Myopathie	$k \sim 5,7$	Grimm et al., 2003 <b>(38)</b>

Es zeigt sich also, dass DMD nicht die einzige X-chromosomal rezessiv vererbare Krankheit ist, für die nicht  $k=1$  gilt, sondern dass generell von unterschiedlichen Mutationsraten für weibliche und männliche Keimzellen auszugehen ist.

Betrachtet man die Gesamtzahl der Mutationen ist jedoch festzustellen, dass für die anderen genannten Krankheiten  $k>1$  zu gelten scheint, während sich in unserer Arbeit für DMD  $k<1$  herausgestellt hat.

An dieser Stelle ist es wichtig, die verschiedenen Mutationsarten zu unterscheiden, hier lohnt insbesondere ein Vergleich mit der Hämophilie A.

Nach Becker et al. (1996) **(39)** gilt für die Hämophilie A:

$k \sim 14,7$  für Inversionen

$k \sim 4,3$  für Punktmutationen

$k \sim < 0,1$  für Deletionen

Diese Ergebnisse zeigen somit eine ähnliche Tendenz wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ( $k<1$  für Deletionen,  $k>1$  für Punktmutationen).

Zur Überprüfung unserer Ergebnisse bietet sich an dieser Stelle ein Vergleich mit bereits vorher durchgeführten Studien zur Schätzung der männlichen und weiblichen Mutationsrate bei DMD an.

Grimm et al. erhielten in ihrer 1994 durchgeführten Studie unter der Berücksichtigung des Vorhandenseins von autosomal-rezessiven Fällen Werte von  $k = 0,3$  (95% Vertrauensbereich 0 - 2,9) für Deletionen,  $k = 40,3$  (95% Vertrauensbereich 2,0 -  $\infty$ ) für Punktmutationen und  $k = 2,4$  (95% Vertrauensbereich 0,5 - 18,9) für die Gesamtzahl der Fälle. (7)

Die Kernaussage hieraus lautet, dass der Großteil der Deletionen in der Oogenese, der Großteil der Punktmutationen dagegen in der Spermatogenese entsteht.

Die in Nordindien von Sinha et al. 1996 durchgeführte Arbeit (7) zeigte als Ergebnis, dass nur 4 von 23 Müttern von Patienten, die sich als sporadische Fälle von DMD mit einer vorliegenden Deletion erwiesen hatten, Konduktorinnen waren. Dieses weist ebenfalls darauf hin, dass Deletionen vor allem in der Oogenese entstehen.

Auch in der 1999 von Alcantara et al. in Mexiko erfolgten Studie (9) wurden nur 20,7% der Mütter von sporadischen Deletionsfällen als Konduktorinnen bestimmt, was ebenfalls für den mehrheitlichen Ursprung von Deletionen in der Oogenese spricht.

Diese Tendenz konnte auch in der 2003 von Mukherjee et al. in Indien abgeschlossenen Arbeit gezeigt werden, in 20 von 29 sporadischen Fällen von Deletionen handelte es sich um Neumutationen. (10)

Der Vergleich mit anderen Arbeiten bestätigt somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

## 9. Literaturverzeichnis

- (1) *Haldane JBS*. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 1935; 31: 317-326
- (2) *Roses AD, Roses MJ, Metcalf BS, Hull KL*. Pedigree testing in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1977; 2: 271-278
- (3) *Pickard NA, Gruemer HD, Verrill HD*. Systemic membrane defect in the proximal muscular dystrophies. *N Engl J Med* 1978; 299: 841-846
- (4) *Bucher K, Ionesescu V, Hanson J*. Frequency of new mutants among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1980; 7: 27-34
- (5) *Lane RJM, Robinow M, Roses AD*. The genetic status of mothers of isolated cases of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1983; 20: 1-11
- (6) *Barbujani G, Russo A, Danieli GA et al*. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* 1990; 84: 522-526
- (7) *Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Müller CR, Müller B*. 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* 1994; 31: 183-186
- (8) *Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B*. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne / Becker muscular dystrophy patients. *Clin Genet*. 1996; 50: 327-31
- (9) *Alcantara MA, Villarreal MT, Del Castillo V et al*. High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet*. 1999; 55: 376-80

- (10) *Mukherjee M, Chaturvedi LS, Srivastava S et al.* De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Experimental and Molecular Medicine* 2003; 35: 113-117
- (11) *Moser, H.* DMD: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 1984; 66: 17-40
- (12) *Emery AEH.* Duchenne muscular dystrophy. *Oxford Monographs on Molecular Genetics* 1987
- (13) *Koenig M, Hoffmann EP, Bertelson CJ et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-17
- (14) *Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E et al.* 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* 1989; 45: 835-47
- (15) *Haldane JBS.* Mutation in the sex-linked recessive type of muscular dystrophy. A possible sex difference. 1956
- (16) *Crow JF, Denniston C.* Mutation in human populations. *Adv. Hum. Genet* 1985; 14: 59-123
- (17) *Yasuda N, Kondo K.* No sex difference in mutation rates of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1980; 17: 106-111
- (18) *Smith HO.* Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 1979; 205: 455-462
- (19) *Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-331

- (20) *Southern EM*. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517
- (21) *Müller-Migl CR*. Indirekte Genotypdiagnostik der Muskeldystrophie Duchenne. Heterozygoten-Erkennung und pränatale Diagnose mit molekularbiologischen Methoden. Habilitationsschrift, Würzburg 1986
- (22) *Müller, C.R.; Grimm, T*. 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* 1986; 74:181-183
- (23) *Karel ER, te Meerman GJ, ten Kate LP*. On the power to detect differences between male and female mutation rates for Duchenne muscular dystrophy, using classical segregation analysis and restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 827-840
- (24) *Krüger J*. Remarks to the letter from G.J. te Meerman et al. *Hum Genet* 1987; 75: 297
- (25) *Muller B, Dechant C, Meng G et al*. Estimation of the male and female mutation rates in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Hum Genet* 1992; 89: 204-206
- (26) *van Essen AJ, Busch HF, te Meerman GJ, ten Kate LP*. Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in The Netherlands. *Hum Genet* 1992; 88: 258-66
- (27) *Grimm T, Müller B, Müller CR, Janka M*. Theoretical considerations on germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1990; 27: 683-687
- (28) *Emery AEH*. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 19-29

- (29) *Stec I, Kress W, Meng G, Müller B, Müller CR, Grimm T*: Estimate of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2C, LGMD2D) among sporadic muscular dystrophy males: a study of 415 families. *J Med Genet*. 1995; 32: 930-33
- (30) *Kawamura J, Kato S, Ishihara T et al*. Difference of new mutation rates in dystrophin gene between deletion and duplication mutation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku* 1997; 37: 212-17.
- (31) *Francke U, Felsenstein J, Gartler SM et al*. The occurrence of new mutants in the X-linked recessive Lesch-Nyhan disease. *Am J Hum Genet*. 1976; 28: 123-37
- (32) *Bonaiti-Pellie C, Pelet A, Ogier H et al*. A probable sex difference in mutation rates in ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Genet* 1990; 84:163-166
- (33) *Tuchmann M, Matsuda I, Munnich A et al*. Proportions of spontaneous mutations in males and females with ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Med Genet*. 1995; 55: 67-70
- (34) *Montandon AJ, Green PM, Bentley DR et al*. Direct estimate of the haemophilia B (factor IX deficiency) mutation rate and of the ratio of the sex-specific mutation rates in Sweden. *Hum Genet* 1992; 89: 319-322
- (35) *Ketterling RP, Vielhaber E, Bottema CD et al*. Germ-line origins of mutation in family with hemophilia B: the sex ratio varies with the type of mutation. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 152-66
- (36) *Green PM, Saad S, Lewis CM, Giannelli F*. Mutation rates in Humans. I. Overall and Sex-Specific Rates Obtained from a Population Study of Hemophilia B. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65: 1572-1579

- (37) *Ljung RCR, Sjörin E.* Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. British Journal of Haematology 1999 ; 106: 870-874
- (38) *Grimm T, Gallati S, Kress W.* The origin of mutations in the lethal X-linked recessive Myotubular Myopathy MTM1. 2003
- (39) *Becker J, Schwaab R, Moller-Taube A et al.* 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 1996; 58: 657-670

## **Danksagung:**

Hiermit möchte ich mich abschließend ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. B. Müller-Myhsok für die Unterstützung bei den durchgeführten Berechnungen danken.

Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Außerdem möchte ich den Mitarbeitern der Abteilung für medizinische Genetik für die freundliche Aufnahme und jederzeitige Hilfe und Unterstützung danken.

Für die technische und moralische Unterstützung und Hilfe möchte ich meinem Freund Hendrik danken.

Miriam Krüger

# Lebenslauf

---

## **Persönliche Informationen**

- Name: Miriam Krüger
- Geburtsdatum: 24.05.1979
- Geburtsort: Wolfenbüttel
- Familienstand: ledig
- Eltern: Alfred Krüger (†), Dr.med.Irene Krüger

## **Schulbildung**

- 1985-1988 Grundschule Nordhorn
- 1988 – 1990 Orientierungsstufe Nordhorn
- 1990 – 1997 Gymnasium Nordhorn

## **Hochschulbildung**

- 1997-2000 Humanmedizin, Georg-August-Universität Göttingen
- 2000-2001 Humanmedizin, Universidad de Miguel Hernandez, Alicante, Spanien
- 2001-2004 Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 1999 Physikum, 2000 1.Staatsexamen, 2003 2.Staatsexamen, 2004 3.Staatsexamen

## **Praktisches Jahr**

- 10/03-1/04: Chirurgie, Hôpital des Cadolles, Neuchâtel, Schweiz
- 2/04-3/04: Innere Medizin, Universitätskrankenhaus Umeå, Schweden
- 4/04-5/04: Pädiatrie, Universitätskrankenhaus Umeå, Schweden
- 6/04-7/04: Pädiatrie, Inselspital Bern, Schweiz
- 8/04–9/04: Innere Medizin, East General Hospital, Toronto, Kanada

Nordhorn, 05.01.2004

Miriam Krüger