

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. T. Haaf

**Die Häufigkeiten der Mutationstypen und deren Verteilung im
Dystrophin-Gen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carolin Astrid Gahn

aus Würzburg

Würzburg, August 2010

Referent: Prof. Dr. med. T. Grimm

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern und Tomek gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Übersicht	1
1.2 Muskeldystrophie Duchenne	1
1.3 Muskeldystrophie Becker	2
1.4 Das Dystrophin-Gen und seine Mutationen	2
1.5 Diagnostik der Muskeldystrophien Duchenne und Becker	4
1.6 Therapie der Muskeldystrophien Duchenne und Becker	5
2. Fragestellungen	5
2.1 Häufigkeiten der Mutationstypen	5
2.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen	6
2.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen	6
2.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien Duchenne und Becker	7
3. Material	7
3.1 Datensatz	7
3.2 Aufteilung nach Geschlecht	7
3.3 Bildung von Diagnosegruppen	8
3.4 Aufteilung nach den Parametern: Stammbaum, Untersuchungsindikation, Mutation und Geschlecht	9
3.5 Aufteilung nach männlichen Patienten Inland und Diagnosegruppen	13
4. Methoden	14
4.1 Chi-Quadrat-Test	15
4.2 Formel nach Brandt-Snedecor	16

5. Ergebnisse	17
5.1 Häufigkeiten der Mutationstypen	17
5.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen	18
5.2.1 Gesamtanzahl betroffener Exons	18
5.2.2 Verteilung der von Mutationen betroffenen Exons auf Exon-Zehnergruppen	18
5.2.3 Prüfung der Gleichverteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen	34
5.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen	35
5.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien Duchenne und Becker	36
6. Diskussion	37
6.1 Häufigkeiten der Mutationstypen	37
6.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen	38
6.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen	39
6.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien Duchenne und Becker	39
7. Zusammenfassung	40
8. Abkürzungsverzeichnis	42
9. Literaturverzeichnis	43

1. Einleitung

1.1 Übersicht

Muskeldystrophien sind eine Gruppe von Erkrankungen, die zu einer progredienten, genetisch determinierten, primären Degeneration von Muskelfasern führen (1). Becker hat als erster zwischen der autosomal-dominanten (fazioskapulohumerale Muskeldystrophie), der autosomal-rezessiven (Gliedergürtelmuskeldystrophie) und der X-chromosomal (progressive Muskeldystrophie) Form unterschieden (2). Da eine klinische Unterscheidung vor allem der X-chromosomal und der autosomal-rezessiven Muskeldystrophien häufig schwierig ist, wird Betroffenen im Rahmen einer genetischen Beratung eine molekulargenetische Diagnostik oder auch eine Muskelbiopsie zur Sicherung der Diagnose angeraten (3). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den X-chromosomal rezessiv vererbten Muskeldystrophien Duchenne und Becker, im Speziellen mit den Häufigkeiten der verschiedenen Mutationstypen, der Verteilung der einzelnen Mutationen im Dystrophin-Gen sowie der geographischen Verteilung der Erkrankungen. Zunächst folgen einige Erläuterungen zu den Erkrankungen, der Genetik, Diagnostik und Therapie. Daran schließen sich die genauen Fragestellungen an.

1.2 Muskeldystrophie Duchenne

Mit einer Inzidenz von 3×10^{-4} unter männlichen Neugeborenen stellt die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) die weltweit häufigste Muskeldystrophie dar. Die Prävalenz liegt im Mittel bei $6,3 \times 10^{-5}$ der männlichen Bevölkerung (7). Aufgrund des X-chromosomal rezessiven Erbganges sind klinisch vor allem Jungen betroffen. In über 90 Prozent der Fälle kann die Diagnose DMD bis zum 6. Lebensjahr gestellt werden (4). Die Betroffenen fallen zumeist durch eine motorische Entwicklungsverzögerung auf, die sich im verspäteten Laufen lernen oder dem erschwerten Aufrichten aus der Hocke (sog. Gowers Zeichen) zeigt und auf eine proximale Muskelschwäche schließen lässt. Inspektorisch kann man schon in frühen Krankheitsstadien eine Muskelhypertrophie besonders an Waden-, Oberschenkel- und Gesäßmuskulatur sehen. Die Rollstuhlpflichtigkeit

tritt häufig bis zum 13. Lebensjahr ein. Ebenso ist eine Beteiligung der inneren Organe nicht selten. Die meisten der über achtzehnjährigen Jungen zeigen eine kardiale Beteiligung (5). Eine Intelligenzminderung findet sich bei etwa 20 Prozent der DMD Patienten; als Ursache hierfür wird ein Fehlen des hirnspezifischen Dystrophins diskutiert (22). Da lediglich eine symptomatische Therapie erfolgen kann tritt bei einer mittleren Lebenserwartung von 20 bis 30 Jahren der Tod sehr häufig durch pulmonale Komplikationen (respiratorische Insuffizienz) ein (1, 3).

1.3 Muskeldystrophie Becker

Die Inzidenz der Becker Muskeldystrophie (BMD) unter männlichen Neugeborenen beträgt etwa $5,4 \times 10^{-5}$, die Prävalenz in der männlichen Bevölkerung circa $1,4 \times 10^{-5}$ (7). Das Erkrankungsalter bei der BMD, die ebenso wie die DMD X-chromosomal rezessiv vererbt wird, liegt im Mittel bei zwölf Jahren. Diese zeigt sich zunächst durch Probleme beim Treppensteigen oder schnellen Laufen. Der dystrophische Prozess beginnt zumeist an der Beckenmuskulatur und breitet sich auf den Schultergürtel aus. Das Betroffen sein von inneren Organen ist weniger ausgeprägt als bei der DMD, jedoch ist eine Herzbeteiligung, wenn auch zunächst nur durch EKG-Veränderungen ersichtlich, schon vor dem 20. Lebensjahr möglich. Eine Intelligenzminderung wird weniger häufig beobachtet, als bei der DMD. Bei der BMD tritt eine Gehunfähigkeit nach etwa 30 Jahren Krankheit ein, die mittlere Lebenserwartung liegt bei circa 50 Jahren. Zumeist sind kardiale Probleme für den Tod verantwortlich (1).

1.4 Das Dystrophin-Gen und seine Mutationen

Sowohl die DMD also auch die BMD beruhen auf einem Defekt im Dystrophin-Gen, das heißt, sie sind allelisch. Zunächst konnte Anfang der 80er Jahre das Dystrophin-Gen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21) lokalisiert werden. Im weiteren Verlauf wurden die Grenzen des Gens festgestellt und schließlich das gesamte Gen sequenziert. Mit circa 2,4 Millionen Basenpaaren ist es das größte Gen des menschlichen Körpers. Die codierenden Bereiche,

die sich über 79 Exons erstrecken, stellen mit 14 000 Basenpaaren nur einen Bruchteil des gesamten Gens dar (8, 9, 10, 11, 12, 13).

Letztendlich konnte im Jahr 1987 das Protein Dystrophin als Genprodukt nachgewiesen werden. Es hat ein Molekulargewicht von 427 kDa und enthält 3685 Aminosäuren. Bei Gesunden liegt es unter der Zellmembran der Muskelzelle und bildet in Form eines Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes ein Netz mit dem Sarkomer und dem Sarkolem. Dabei ist Dystrophin für die Übertragung der Kraft vom kontraktilem Apparat der Zelle auf die extrazelluläre Matrix mitverantwortlich. Bei von DMD- oder BMD-Betroffenen ist das Dystrophin defekt. Entweder ist es wie bei der DMD gar nicht vorhanden oder wie bei der BMD stark reduziert oder in seiner Größe oder Funktion verändert (14, 15, 16, 26). Im folgenden Bild findet sich eine Übersicht unter anderem über die Einbettung von Dystrophin in die Muskelzelle.

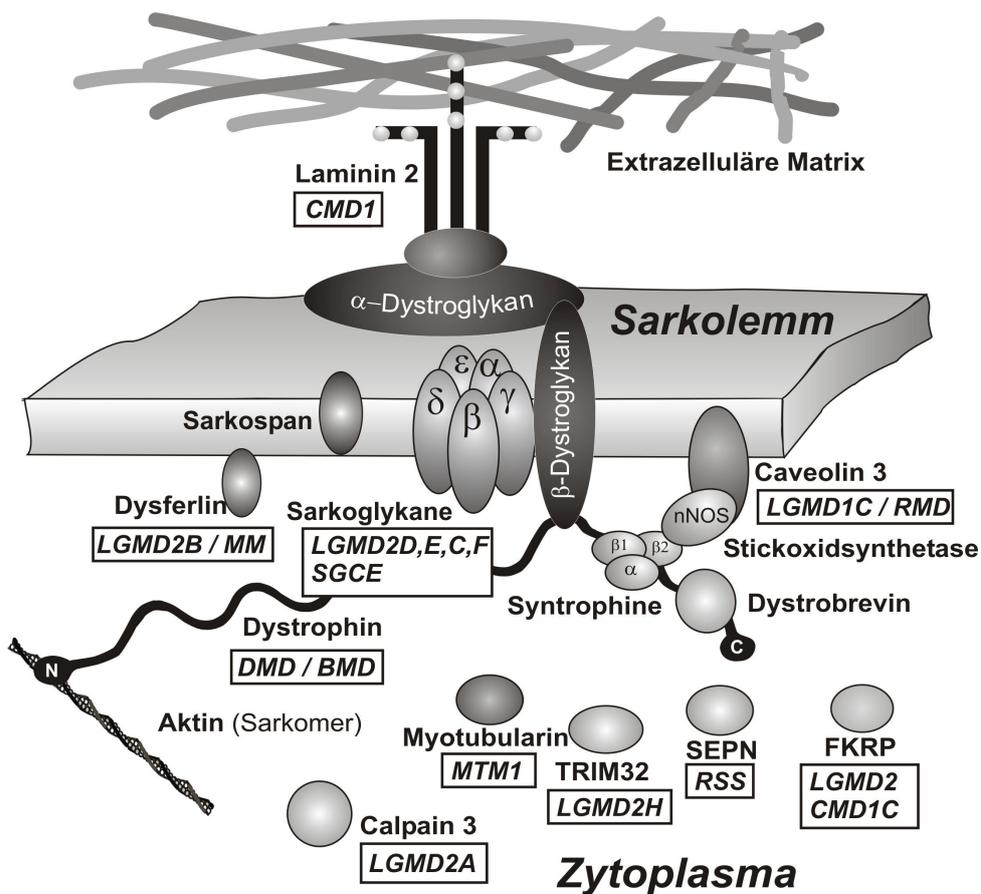


Abb. (1) Darstellung des Dystrophins im Verbund der Muskelzelle (aus 3)

Verschiedene Mutationen im Dystrophin-Gen können demnach Ursache einer DMD oder BMD sein. Die größte Gruppe mit etwa 65 Prozent machen die Deletionen aus (12). Bei diesen findet sich aufgrund der Leserasterhypothese die Möglichkeit, eine Prognose bezüglich des klinischen Verlaufs der Erkrankung zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei DMD-Patienten in 92 Prozent der Fälle eine Verschiebung des Leserasters (out of frame Deletion) findet, und umgekehrt bei BMD-Patienten mit demselben Prozentsatz keine Veränderung des Rasters (in frame Deletion) zeigt (18, 19). Eine Aussage über den klinischen Schweregrad ist bei Duplikationen, die zu circa 7 Prozent vorliegen, nicht sicher möglich (6, 20). Falls keine Deletion oder Duplikation vorliegt, kann zu etwa 26 Prozent eine Punktmutation nachgewiesen werden. Insgesamt bleibt die Mutation bei 2 Prozent der Fälle unbekannt (21).

1.5 Diagnostik der Muskeldystrophien Duchenne und Becker

Zumeist fällt bei Patienten, noch vor dem Eintritt körperlicher Symptome, eine erhöhte Serumkreatinkinase von über 1000 U/l auf, da Schädigungen der Muskelfasermembran zu einem Übertritt von Kreatinkinase ins Serum führen. Bei von DMD-Betroffenen werden die höchsten Werte um das 3. Lebensjahr beobachtet. Insgesamt zeigen sich bei BMD-Patienten nicht so hohe Werte wie bei DMD-Patienten. Um die häufig sehr jungen Betroffenen nicht zusätzlich somatischen Belastungen auszusetzen, zieht man eine molekulargenetische Diagnostik der Muskelbiopsie vor. Seit circa 2002 wird zunächst nach Deletionen und Duplikationen im Dystrophin-Gen mittels Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) gesucht. Bei Ausschluss dieser Mutationen schließt sich eine Sequenzierung der kodierenden Bereiche des Gens mit der Frage nach einer Punktmutation an. In der Vergangenheit gab es verschiedene molekulargenetische Untersuchungsmethoden zur Detektion von Mutationen im Dystrophin-Gen. Zunächst wurde ab dem Jahr 1987 die sehr aufwändige Southern Blot Technik angewandt, mit der 100 Prozent der Deletionen von männlichen Patienten entdeckt werden konnten, gefolgt von der anwenderfreundlicheren Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (M-PCR), die

ab dem Jahr 1988 zum Einsatz kam und eine 98 prozentige Detektion von Deletionen ermöglichte. Die Suche nach Punktmutationen im Dystrophin-Gen etablierte sich im Jahr 1992 mit Hilfe der reversen Transkriptase und nested PCR. Der Vorteil der Muskelbiopsie besteht darin, dass durch eine immunhistochemische Untersuchung eine bessere Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes gemacht werden kann (1, 6, 8, 23, 31, 35, 36,37).

1.6 Therapie der Muskeldystrophien Duchenne und Becker

Derzeit ist für die DMD und BMD kein kausaler Therapieansatz gegeben. Lediglich symptomatische Maßnahmen sind möglich. Vor allem die Physiotherapie stellt einen Schwerpunkt in der Behandlung der Erkrankungen dar, da sie mit gezielten Übungen die muskuläre Funktion verbessern und eine Prophylaxe für Kontrakturen darstellen kann. Durch die nichtinvasive Heimbeatmung erhalten die Patienten wieder mehr Lebensqualität. Bezüglich einer medikamentösen Therapie konnte gezeigt werden, dass eine Glukokortikoid-Gabe eine Stärkung der Muskelkraft für einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren bewirken kann. Für die Behandlung der Herzinsuffizienz werden ACE-Hemmer oder Beta-Blocker eingesetzt. Neuere genetische Therapieansätze, wie das sogenannte Exon-Skipping oder das medikamentöse Überlesen von vorzeitigen Stopcodons, werden aktuell noch in Studien getestet (24, 25, 26).

2. Fragestellungen

2.1 Häufigkeiten der Mutationstypen

In der Einleitung wurden bereits die bekannten Häufigkeiten für die verschiedenen Mutationstypen (Deletionen 65 Prozent, Duplikationen 7 Prozent, Punktmutationen 26 Prozent) der DMD und BMD beschrieben. Zunächst interessiert somit, welche Häufigkeiten sich für die einzelnen Mutationstypen aus dem männlichen Patientengut des Institutes für Humangenetik der Universität Würzburg der Jahre 1983 - 2007 ergeben und ob eine Abweichung von den bisher bekannten Häufigkeiten besteht.

2.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen

Im Folgenden ist von Interesse, ob in bestimmten Gruppen der Stichprobe, in denen ein Mutationstyp (z. B. Deletion) gefunden wurde, die einzelnen Exons des Dystrophin-Gens gleich häufig von dieser Mutation betroffen sind. Das heißt, es wird geprüft, ob eine Gleichverteilung einer jeweiligen Mutation über das Dystrophin-Gen vorliegt. Hierbei soll zum einen die Verteilung aller betroffenen Exons über das Dystrophin-Gen, als auch die Verteilung des jeweils ersten betroffenen Exons einer jeweiligen Mutation (Exon-Anfang) über das Dystrophin-Gen betrachtet werden. Um Berechnungen über die Verteilung einer Mutation anstellen zu können, werden aus der Gesamtstichprobe Untergruppen gebildet. Es werden zu jedem Mutationstyp (z. B. Deletion) zwei Gruppen gebildet; eine bestehend aus der Gesamtheit der untersuchten Personen und eine weitere Gruppe, die sich nur aus männlichen Patienten zusammensetzt, die bezüglich spezieller Untersuchungsindikationen an das Institut kamen.

2.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen

Desweiteren soll geprüft werden, ob sich die oben beschriebenen Gruppen hinsichtlich der Verteilung einer bestimmten Mutation (z. B. Deletion) auf die Exons des Dystrophin-Gens unterscheiden.

Außerdem soll untersucht werden, ob sich innerhalb der Gruppen die verschiedenen Mutationstypen (Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen) untereinander hinsichtlich ihrer Verteilung auf die einzelnen Exons des Dystrophin-Gens unterscheiden.

Eine ausführliche Unterteilung der Gruppen wird im Materialteil beschrieben.

2.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien

Duchenne und Becker

Zuletzt soll noch herausgefunden werden, welche geographische Verteilung in Deutschland für die DMD und BMD sich aus den Daten der männlichen Patienten ergeben.

3. Material

3.1 Datensatz

Zunächst wurden alle Akten von untersuchten Personen des Institutes für Humangenetik der Universität Würzburg aus den Jahren 1983 - 2007, die sich zu einer molekulargenetischen Untersuchung bezüglich DMD oder BMD bereit erklärten, gesichtet. In den Datensatz aufgenommen wurde jeweils nur der Indexpatient einer Familie. Falls von diesem kein genetisches Material mehr zur Verfügung stand, z. B. wenn dieser bereits verstorben war, wurde stattdessen das Familienmitglied, das als nächstes zur Diagnostik an das Institut kam, in die Daten aufgenommen.

Im Allgemeinen wurden in den Datensatz Personen eingeschlossen bei denen eine molekulargenetisch oder immunhistochemisch gesicherte Diagnose der DMD oder BMD, eine erhöhte Serumkreatinkinase, ein gesicherter Fall von DMD oder BMD in der Familie oder ein familiärer oder klinischer Verdachtsfall vorlag. Ausgeschlossen wurden diejenigen bei denen im Verlauf der Untersuchung eine andere Diagnose gestellt wurde. Insgesamt ergab sich hieraus ein Datensatz von 1365 untersuchten Personen. Um später Berechnungen durchführen zu können, wurden diese nach verschiedenen Parametern unterteilt.

3.2 Aufteilung nach Geschlecht

Zunächst folgte eine Aufgliederung der Untersuchten nach Geschlecht. In der folgenden Tabelle ist zu sehen, wie sich die Gesamtzahl aufteilt. Dabei ist zu erwähnen, dass bei den Knaben ein Patient mit Klinefelter-Syndrom und bei den Mädchen eine Patientin mit Turner-Mosaik eingeschlossen ist.

Geschlecht	Anzahl
XY	1143
XX	222
Summe	1365

Tab. (1) Aufteilung der Untersuchten nach Geschlecht; XY: Männer XX: Frauen

3.3 Bildung von Diagnosegruppen

Im Weiteren erfolgte eine Einteilung der Stichprobe in Diagnosegruppen. Zunächst wurden alle Personen mit molekulargenetisch nachgewiesener Mutation, die sich, wie bereits beschrieben, in Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen unterteilen, zusammengefasst (Gruppe: gesicherte Diagnose). Diejenigen, die keine nachgewiesene Mutation hatten, wurden weiter unterteilt. Bei einem Teil der Personen konnte die Diagnose DMD oder BMD aufgrund einer Muskelbiopsie gestellt werden oder aufgrund der Tatsache, dass im Stammbaum der Familie ein eindeutiger familiärer Fall oder Geschwisterfall vorlag (Gruppe: gesicherte Diagnose, unklare Mutation). Die letzte Gruppe setzte sich aus Personen zusammen, bei denen ein Serumkreatinkinasewert über dem Referenzwert gefunden wurde oder bei denen aus klinischen Gründen oder aufgrund einer unklaren Familienanamnese ein Verdacht auf DMD/BMD geäußert wurde. (Gruppe: unklare Diagnose, unklare Mutation). In der folgenden Tabelle werden die Gruppen dargestellt, sowohl in der Gesamtzahl als auch nach Geschlecht aufgeteilt.

	Untersuchte Personen gesamt	XY	XX
	Gesicherte Diagnose		
Deletionen	560	503	57
Duplikationen	84	71	13
Punktmutationen	99	89	10
	Gesicherte Diagnose, unklare Mutation		
Muskel/Stammbaum	148	117	31
	Unklare Diagnose, unklare Mutation		
CK-Wert	256	256	0
Verdachtsfälle	218	107	111
Summe	1365	1143	222

Tab. (2) Bildung von Diagnosegruppen für die Gesamtzahl der Untersuchten sowie getrennt nach Geschlecht

3.4 Aufteilung nach den Parametern: Stammbaum, Untersuchungsindikation, Mutation und Geschlecht

Da für die weitere Datenanalyse von Interesse war, mit welcher Untersuchungsindikation eine Person an das Institut für Humangenetik kam, werden in den folgenden Tabellen weitere Unterteilungen vorgenommen. Neben der Untersuchungsindikation erfolgte eine Aufgliederung der Untersuchten nach Stammbaum, Mutation und Geschlecht. Die Stammbauminformationen lassen sich in vier Unterpunkte aufteilen. Lag keine Information über eine Familie bezüglich der Genetik vor, wurde dies als „Unbekannt“ bezeichnet. Trat ein Fall von DMD oder BMD in einer Familie zum ersten Mal auf, wurde er als „Sporadisch“ betrachtet. Waren zwei Geschwister betroffen, wurde dies als „Geschwister“ bezeichnet. Falls in mehr als einer Generation Betroffene vorlagen, wurde dies als „Familiär“ bezeichnet. Es gibt verschiedene Indikationen, die Patienten zu einer molekulargenetischen Untersuchung veranlassen. Diese Indikationen werden im Folgenden dargestellt und kurz erläutert. Zur Differentialdiagnostik (DD) käme zum Beispiel ein Junge von etwa drei Jahren, der Probleme beim Aufrichten aus der Hocke zeigt. Im Fall der Differential- und Konduktorinnendiagnostik (DK) würde seine Mutter ebenso getestet werden, um zu sehen, ob sie die Überträgerin des Gendefektes ist. Eine alleinige Konduktorinnendiagnostik (KO) würde man

veranlassen, wenn in der Familie ein Fall von DMD oder BMD vorliegt, der Patient jedoch bereits verstorben ist und eine junge Frau wissen möchte, ob sie Überträgerin ist. Eine Pränataldiagnostik (PD) würde eine schwangere Patientin, die bereits ein an DMD oder BMD erkranktes Kind hat, wahrnehmen. Die Pränatal- und Konduktorinnendiagnostik (PK) würde zudem noch die Testung der Mutter und nicht nur des Ungeborenen einschließen. Die folgenden Tabellen, die sowohl die Gesamtzahl der Untersuchten als auch eine Unterteilung nach Geschlecht darstellen, geben einen Überblick über die Daten bezüglich der beschriebenen Parameter.

Untersuchte Personen gesamt						
Stammbaum		Indikation		Deletion	Duplikation	Punktmutation
Unbekannt	824	DD	628	205	24	36
		DK	91	61	12	12
		KO	96	29	5	3
		PD	2	1	0	0
		PK	7	4	1	0
Sporadisch	320	DD	70	40	3	7
		DK	122	78	9	14
		KO	82	28	4	3
		PD	4	1	1	0
		PK	42	18	4	3
Geschwister	56	DD	19	14	2	0
		DK	26	9	3	3
		KO	3	2	0	0
		PD	1	0	0	0
		PK	7	2	1	2
Familiär	165	DD	26	11	3	0
		DK	45	17	3	9
		KO	59	24	2	6
		PD	2	1	1	0
		PK	33	15	6	1
Summe	1365		1365	560	84	99

Tab. (3) Gesamtheit der Untersuchten aufgeteilt nach den Parametern: Stammbaum, Indikation und Mutation

XY						
Stammbaum		Indikation		Deletion	Duplikation	Punktmutation
Unbekannt	738	DD	627	205	24	36
		DK	89	60	12	12
		KO	14	13	1	0
		PD	2	1	0	0
		PK	6	4	1	0
Sporadisch	230	DD	66	38	3	7
		DK	114	76	8	13
		KO	22	12	1	0
		PD	2	1	1	0
		PK	26	14	4	3
Geschwister	52	DD	19	14	2	0
		DK	26	9	3	3
		KO	2	2	0	0
		PD	1	0	0	0
		PK	4	1	0	2
Familiär	123	DD	26	11	3	0
		DK	45	17	3	9
		KO	31	15	1	3
		PD	2	1	1	0
		PK	19	9	3	1
Summe	1143		1143	503	71	89
Summe		DD/DK		430	58	80

Tab. (4) Männer (XY) aufgeteilt nach den Parametern: Stammbaum, Indikation und Mutation sowie Bildung der Gruppe „XY, DD/DK“, ersichtlich durch die fettgedruckten Werte

XX						
Stammbaum		Indikation		Deletion	Duplikation	Punktmutation
Unbekannt	86	DD	1	0	0	0
		DK	2	1	0	0
		KO	82	16	4	3
		PD	0	0	0	0
		PK	1	0	0	0
Sporadisch	90	DD	4	2	0	0
		DK	8	2	1	1
		KO	60	16	3	3
		PD	2	0	0	0
		PK	16	4	0	0
Geschwister	4	DD	0	0	0	0
		DK	0	0	0	0
		KO	1	0	0	0
		PD	0	0	0	0
		PK	3	1	1	0
Familiär	42	DD	0	0	0	0
		DK	0	0	0	0
		KO	28	9	1	3
		PD	0	0	0	0
		PK	14	6	3	0
Summe	222		222	57	13	10

Tab. (5) Frauen (XX) aufgeteilt nach den Parametern: Stammbaum, Indikation und Mutation

Wie im letzten Teil der Tabelle (4) ersichtlich wird, hat nochmals eine Unterteilung der männlichen Personen mit einer diagnostizierten Mutation stattgefunden. Es wurden nur diejenigen in eine Gruppe eingeschlossen, die mit den Indikationen DD oder DK untersucht wurden, um diese Patienten zu einem späteren Zeitpunkt mit der Gesamtzahl der untersuchten Personen bezüglich der Verteilungen der Mutationen auf das Dystrophin-Gen vergleichen zu können.

Somit kann man, wie in der Fragestellung bereits erwähnt wurde, zu jeder Mutation zwei verschiedene Gruppen aus der Stichprobe bilden, deren Mutationsverteilungen im Dystrophin-Gen statistisch auf Gleichverteilung geprüft werden können.

Es handelt sich hierbei um die Gruppen:

1. Alle Personen mit der gleichen Mutation (Gesamtheit)
2. Männliche Patienten mit der gleichen Mutation und der Indikation DD und DK (XY, DD/DK)

3.5 Aufteilung nach männlichen Patienten Inland und Diagnosegruppen

Um die geographische Verteilung der DMD und BMD in Deutschland ermitteln zu können, wurde aus den männlichen Patienten nur der Anteil gewählt, der zum Zeitpunkt der Diagnostik einen bekannten Wohnsitz in der Bundesrepublik Deutschland hatte. Hieraus ergab sich eine Anzahl von 1114 männlichen Patienten (XY). Diese wurden ebenso in die bereits beschriebenen Diagnosegruppen eingeteilt (Gesicherte Diagnose; Gesicherte Diagnose, unklare Mutation; Unklare Diagnose, unklare Mutation). Desweiteren wurden die Patienten mit gesicherter Mutation nach der klinischen Einschätzung in DMD oder BMD unterteilt. Eine Übersicht gibt folgende Tabelle.

	XY Wohnsitz BRD		
	Gesicherte Diagnose	DMD	BMD
Deletionen	491	310	181
Duplikationen	69	56	13
Punktmutationen	87	76	11
	Gesicherte Diagnose, unklare Mutation		
Muskel/Stammbaum	109		
	Unklare Diagnose, unklare Mutation		
CK-Wert	254		
Verdachtsfälle	104		
Summe	1114		

Tab. (6) Bildung von Diagnosegruppen für die in Deutschland lebenden männlichen Patienten

Darüber hinaus war es für die Ermittlung der geographischen Verteilung notwendig, die Patienten auf Regionen zu verteilen. Hierfür wurden die zehn in Deutschland existierenden Postleitzahlenbereiche gewählt. Nachfolgende Tabelle gibt nun einen Überblick über die Verteilung der 1114 männlichen Patienten und der einzelnen Mutationen auf die Postleitzahlenregionen.

Postleitzahlenbereich	XY Inland	Deletion	Duplikation	Punkt-Mutation	Gesicherte Diagnose, unklare Mutation	Unklare Diagnose, unklare Mutation
0	74	32	4	9	10	19
1	114	47	7	18	10	32
2	105	48	10	12	6	29
3	127	66	6	8	17	30
4	151	58	8	6	11	68
5	133	52	7	6	12	56
6	87	47	2	2	11	25
7	120	61	9	12	9	29
8	56	25	4	5	4	18
9	147	55	12	9	19	52
Summe	1114	491	69	87	109	358

Tab. (7) Aufteilung der männlichen Patienten aus den obigen Diagnosegruppen auf die Postleitzahlenregionen Deutschlands

Um die geographischen Daten der männlichen Patienten statistisch auswerten zu können, stellte das statistische Bundesamt in Wiesbaden eine Auflistung der Einwohnerzahlen pro Postleitzahlenregion zur Verfügung. Diese enthält sowohl die Anzahl der Gesamtbevölkerung als auch die der männlichen und weiblichen Einwohner der einzelnen Postleitzahlenregionen Deutschlands. Die Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Postleitzahlenbereich	Gesamtbevölkerung	Männlich	Weiblich
0	6758824	3306741	3452083
1	7029187	3462734	3566453
2	8678958	4256267	4422691
3	8962008	4380533	4581475
4	10297474	5016351	5281123
5	9203740	4509943	4693797
6	7532439	3689680	3842759
7	8712678	4283986	4428692
8	7695468	3777508	3917960
9	7131580	3500540	3631040
Summe	82002356	40184283	41818073

Tab. (8) Unterteilung der Einwohner Deutschlands in Postleitzahlenregionen; Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden

4. Methoden

Für die statistische Auswertung und die Darstellung der Diagramme wurde das Programm Excel verwendet.

4.1 Chi-Quadrat-Test

Zur statistischen Auswertung der Verteilung der einzelnen Mutationen auf die Exons im Dystrophin-Gen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Dieser prüft die Übereinstimmung zwischen beobachteten und theoretisch erwarteten Verteilungen. Zur Durchführung werden zwei Hypothesen aufgestellt, eine Nullhypothese (H0) und eine Alternativhypothese (H1). Als H0 wird eine Gleichverteilung der betroffenen Exons im Dystrophin-Gen bei der jeweiligen Mutation angenommen, als H1 eine Ungleichverteilung. Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel:

$$\chi^2 = (B-E)^2/E$$

χ^2 : Chi-Quadrat, B: beobachtete Verteilung, E: erwartete Verteilung

In der nachfolgenden Tabelle wird zum besseren Verständnis eine Berechnung am Beispiel der Verteilung der Gruppe der „Deletionen Gesamtheit“ im Dystrophin-Gen eingefügt.

Deletionen Gesamtheit N=560				
Exon	prozentual	B	E	(B-E)²/E
Exon 1-10	0,110	380	438,608	7,831
Exon 11-20	0,156	540	438,608	23,439
Exon 21-30	0,108	374	438,608	9,517
Exon 31-40	0,075	261	438,608	71,920
Exon 41-50	0,397	1377	438,608	2007,672
Exon 51-60	0,133	460	438,608	1,043
Exon 61-70	0,013	45	438,608	353,224
Exon 71-79	0,008	28	394,747	340,733
Summe	1	3465	3465	
			χ^2	2815,379
			p-Wert	0,00E+00

Tab. (9) Beispiel für die Berechnung des Chi-Quadrat-Testes

Das Ergebnis kann unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade mit einem Tabellenwert verglichen werden. Ist der Testwert größer als der Tabellenwert wird H0 verworfen und H1 akzeptiert. Zur Beurteilung der Signifikanz des Ergebnisses wird die Chiverteilung bzw. der p-Wert auch unter

Berücksichtigung der Freiheitsgrade ermittelt. Ein $p < 0,05$ spricht für ein signifikantes Ergebnis mit dem Verwerfen von H_0 .

4.2 Formel nach Brandt-Snedecor

Mit der Formel nach Brandt-Snedecor können zwei Grundgesamtheiten auf ihre Gleichheit geprüft werden. Diese wurde daher angewendet um zu prüfen, ob sich die beiden Gruppen „Gesamtheit“ und „XY, DD/DK“ hinsichtlich der Verteilungen von Mutationen voneinander unterscheiden. Die Formel wurde auch verwendet um unterschiedliche Mutationen innerhalb derselben Gruppe bezüglich ihrer Verteilung über das Dystrophin-Gen miteinander zu vergleichen.

Anhand eines Beispiels, in welchem die Verteilung der Gruppen „Deletionen Gesamtheit“ und „Deletionen XY, DD/DK“ auf die Exons miteinander verglichen werden, soll die Verwendung der Formel erläutert werden.

Vergleich Deletionen Gesamtheit N=560 mit Deletionen XY, DD/DK N=430			
Exon	Deletionen Gesamtheit	Deletionen XY, DD/DK	Summe
Exon 1-10	380	286	666
Exon 11-20	540	423	963
Exon 21-30	374	279	653
Exon 31-40	261	170	431
Exon 41-50	1377	1090	2467
Exon 51-60	460	360	820
Exon 61-70	45	30	75
Exon 71-79	28	19	47
Summe	3465	2657	6122
		χ^2	4,255
		p-Wert	7,50E-01

Tab. (10) Beispiel für die Anwendung der Formel nach Brandt-Snedecor

$$\chi^2 = (6122^2 / (3465 \times 2657)) \times ((380^2 / 666) + (540^2 / 963) + \dots + (28^2 / 47) - 3465^2 / 6122)$$

$$\chi^2 = 4,255 \quad p = 7,5 \times 10^{-1}$$

Diese Statistik wird nach den gleichen Prinzipien interpretiert wie bereits oben erklärt.

Für die Berechnung der geographischen Verteilung wird ebenfalls die Formel nach Brandt-Snedecor angewendet (17).

5. Ergebnisse

5.1 Häufigkeiten der Mutationstypen

Zunächst wurden die Häufigkeiten der einzelnen Mutationstypen der DMD und BMD unter den männlichen Patienten untersucht. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Daten der Gruppen „XY, Gesicherte Diagnose“ und „XY, Gesicherte Diagnose, unklare Mutation“ aus Tabelle (2).

In der folgenden Tabelle sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der einzelnen Mutationstypen dargestellt.

Mutationen	XY	Häufigkeiten	
		Absolut	relativ
Deletionen	503	0,759	0,645
Duplikationen	71	0,107	0,091
Punktmutationen	89	0,134	
Punktmutationen/Gesicherte Diagnose, unklare Mutation	206 (=89+117)		0,264

Tab. (11) Absolute und relative Häufigkeiten der Mutationstypen der männlichen Patienten (XY)

Die linke Spalte der relativen Häufigkeiten stellt nur die Auswertung der Patienten mit gesicherter Mutation dar. In der rechten Spalte wurden die männlichen Patienten mit Punktmutationen und diejenigen mit „Gesicherte Diagnose, unklare Mutation“ zusammengefasst, weil häufig bei Ratsuchenden nur nach Deletionen und Duplikationen gesucht wurde. Da bei Personen mit unklarer Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Punktmutation vorlag, entsprechen die relativen Häufigkeiten in der rechten Spalte eher den tatsächlich in der Stichprobe vorliegenden Häufigkeiten der einzelnen Mutationstypen.

5.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen

5.2.1 Gesamtanzahl betroffener Exons

Für die im Materialteil aus dem Datensatz gebildeten Gruppen „Gesamtheit“ und „XY, DD/DK“ wurde zunächst die Gesamtanzahl betroffener Exons für die jeweilige Mutation ermittelt.

Tabelle (12) zeigt die Anzahl aller betroffenen Exons einer jeweiligen Mutation für die beiden genannten Gruppen. Tabelle (13) nennt nur die Anzahl der ersten betroffenen Exons einer jeweiligen Mutation (Exon-Anfang).

Mutationen	Gesamtheit	Exons	XY; DD/DK	Exons
Deletionen	560	3465	430	2657
Duplikationen	84	620	58	465
Punktmutationen	99	99	80	80

Tab. (12) Betroffene Exons einer jeweiligen Mutation

Mutationen	Gesamtheit	Exons, Exon-Anfang	XY; DD/DK	Exons, Exon-Anfang
Deletionen	560	560	430	430
Duplikationen	84	86	58	60
Punktmutationen	99	99	80	80

Tab. (13) Erstes betroffenes Exon einer jeweiligen Mutation (Exon-Anfang)

5.2.2 Verteilung der von Mutationen betroffenen Exons auf Exon-Zehnergruppen

Für die weitere Auswertung wurden die Exons des Dystrophin-Gens zu Zehnergruppen zusammengefasst (z. B. Exon 1 - 10) und anschließend die absolute Anzahl und die relative Häufigkeit der von Mutationen betroffenen Exons in den Zehnergruppen ermittelt. Die Darstellung erfolgt in Form von Tabellen, und zur besseren Veranschaulichung auch in Diagrammen. Zusätzlich werden als Diagramm auch die Verteilungen der Mutationen auf die einzelnen Exons des Dystrophin-Gens gezeigt. Zuerst werden die Verteilungen aller betroffenen Exons einer Mutation und dann die Verteilungen jeweils des ersten betroffenen Exons (Exon-Anfang) einer Mutation dargestellt. Lediglich bei den Punktmutationen entfällt die Darstellung des Exon-Anfangs, da insgesamt nur ein Exon betroffen ist. Die Ergebnisse der folgenden Tabellen

werden im nächsten Abschnitt zur Prüfung der Verteilung der Mutationen auf die Exons des Dystrophin-Gens benötigt.

Deletionen Gesamtheit N=560	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,110	380
Exon 11-20	0,156	540
Exon 21-30	0,108	374
Exon 31-40	0,075	261
Exon 41-50	0,397	1377
Exon 51-60	0,133	460
Exon 61-70	0,013	45
Exon 71-79	0,008	28
Summe	1	3465

Tab. (14) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen Gesamtheit N=560

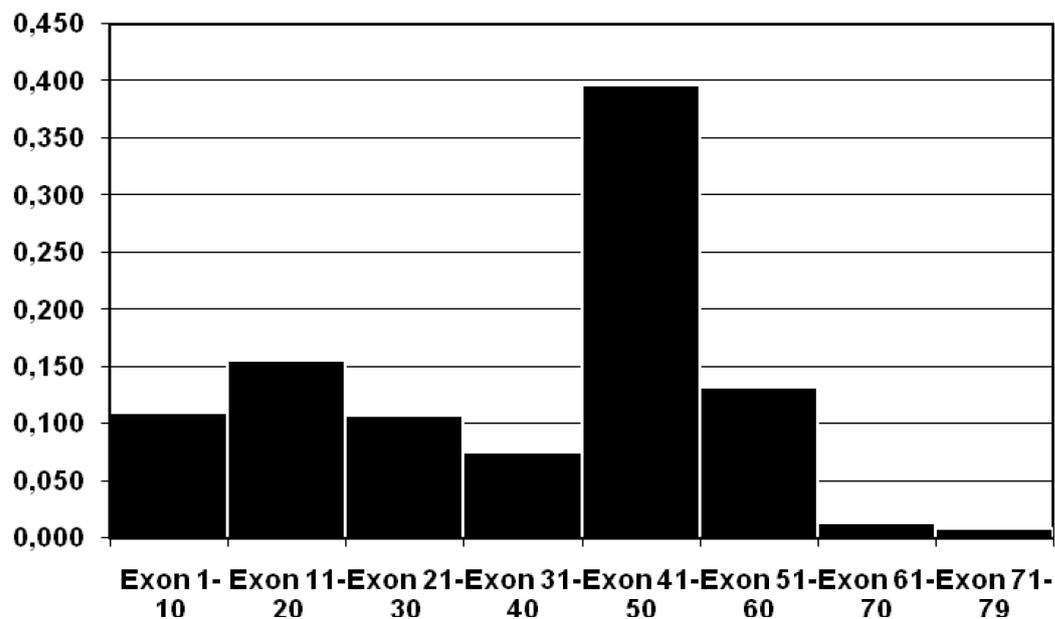


Abb. (2) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen Gesamtheit N=560

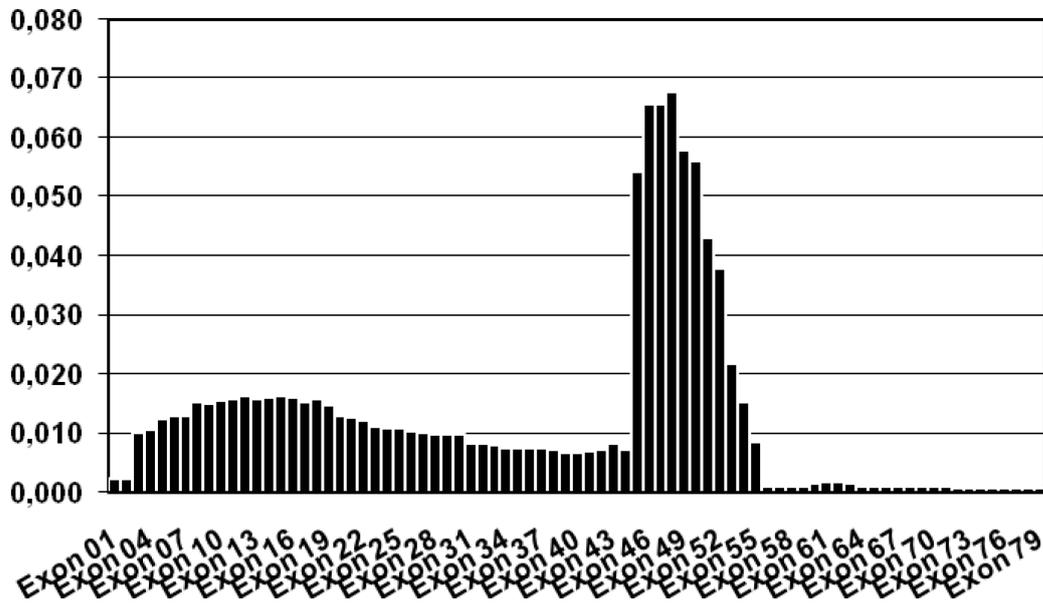


Abb. (3) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit“

Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang N=560	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,148	88
Exon 11-20	0,042	25
Exon 21-30	0,013	8
Exon 31-40	0,008	5
Exon 41-50	0,638	380
Exon 51-60	0,087	52
Exon 61-70	0,004	2
Exon 71-79	0,000	0
Summe	1	560

Tab. (15) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang N=560

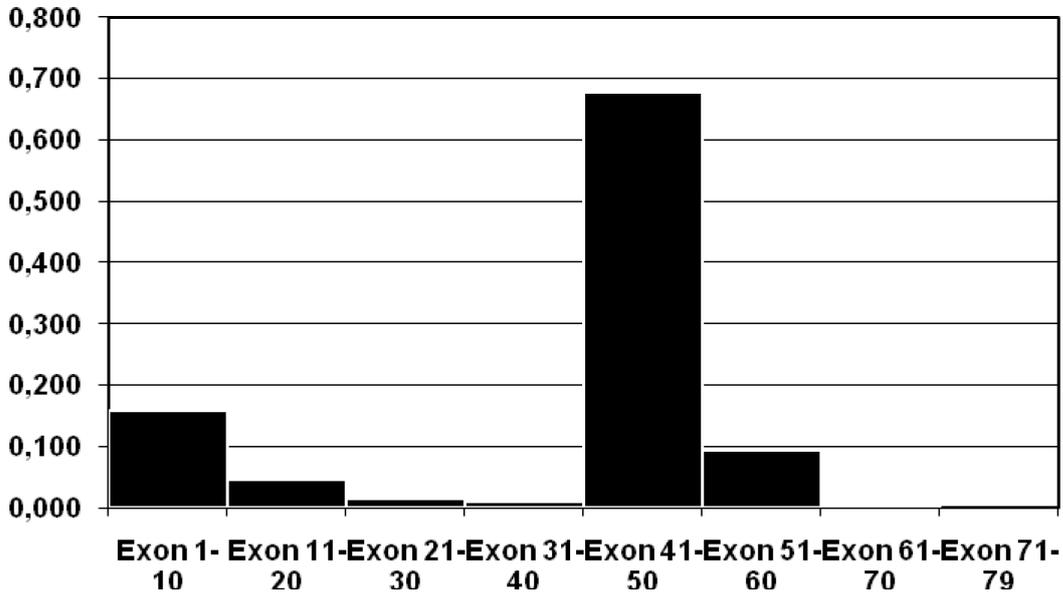


Abb. (4) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang N=560

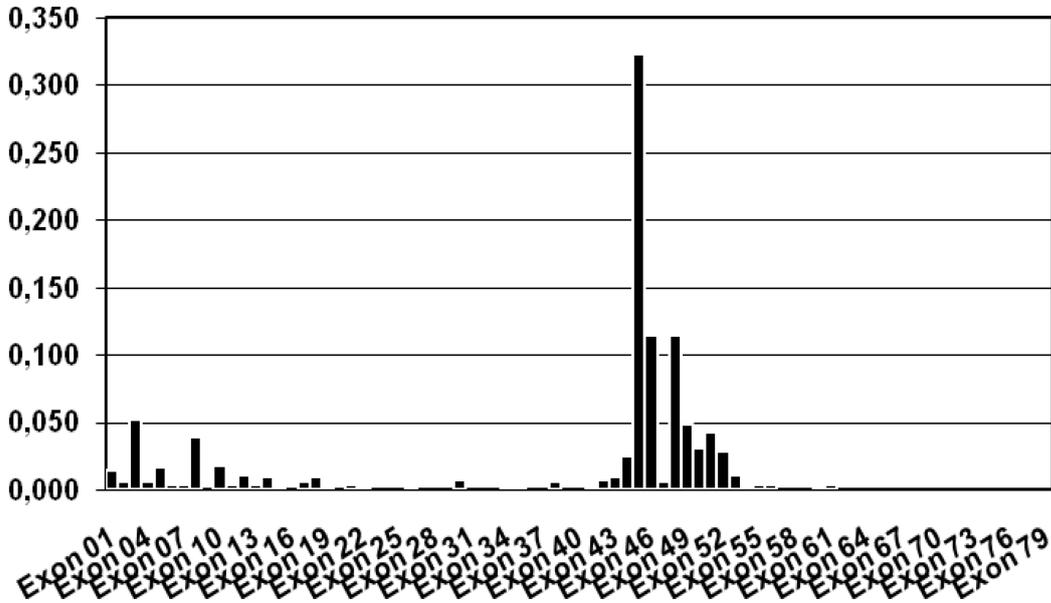


Abb. (5) Darstellung der relativen Häufigkeit der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen Gesamtheit Exon-Anfang“

Exon	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,108	286
Exon 11-20	0,159	423
Exon 21-30	0,105	279
Exon 31-40	0,064	170
Exon 41-50	0,410	1090
Exon 51-60	0,135	360
Exon 61-70	0,011	30
Exon 71-79	0,007	19
Summe	1	2657

Tab. (16) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

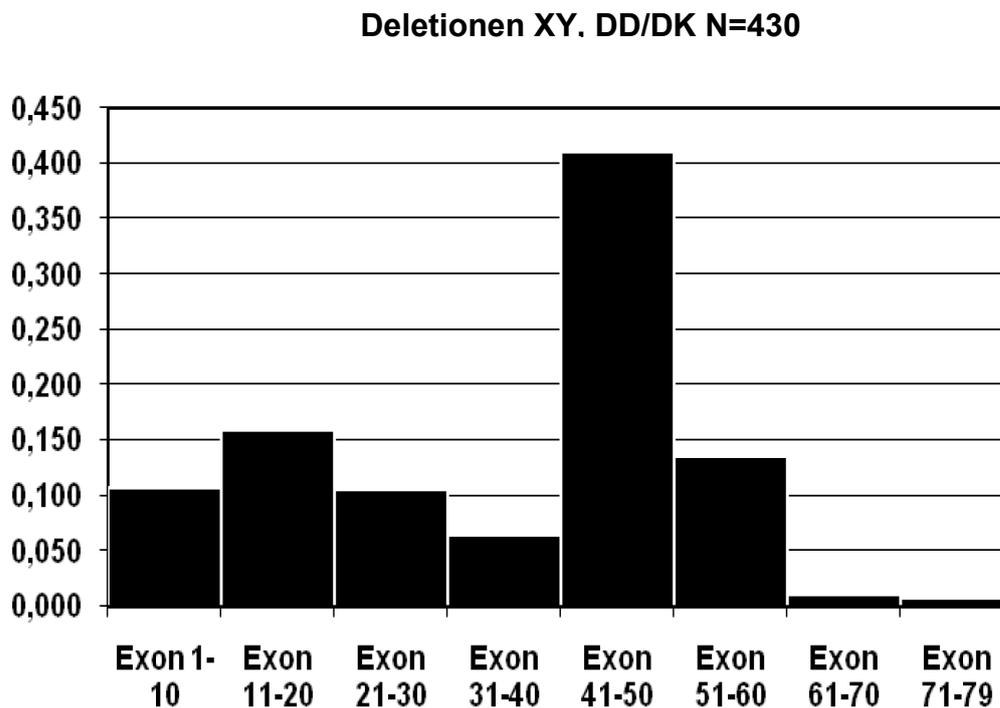


Abb. (6) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen XY, DD/DK N=430

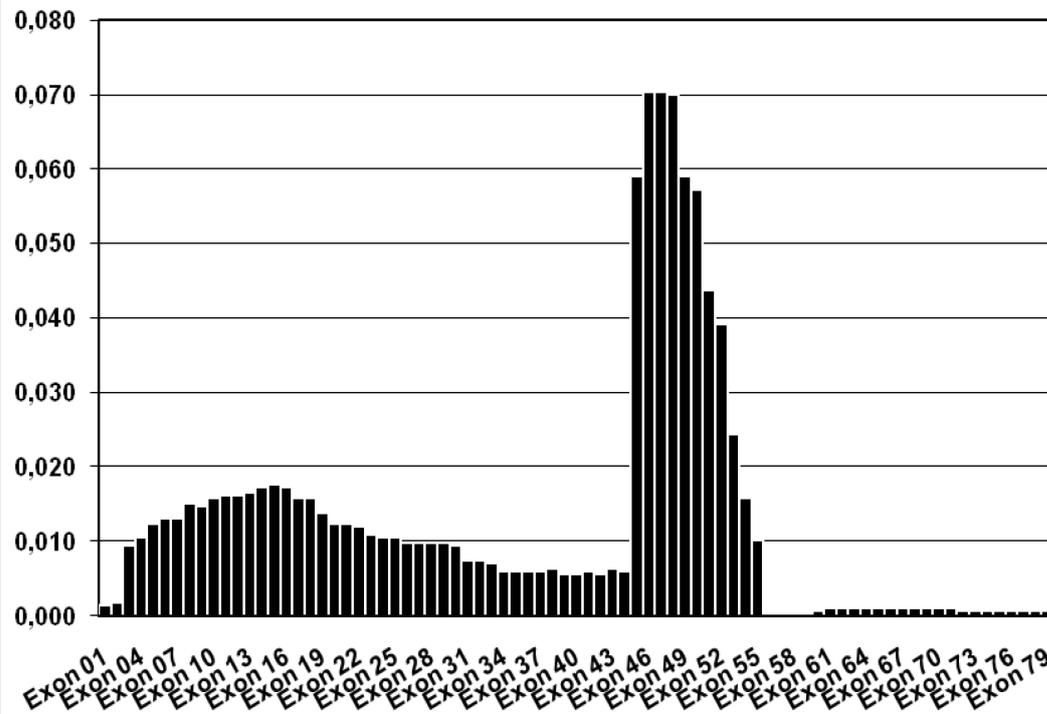


Abb. (7) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK“

Deletionen XY, DD/DK Exon- Anfang N=430	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,15349	66
Exon 11-20	0,04186	18
Exon 21-30	0,01628	7
Exon 31-40	0,00930	4
Exon 41-50	0,69070	297
Exon 51-60	0,08372	36
Exon 61-70	0,00465	2
Exon 71-79	0,00000	0
Summe	1	430

Tab. (17) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen XY, DD/DK Exon-Anfang N=430

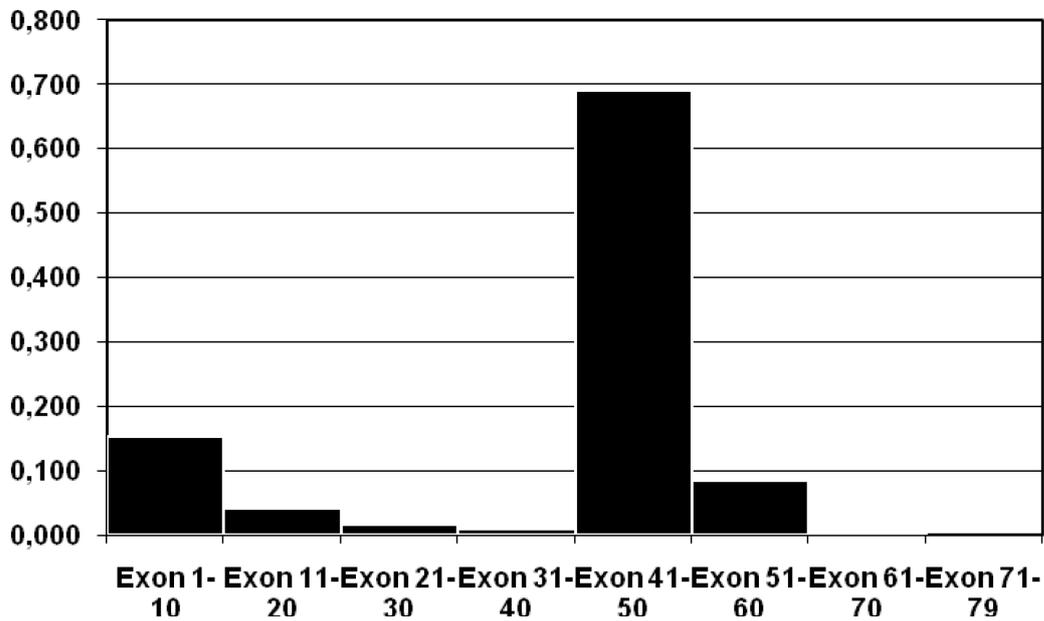


Abb. (8) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Deletionen XY, DD/DK Exon-Anfang N=430

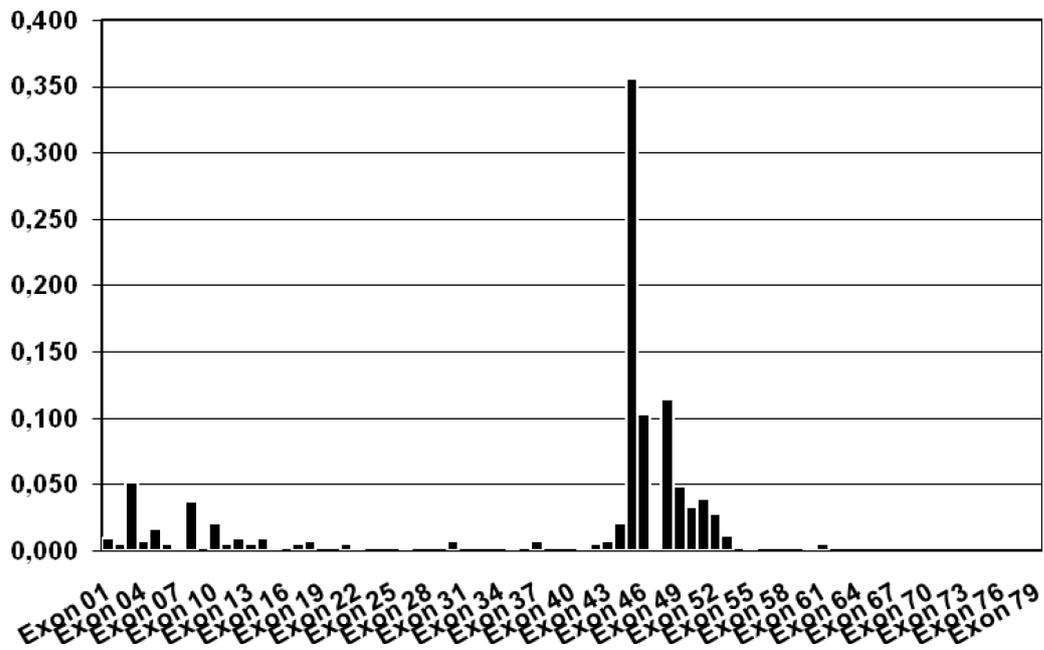


Abb. (9) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Deletionen XY, DD/DK Exon-Anfang“

Duplikationen Gesamtheit N=84	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,232	144
Exon 11-20	0,190	118
Exon 21-30	0,144	89
Exon 31-40	0,119	74
Exon 41-50	0,094	58
Exon 51-60	0,139	86
Exon 61-70	0,061	38
Exon 71-79	0,021	13
Summe	1	620

Tab. (18) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen Gesamtheit N=84

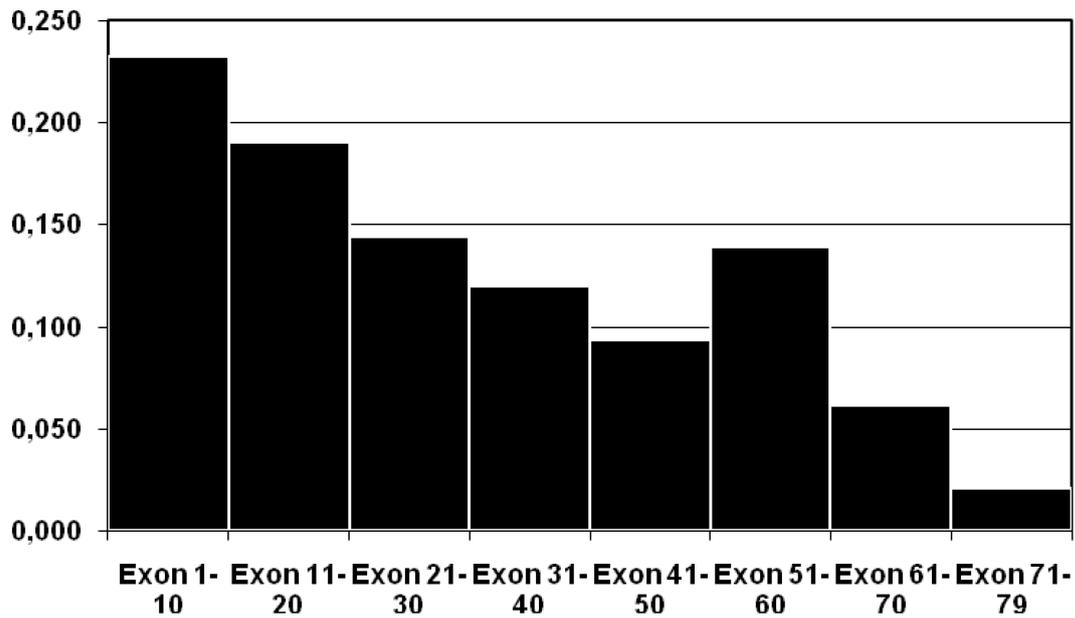


Abb. (10) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen Gesamtheit N=84

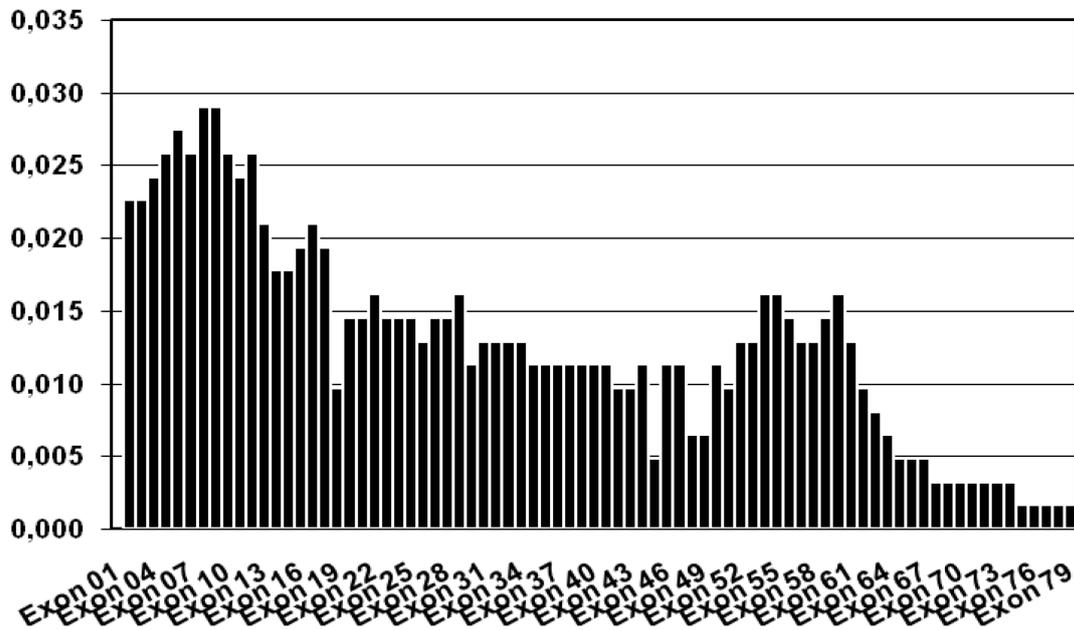


Abb. (11) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit“

Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang N=84	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,453	39
Exon 11-20	0,151	13
Exon 21-30	0,047	4
Exon 31-40	0,023	2
Exon 41-50	0,140	12
Exon 51-60	0,163	14
Exon 61-70	0,023	2
Exon 71-79	0,000	0
Summe	1	86

Tab. (19) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang N=84

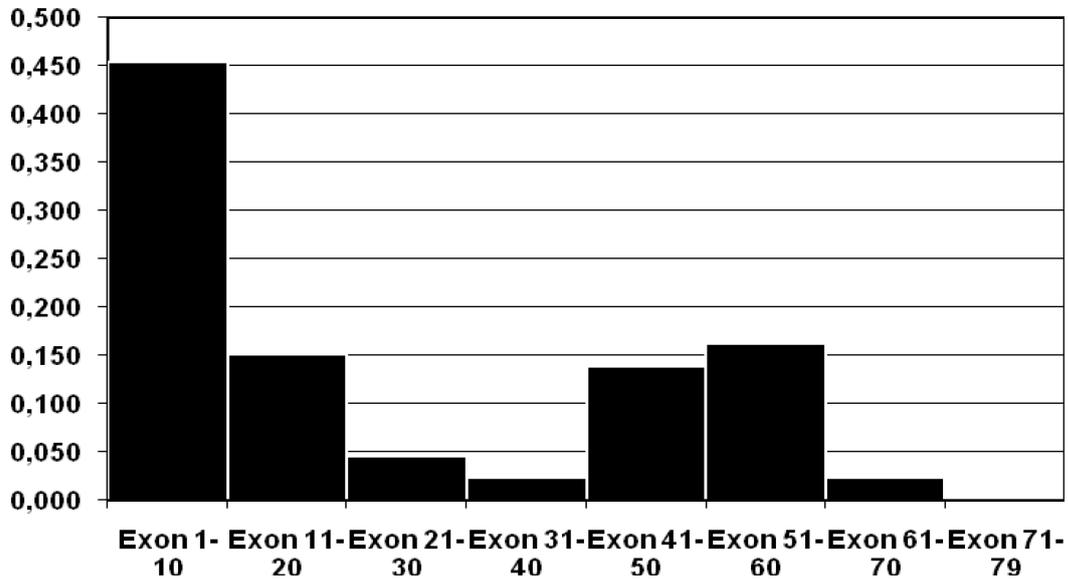


Abb. (12) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang N=84

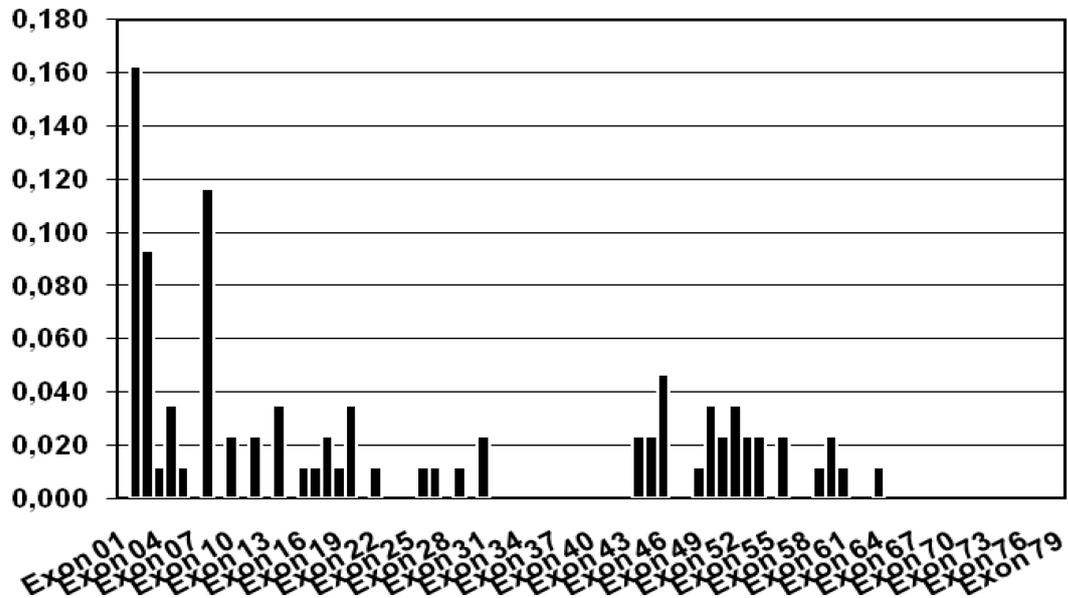


Abb. (13) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen Gesamtheit Exon-Anfang“

Duplikationen XY, DD/DK N=58	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,213	99
Exon 11-20	0,202	94
Exon 21-30	0,148	69
Exon 31-40	0,116	54
Exon 41-50	0,077	36
Exon 51-60	0,142	66
Exon 61-70	0,073	34
Exon 71-79	0,028	13
Summe	1	465

Tab. (20) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen XY, DD/DK N=58

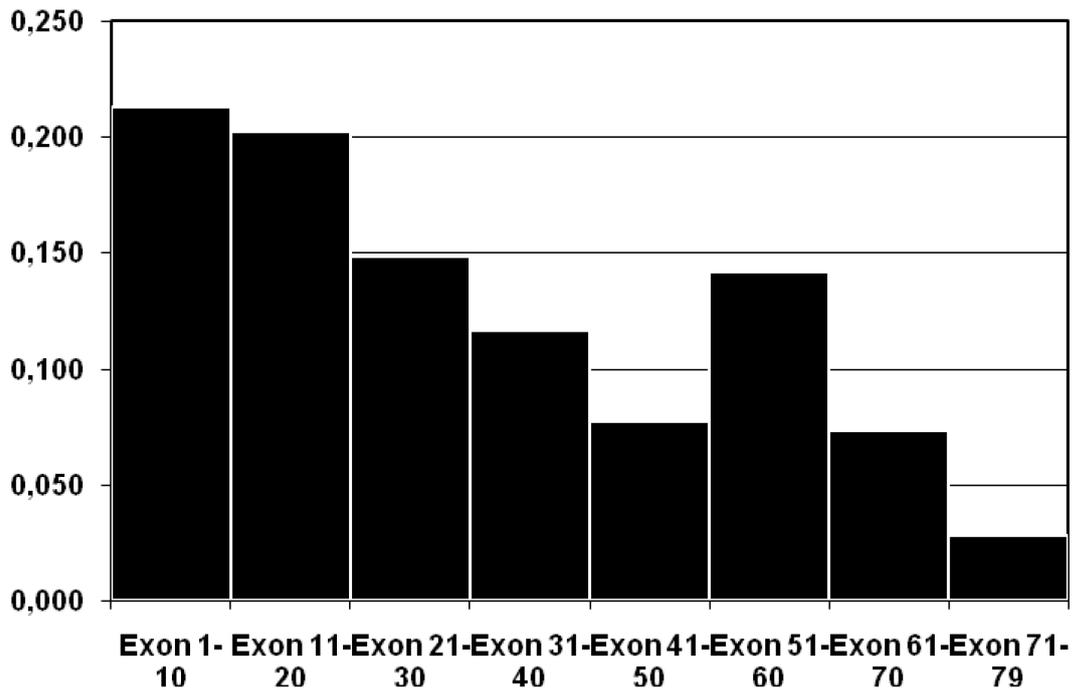


Abb. (14) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen XY, DD/DK N=58

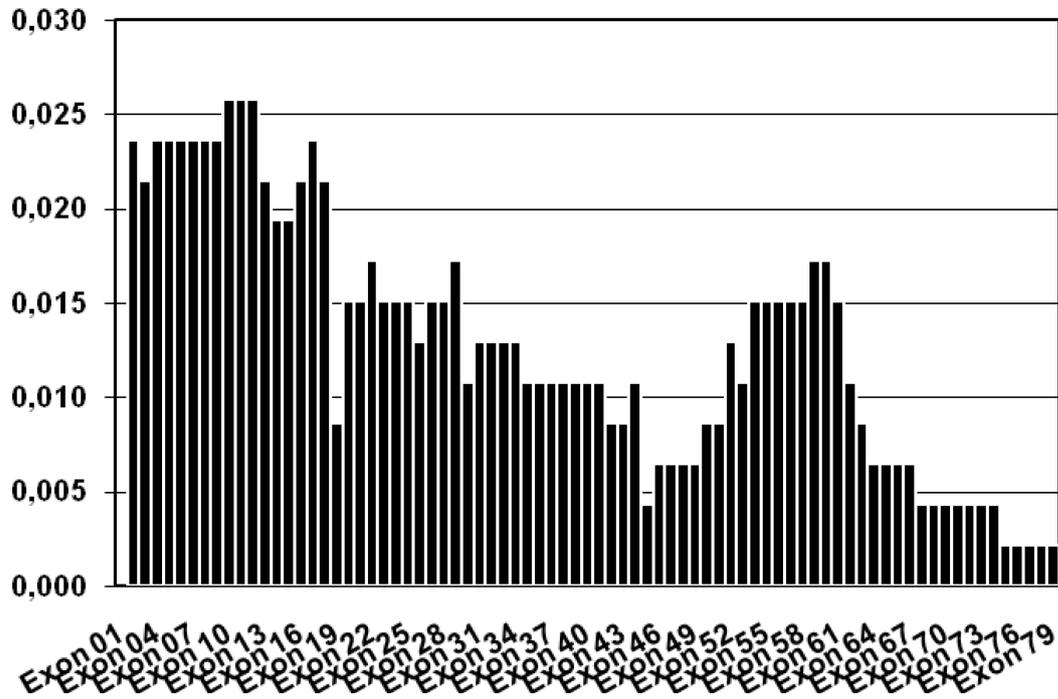


Abb. (15) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK“

Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang N=58	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,400	24
Exon 11-20	0,183	11
Exon 21-30	0,067	4
Exon 31-40	0,033	2
Exon 41-50	0,083	5
Exon 51-60	0,200	12
Exon 61-70	0,033	2
Exon 71-79	0,000	0
Summe	1	60

Tab. (21) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang N=58

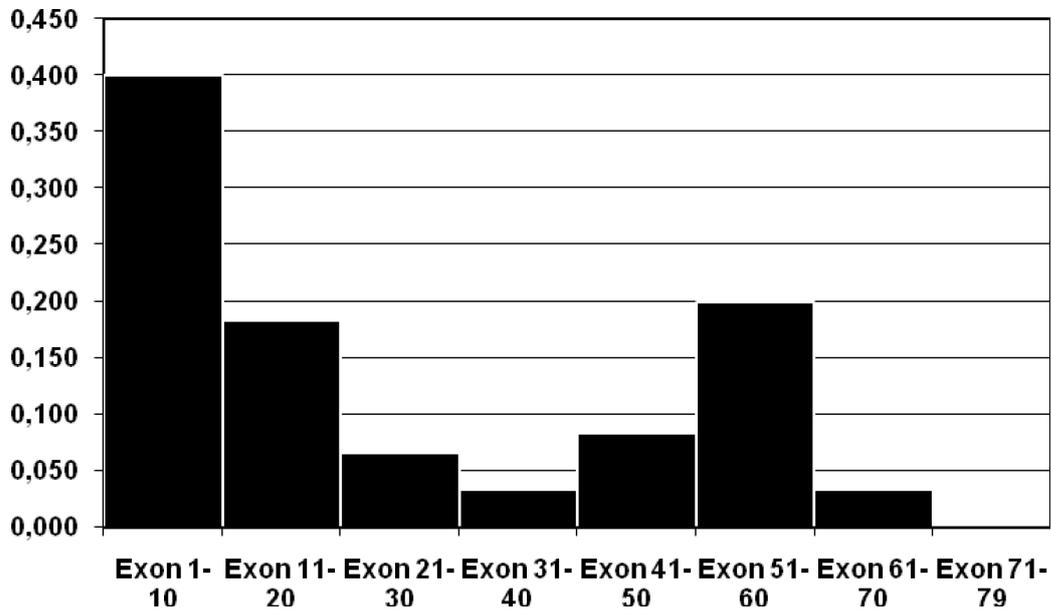


Abb. (16) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang“ in Exon-Zehnergruppen

Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang N=58

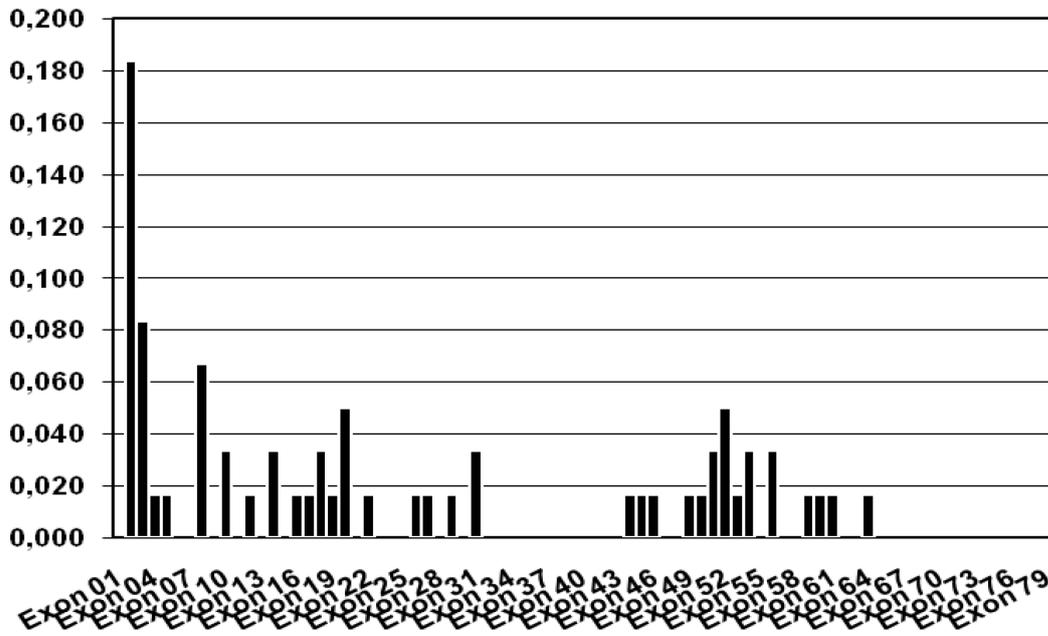


Abb. (17) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Duplikationen XY, DD/DK Exon-Anfang“

Punktmutationen Gesamtheit N=99	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,182	18
Exon 11-20	0,141	14
Exon 21-30	0,101	10
Exon 31-40	0,192	19
Exon 41-50	0,081	8
Exon 51-60	0,101	10
Exon 61-70	0,192	19
Exon 71-79	0,010	1
Summe	1	99

Tab. (22) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Punktmutationen Gesamtheit N=99

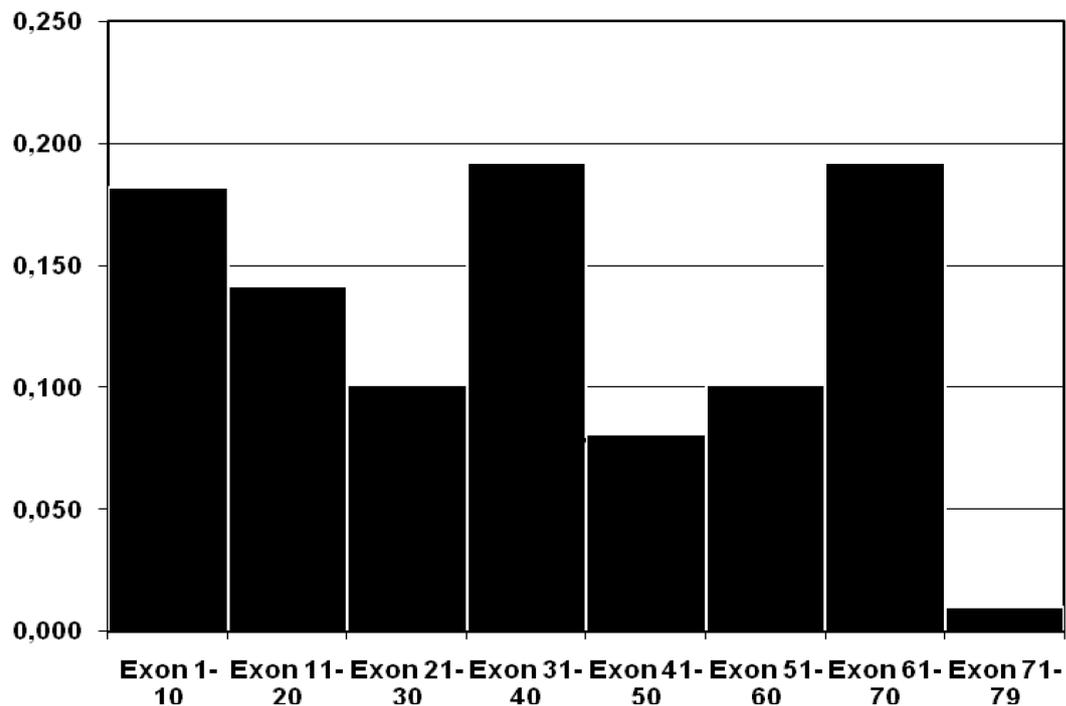


Abb. (18) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen Gesamtheit“ in Exon-Zehnergruppen

Punktmutationen Gesamtheit N=99

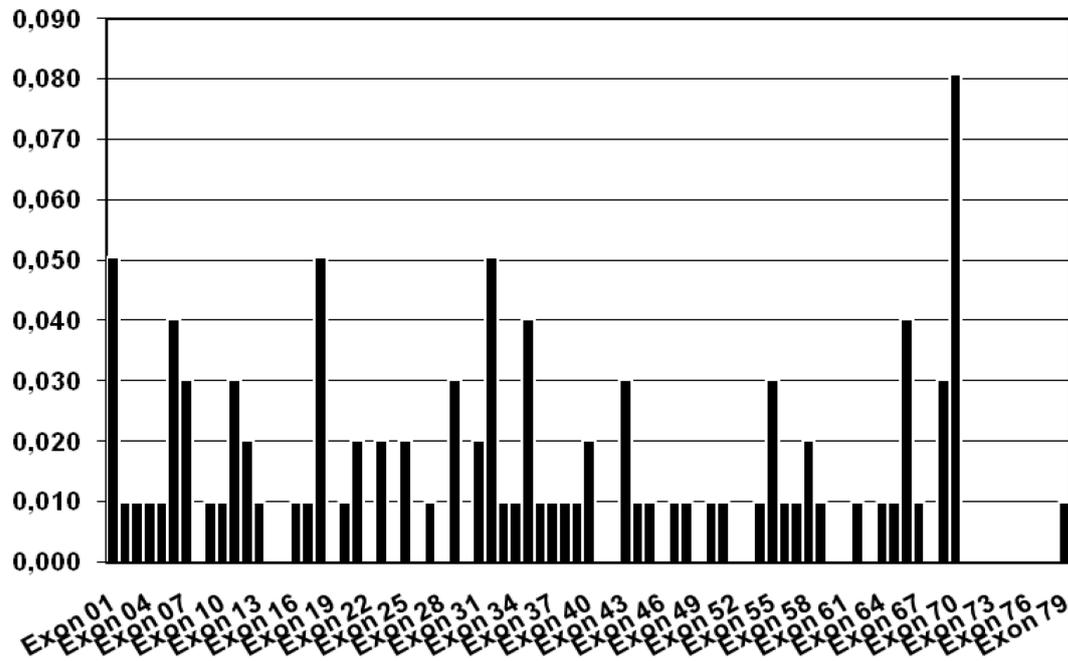


Abb. (19) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen Gesamtheit“

Punktmutationen XY, DD/DK N=80	Häufigkeiten	
	relativ	absolut
Exon 1-10	0,188	15
Exon 11-20	0,163	13
Exon 21-30	0,075	6
Exon 31-40	0,188	15
Exon 41-50	0,088	7
Exon 51-60	0,113	9
Exon 61-70	0,175	14
Exon 71-79	0,013	1
Summe	1	80

Tab. (23) Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen XY; DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

Punktmutationen XY, DD/DK N=80

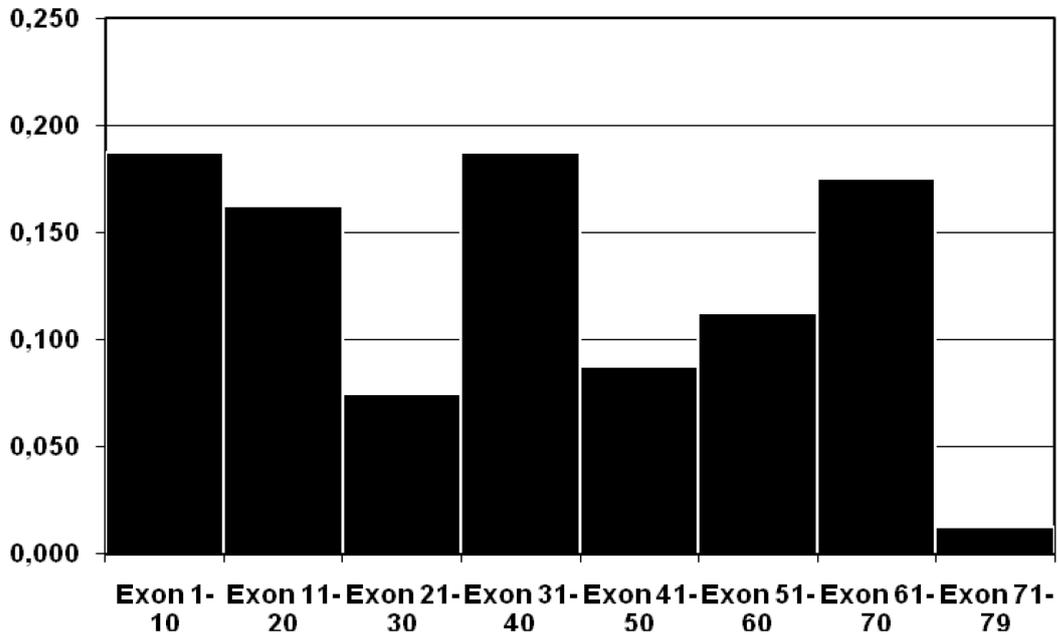


Abb. (20) Darstellung der relativen Häufigkeiten der betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen XY, DD/DK“ in Exon-Zehnergruppen

Punktmutationen XY, DD/DK N=80

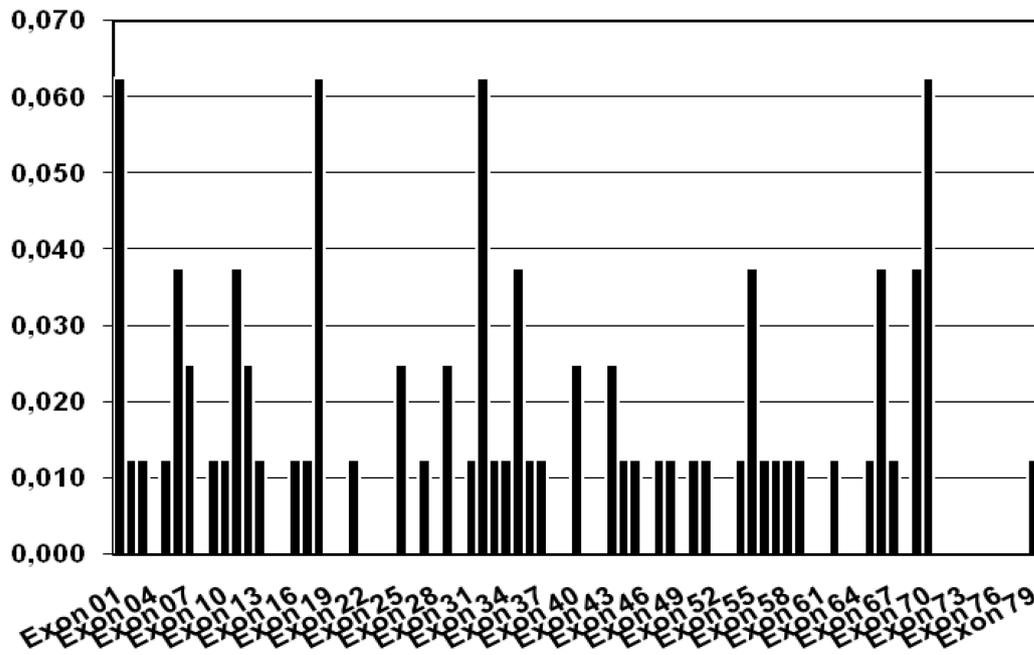


Abb. (21) Darstellung der relativen Häufigkeiten der einzelnen betroffenen Exons der Gruppe „Punktmutationen XY, DD/DK“

5.2.3 Prüfung der Gleichverteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Prüfung auf Gleichverteilung der einzelnen Mutationen auf das Dystrophin-Gen dargestellt. Dies erfolgt sowohl für die Gruppe „Gesamtheit“ als auch für die Gruppe „XY, DD/DK“. Die Verteilungen wurden zum einen für alle betroffenen Exons und zum anderen nur für das erste betroffene Exon (Exon-Anfang) im Dystrophin-Gen ausgewertet. Hierfür wurde der bereits beschriebene Chi-Quadrat-Test verwendet. Wie bereits erläutert, entfällt für die Punktmutationen die Auswertung der Verteilung der Exon Anfänge, da diese jeweils nur in einem Exon lokalisiert sind. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgezeigt. Die fettgedruckten p-Werte stellen ein signifikantes Ergebnis dar, welches das Verwerfen von H0 zur Folge hat. Somit ergibt sich eine Ungleichverteilung in der Verteilung der Mutationen für die Deletionen und Duplikationen in allen Gruppen, sowohl für alle betroffenen Exons, als auch für das erste betroffene Exon (Exon-Anfang).

H0: Gleichverteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen	χ^2	p-Wert
Deletionen Gesamtheit	2815,38	0,00E+00
Deletionen XY, DD/DK	2357,34	0,00E+00
Duplikationen Gesamtheit	150,23	3,62E-29
Duplikationen XY, DD/DK	100,91	7,00E-19
Punktmutationen Gesamtheit	9,17	1,64E-01
Punktmutationen XY, DD/DK	9,21	1,62E-01

Tab. (24) Ergebnisse der Prüfung der Gleichverteilung der Mutationen auf die Exons des Dystrophin-Gens; signifikante Werte sind fettgedruckt

H0: Gleichverteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen, Exon-Anfang	χ^2	p-Wert
Deletionen Gesamtheit	1634,59	0,00E+00
Deletionen XY, DD/DK	1286,91	4,38E-276
Duplikationen Gesamtheit	92,23	4,41E-19
Duplikationen XY, DD/DK	46,33	7,77E-09

Tab. (25) Ergebnisse der Prüfung der Gleichverteilung der Mutationen auf das jeweils erste betroffene Exon des Dystrophin-Gens; signifikante Werte sind fettgedruckt

5.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen

Im Anschluss wurden die beiden Gruppen „Gesamtheit“ und „XY, DD/DK“ hinsichtlich der Verteilungen sowohl der gleichen als auch unterschiedlicher Mutationen im Dystrophin-Gen miteinander verglichen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Mutationen innerhalb derselben Gruppe bezüglich ihrer Verteilung über das Dystrophin-Gen miteinander verglichen. Dies erfolgte sowohl für alle betroffenen Exons als auch nur für das erste betroffene Exon (Exon-Anfang). Für die Berechnungen wurde die Formel nach Brandt-Snedecor angewendet. Die Ergebnisse sind in den unteren Tabellen zusammengefasst und die p-Werte, die für ein signifikantes Ergebnis stehen, sind fettgedruckt. Diese zeigen somit eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung. Lediglich die Vergleiche der beiden Gruppen innerhalb der gleichen Mutation ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der betroffenen Exons über das Dystrophin-Gen.

Vergleich der Verteilungen der Mutationen innerhalb des Dystrophin-Gens, H0: Gleichverteilung	χ^2	p-Wert
Deletionen Gesamtheit mit Deletionen XY, DD/DK	4,26	7,50E-01
Duplikationen Gesamtheit mit Duplikationen XY, DD/DK	2,62	9,18E-01
Punktmutationen Gesamtheit mit Punktmutationen XY, DD/DK	0,60	9,96E-01
Deletionen mit Duplikationen (Gesamtheit)	291,26	4,43E-59
Deletionen mit Punktmutationen (Gesamtheit)	167,65	1,42E-33
Duplikationen mit Punktmutationen (Gesamtheit)	20,13	2,62E-03
Deletionen mit Duplikationen (XY, DD/DK)	273,82	2,34E-55
Deletionen mit Punktmutationen (XY, DD/DK)	138,12	2,50E-27
Duplikationen mit Punktmutationen (XY, DD/DK)	11,17	8,31E-02

Tab. (26) Ergebnisse der Vergleiche der Verteilungen der Mutationen auf die Exons des Dystrophin-Gens, signifikante Werte sind fettgedruckt

Vergleich der Verteilungen der Mutationen innerhalb des Dystrophin-Gens, Exon-Anfang, H0: Gleichverteilung	χ^2	p-Wert
Deletionen Gesamtheit mit Deletionen XY, DD/DK	0,35	9,97E-01
Duplikationen Gesamtheit mit Duplikationen XY, DD/DK	2,19	7,00E-01
Deletionen mit Duplikationen (Gesamtheit)	94,40	1,53E-19
Deletionen mit Punktmutationen (Gesamtheit)	264,51	3,25E-54
Duplikationen mit Punktmutationen (Gesamtheit)	27,17	1,84E-05
Deletionen mit Duplikationen (XY, DD/DK)	85,57	1,15E-17
Deletionen mit Punktmutationen (XY, DD/DK)	149,28	1,90E-30
Duplikationen mit Punktmutationen (XY, DD/DK)	10,91	5,32E-02

Tab. (27) Ergebnisse der Vergleiche der Verteilungen der Mutationen auf das erste betroffene Exon des Dystrophin-Gens, signifikante Werte sind fettgedruckt

5.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien

Duchenne und Becker

Es erfolgte eine Prüfung der geographischen Gleichverteilung für eine Auswahl der 1114 männlichen in Deutschland lebenden Patienten mit der Formel nach Brandt-Snedecor. Als Nullhypothese wurde die geographische Gleichverteilung der DMD und BMD innerhalb der Population angenommen. Die Gruppe der Duplikationen und Punktmutationen mit BMD wurde nicht in die Daten mit aufgenommen, da hier eine zu kleine Stichprobe vorlag. Zunächst erfolgte die Überprüfung der 756 Patienten mit gesicherter Diagnose auf geographische Gleichverteilung. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Ungleichverteilung in dieser Personengruppe. In der weiteren Prüfung sowohl der einzelnen Mutationen, als auch der beiden Erkrankungen unabhängig voneinander, ergab sich lediglich bei den Patienten mit Duplikationen als auch mit Duplikationen und klinischer DMD eine geographische Gleichverteilung. Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt folgende Tabelle, die signifikanten p-Werte sind fettgedruckt.

Geographische Verteilung der DMD/BMD (XY Wohnsitz BRD) H0: Gleichverteilung	χ^2	p-Wert
Gesicherte Diagnose und Gesicherte Diagnose, unklare Mutation	40,50	6,16E-06
Gesicherte Diagnose		
Deletionen	20,54	1,48E-02
Duplikationen	9,55	2,98E-01
Punktmutationen	26,68	1,58E-03
Gesicherte Diagnose, unterteilt nach DMD und BMD		
Deletionen DMD	20,54	1,48E-02
Deletionen BMD	16,84	5,12E-02
Duplikationen DMD	1,51	9,59E-01
Punktmutationen DMD	16,71	3,33E-02

Tab. (28) Ergebnisse der Prüfung der geographischen Gleichverteilung bei Männern mit Wohnsitz in der BRD, signifikante Werte sind fettgedruckt

6. Diskussion

6.1 Häufigkeiten der Mutationstypen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei den Mutationen im Dystrophin-Gen zu etwa 65 Prozent um Deletionen, zu 7 Prozent um Duplikationen und zu 26 Prozent um Punktmutationen. Bei circa 2 Prozent der Fälle bleibt die Mutation unentdeckt (12, 20, 21). Aus den eigenen Daten errechnete sich zunächst bei einem Patientenstamm von 663 männlichen Individuen, die sich in 503 Patienten mit Deletionen, 71 Patienten mit Duplikationen und 89 Patienten mit Punktmutationen aufteilen, eine relative Häufigkeit von etwa 76 Prozent Deletionen, 11 Prozent Duplikationen und nur 13 Prozent Punktmutationen. Aufgrund der Tatsache, dass ein Punktmutationsscreening erst Anfang der neunziger Jahre etabliert wurde, erschien es sinnvoll, zu den 89 Patienten mit Punktmutationen die Gruppe der 117 männlichen Patienten mit „Gesicherter Diagnose, unklare Mutation“ hinzuzunehmen, da die Datensammlung ab dem Jahr 1983 beginnt und somit eine Lücke von circa zehn Jahren bezüglich des Punktmutationsscreenings besteht. Aus dem neuen Datensatz von nun insgesamt 780 männlichen Patienten ergibt sich eine Verteilung von etwa 64 Prozent Deletionen, 9 Prozent

Duplikationen und 26 Prozent Punktmutationen. Die errechneten Werte sind im Einklang mit den bisher in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten für die Verteilung der Mutationen bei DMD und BMD.

6.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen

Bei der Betrachtung der Verteilung der Mutationen auf die gebildeten Zehnergruppen von Exons ergab sich sowohl für die Gruppe der „Deletionen Gesamtheit“, als auch für die Gruppe der „Deletionen XY, DD/DK“ eine eindeutige hot spot Region für die Exons 41 - 50. Eine zweite kleinere hot spot Region geht von den Exons 11 - 20 aus. Hinsichtlich der Verteilung der Deletionen auf die einzelnen Exons kann die hot spot Region von Exon 45 - 54 noch etwas genauer definiert werden. Bei der Betrachtung des ersten betroffenen Exons der Deletionen (Exon-Anfang) hebt sich das Exon 45 in beiden Gruppen hervor. Die Prüfung der Gleichverteilung der Deletionen über die Exons des Dystrophin-Gens ergab in beiden Gruppen eine Ungleichverteilung. In bisherigen Studien konnten für die Verteilung von Deletionen im Dystrophin-Gen zwei hot spot Regionen gezeigt werden. Diese betreffen die Exons 2 - 19 und 44 - 52 (27, 28, 29). Vor allem in der zweitgenannten Region ergab sich eine Übereinstimmung zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit; die erstgenannte Region fällt in dem eigenen Datensatz von Exon 11 - 20 etwas kleiner aus.

Hinsichtlich der Verteilung der Duplikationen auf die Exons des Dystrophin-Gens lässt sich eine vermehrte Dichte im Bereich der Exons 1 - 20 erkennen. Die statistische Prüfung der Verteilung der Duplikationen auf die Exons ergab in beiden Gruppen eine Ungleichverteilung. Bei der Betrachtung der Exon-Anfänge der Duplikationen sticht in beiden Gruppen Exon 2 als besonders häufig betroffenes Exon heraus. Insgesamt ist eine Häufung von Duplikationen in den vorderen Exon-Bereichen, am 5'-Ende des Gens, bekannt, wobei insbesondere Exon 2 als bei weitem am Häufigsten betroffen beschrieben wurde (32, 33). Die eigenen Ergebnisse stimmen somit mit den bekannten Verteilungen der Duplikationen auf das Dystrophin-Gen überein.

In der Darstellung der Verteilung der Punktmutationen fällt auf, dass sich hier keine bestimmte Region von häufiger betroffenen Exons bestimmen lässt. Vier Exons scheinen sowohl in der Gruppe „Punktmutationen Gesamtheit“, als auch „Punktmutationen XY, DD/DK“ häufiger betroffen zu sein. Es handelt sich hierbei um Exon 1, 18, 32 und 70. Bei der Prüfung der Verteilung der Punktmutationen über das Dystrophin-Gen ergab sich jedoch eine Gleichverteilung, so dass die vier oben beschriebenen Exons nicht statistisch signifikant häufiger betroffen sind. Dies entspricht den Ergebnissen einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2009, die ebenso zu dem Ergebnis gelangt, dass keine hot spot Regionen in der Verteilung der Punktmutationen über das Dystrophin-Gen existieren (34).

6.3 Vergleiche der Verteilungen der Mutationen im Dystrophin-Gen

Im Weiteren wurden die Gruppen „Gesamtheit“ und „XY, DD/DK“ hinsichtlich der Verteilungen der einzelnen Mutationen auf die Exons des Dystrophin-Gens miteinander verglichen. Es zeigten sich für alle drei Mutationsarten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung zwischen den beiden Gruppen. Das heißt, dass sich die gleiche Mutation sowohl bei den erkrankten männlichen Patienten, als auch in der Gesamtheit mit den eingeschlossenen Konduktorinnen in gleicher Weise auf die Exons des Dystrophin-Gens verteilt.

Beim Vergleich der verschiedenen Mutationstypen untereinander sowohl in der Gruppe „Gesamtheit“, als auch in der Gruppe „XY, DD/DK“ hinsichtlich ihrer Verteilung auf das Dystrophin-Gen zeigten sich unterschiedliche Verteilungen für alle untersuchten Mutationstypen. Das bedeutet, dass Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen keine Gemeinsamkeiten bezüglich der Verteilung der betroffenen Exons über das Dystrophin-Gen aufweisen.

6.4 Geographische Verteilung der Muskeldystrophien

Duchenne und Becker

Für die geographische Verteilung wurde eine Gleichverteilung innerhalb der Population angenommen. Es zeigte sich jedoch lediglich in der Gruppe der

Duplikationen und der Duplikationen mit DMD eine Gleichverteilung. In allen anderen Gruppen fand sich eine Ungleichverteilung der DMD und BMD in der Population. Dies wurde am Ehesten darauf zurückgeführt, dass zwar aus ganz Deutschland Materialeinsendungen für molekulargenetische Untersuchungen am Institut für Humangenetik in Würzburg erfolgten, jedoch auch andere Institute diese Untersuchungen durchführten, so dass die Einsendungen nach Würzburg regionalen Schwankungen unterlagen. Somit konnte mit diesen Daten eine Gleichverteilung der Erkrankungen in der Population nicht bestätigt werden.

7. Zusammenfassung

Die progressiven Muskeldystrophien Duchenne und Becker entstehen durch verschiedene Mutationstypen im Dystrophin-Gen, welches 79 Exons aufweist und sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms befindet. Da über diese Erkrankungen bereits einige Daten bezüglich der Häufigkeit der Mutationstypen (Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen) sowie der Verteilung der einzelnen Mutationen auf die Exons des Dystrophin-Gens vorliegen, war es von Interesse, die Daten, von über einen Zeitraum von 25 Jahren (1983 - 2007) molekulargenetischer Diagnostik am Institut für Humangenetik in Würzburg untersuchten Personen, diesbezüglich auszuwerten. Dies wurde mit einer Stichprobe von insgesamt 1365 Personen durchgeführt.

Hieraus konnte zunächst ermittelt werden, dass sich bei männlichen Patienten mit gesicherter Diagnose zu 65 Prozent Deletionen, 9 Prozent Duplikationen und 26 Prozent Punktmutationen nachweisen ließen.

Desweiteren wurde gezeigt, dass sich bei der Verteilung der Deletionen auf das Dystrophin-Gen zwei hot spot Regionen finden, eine größere im Bereich der Exons 45 - 54 und eine kleinere im Bereich 11 - 20. Die Duplikationen weisen demgegenüber eine Häufung der betroffenen Exons am Anfang des Gens auf, wobei Exon 2 am häufigsten das erste betroffene Exon darstellt. Die Punktmutationen dagegen verteilen sich zufällig über das Gen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass hinsichtlich der Verteilung der gleichen Mutationen auf das Dystrophin-Gen zwischen einer Gruppe von männlichen Patienten und der Gesamtheit aller Probanden einschließlich Konduktorinnen keine Unterschiede bestehen. Dagegen unterschieden sich die verschiedenen Mutationstypen im Vergleich miteinander hinsichtlich ihrer Verteilung auf das Dystrophin-Gen.

Bei der Untersuchung der geographischen Verteilung der DMD und BMD konnte lediglich bei den Duplikationen eine Gleichverteilung in Deutschland bestätigt werden.

8. Abkürzungsverzeichnis

DMD	Muskeldystrophie Duchenne
BMD	Muskeldystrophie Becker
EKG	Elektrokardiogramm
XX	Frauen
XY	Männer/männliche Patienten
DD	Differentialdiagnostik
DK	Differential- und Konduktorinnendiagnostik
KO	Konduktorinnendiagnostik
PD	Pränataldiagnostik
PK	Pränatal- und Konduktorinnendiagnostik

9. Literaturverzeichnis

- (1) Zierz S, Jerusalem F (2003) Muskelerkrankungen. Thieme, Stuttgart
- (2) Becker PE (1940) Die Einteilung der Muskeldystrophien. Nervenarzt 13:209-214
- (3) Kress W, Mortier W, Müller CR, Grimm T (2002) Erkrankungen des Muskels: Muskeldystrophien. In Rieß O, Schöls L, Neurogenetik. Kohlhammer, Stuttgart
- (4) Bakker E, van Ommen GJB (1998) Duchenne and Becker muscular dystrophy. In Emery AEH, ed. Neuromuscular Disorders: Clinical and molecular genetics. John Wiley & Sons, Chichester
- (5) Nigro G, Comi L, Politano L, Bain RJ (1990) The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. Int J Cardiol 26:271-277
- (6) Grimm T, Kress W, Meng G, Müller-Reible CR (2009) Muskeldystrophien Duchenne und Becker: Molekulargenetische Diagnostik und genetisches Modell. medgen 21:327-331
- (7) Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. Neuromuscul Disord 1:19-29
- (8) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50:509-517
- (9) Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323:646-650

- (10) Monaco AP, Kunkel LM (1987) A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. *TIG* 3:33-37
- (11) Kingston HM, Sarfarazi M, Thomas NST, Harper PS (1984) Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum Genet* 67:6-17
- (12) Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, Anand R, Coffey AJ, Bentley DR, Steensma HY, van Ommen GJB (1992) Reconstruction of the 2,4 MB human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1:19-28
- (13) Roberts RG, Bentley DR, Barby TF, Manners E, Bobrow M (1990) Direct diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet* 336:1523-1526
- (14) Hoffman EP, Brown RH jr., Kunkel LM (1987) Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928
- (15) Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loire JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM (1988) Characterisation of dystrophin in muscle biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Eng J Med* 318:1363-1368
- (16) Campbell KP, Kahl SD (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262
- (17) Sachs L (1992) *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin Heidelberg
- (18) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2:90-95

- (19) Koenig M, Beggs AH, Moyer M (1989) The Molecular Basis for Duchenne versus Becker Muscular Dystrophy: Correlation of Severity with Type of Deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506
- (20) White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, Janson AA, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT (2006) Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat* 27:938-945
- (21) Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Recan D, Peccate C, Burghes AH, Beroud C, Garcia L, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F (2007) Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Hum Mutat* 28: 183-195
- (22) Cohen HJ, Molnar GE, Taft LT (1968) The genetic relationship of progressive muscular dystrophy (Duchenne type) and mental retardation. *Develop Med Child Neurol* 10:754-765
- (23) Gärtner J (2004) Erkrankungen des Nervensystems. In Koletzko B, *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. Springer, Berlin Heidelberg
- (24) Kirschner J (2009) Diagnose und Therapie der Muskeldystrophie Duchenne und Becker. *medgen* 21:322-326
- (25) Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan AV (2008) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1:CD003725.DOI:10.1002/14651858.CD003725. pub3
- (26) Manzur AY, Kinali M, Muntoni F (2008) Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 93:986–990
- (27) Kunkel LM (1986) Analysis of deletions in the DNA of patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 322:73-75

- (28) Wapennar MC, Klevits T, Harti KA (1988) A deletion hot spot in the Duchenne muscular Dystrophy gene. *Genomics* 2:10-18
- (29) Singh V, Sinha S, Mishra S, Chaturvedi LS, Pradhan S, Mittal RD, Mittal B (1997) Proportion and pattern of dystrophin gene deletions in North Indian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Genet* 99:206–208
- (30) Hu X, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG (1990) Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet* 46:682-695
- (31) Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR (1992) Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2331-2335
- (32) White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers ALJ, Lalic T, Janson AAM, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT (2006) Duplications in the DMD Gene. *Hum Mutat* 27:938-945
- (33) Gualandi F, Neri M, Bovolenta M, Martoni E, Rimessi P, Fini S, Spitali P, Fabris M, Pane M, Angelini C, Mora M, Morandi L, Mongini T, Bertini E, Ricci E, Vattermi G, Mercuri E, Merlini L, Ferlini A (2009) Transcriptional behavior of DMD gene duplications in DMD/BMD males. *Hum Mutat* 30:E310-319
- (34) Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausen A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ; United Dystrophinopathy Project Consortium, Weiss RB (2009) Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of

modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 30:1657-1666

- (35) Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM (1990) Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 86:45-48
- (36) Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 23:11141-11156
- (37) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:57-57

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm für die Überlassung des Themas und die stets hervorragende Unterstützung und Beratung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitarbeitern der Medizinischen Genetik möchte ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung danken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. A. Reif bedanke ich mich für die Durchführung der mündlichen Prüfung.

Herrn P. P. Michalke danke ich für die Hilfe bei orthographischen Fragen.

Meinen Eltern danke ich sehr für die stetige Unterstützung während meiner akademischen Ausbildung.

Abschließend danke ich Tomek vielmals für seine Unterstützung.