

Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Muskeldystrophien Duchenne und Becker

Berufsverband Medizinische Genetik e.V. – Qualitätssicherung

Federführende Autoren

Clemens R. Müller¹
Timo Grimm²,
Thomas Bettecken³,
Bernd Dworniczak⁴,
Peter Steinbach⁵

1 Institut für Humangenetik, Würzburg
2 Abt. für Medizinische Genetik im Institut für Humangenetik, Würzburg
3 Institut für Humangenetik, Magdeburg
4 Institut für Humangenetik, Münster
5 Abt. Klinische Genetik, Ulm

Vorwort

Mutationen im Dystrophin-Gen sind die genetischen Ursachen der Muskeldystrophien Duchenne und Becker. Den größten Teil der Mutationen machen Deletionen aus, die eines oder mehrere der insgesamt 79 Exons umfassen (etwa 60-65%). Eine kleinere Gruppe besteht aus Duplikationen eines oder mehrerer Exons (etwa 5-10%). Die restlichen Mutationen betreffen nur eines oder wenige Basenpaare in der kodierenden Sequenz oder an den Spleiß-Stellen („Punktmutationen“). Wegen des X-chromosomalen Erbgangs sind nahezu alle Patienten männlichen Geschlechts. In seltenen Fällen können auch Überträgerinnen betroffen sein, bis hin zu schwer verlaufenden Muskelerkrankungen. Auch bei einem sporadischen Fall einer Patientin mit Muskelschwäche ist daher immer auch ein Konduktorinnenstatus für eine Dystrophinopathie in Betracht zu ziehen.

Eine molekulargenetische Diagnostik wird meist durch eine der folgenden Fragestellungen veranlasst:

- (1) zur Differentialdiagnostik von betroffenen Patienten,
- (2) zur Heterozygotendiagnostik weiblicher Angehörigervon Patienten und
- (3) zur Pränataldiagnostik bei Frauen mit hohem Überträgerinnen-Risiko.

An diesen Fragestellungen orientiert sich die Auswahl der folgenden Untersuchungsstrategien.

Für die genetischen Informationen zur Struktur und Sequenz des Dystrophin-Gens, für die technischen Details zur DNA-Diagnostik und die einschlägige Literatur wird auf die „Leiden Muscular Dystrophy Homepage“ im Internet (<http://www.dmd.nl/>) verwiesen.

1 Nachweis von Deletionen

Bei der Mehrzahl der Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Muskeldystrophie Duchenne oder Becker liegt die genetische Ursache im Verlust eines oder mehrerer Exons des Dystrophin-Gens (Deletion). In fast allen Studien beträgt der Anteil der DMD/BMD-Patienten mit einer Deletion um die 60%.

1.1 Multiplex-PCR

Die Methode der Wahl zum Nachweis von Deletionen ist eine Multiplex-PCR mit den von Beggs et al. (1990) und Chamberlain et al. (1988) zusammengestellten PCR-Primerkombinationen (→ Leiden). Hiermit lassen sich diejenigen 18 Exons darstellen, die am häufigsten deletiert sind. Damit werden ca. 98% aller bisher durch cDNA-Hybridisierung beschriebenen Deletionen erfasst. *Diese 18 Primerpaare definieren den Mindestumfang einer Deletions-suche mit PCR.* Eine sinnvolle Ergänzung ist das Exon 46, das nicht selten auch einzeln deletiert sein kann. Die Analyse weiterer Exons ist wenig ergiebig für die Erfassung neuer Deletionen, kann aber zur Festlegung der Deletionsgrenzen notwendig sein (s.u.).

Für eine Multiplex-PCR sollten die Exons nach Produktlänge und Lage der Exons innerhalb des Gens so ausgewählt werden, daß alle PCR-Pro-

dukte einwandfrei identifiziert werden können und wechselseitig als interne Reaktionskontrollen dienen. Die Mitführung eines Leerwerts (= kompletter Reaktionsansatz, jedoch ohne genomische DNA) ist, wie in jeder PCR, erforderlich. Als Längenstandard eignet sich z.B. eine 100 bp-Leiter.

In der Regel ist eine Auftrennung der PCR-Produkte in Agarosegelen und Anfärbung mit Ethidiumbromid ausreichend, um alle Fragmente sicher zuzuordnen zu können. Polyacrylamidgele und alternative Färbemethoden (z.B. Silberfärbung) sind gleichfalls geeignet. Die Fragmentanalyse auf automatisierten Trennsystemen (DNA-Sequencer) ist äquivalent.

1.1.1 Differentialdiagnostik

Der Nachweis einer Deletion im Dystrophin-Gen stellt die Diagnose einer Dystrophinopathie. Wenn in der Multiplex-PCR nur ein Produkt (Exon) fehlt, muß die vermutete Deletion durch ein zweites, unabhängiges Verfahren verifiziert werden (z.B. anderes Primerpaar für dasselbe Exon, cDNA-Hybridisierung, Analyse angrenzender STSs). Eine nachgewiesene Deletion macht i.d.R. eine Muskelbiopsie zur Diagnosefindung überflüssig.

Für sehr junge Patienten, deren klinische Diagnose noch nicht feststeht, wird häufig eine prognostische Interpretation der DNA-Analyse gewünscht. Die Grundlage für die Korrelation einer molekularen Gendeletion mit dem (zu erwartenden) klinischen Verlauf und Schweregrad bildet die Leseraster-Hypothese (Monaco et al. 1988). Die

Exon-Intron-Übergänge sind für alle 79 Exons bekannt (→ Leiden). Wenn die exakten Grenzen einer Deletion bestimmt werden können, sind daher Aussagen über die Auswirkung der Gendeletion auf die Proteintranslation möglich. Zur Festlegung der Grenzen einer Deletion ist häufig zusätzlich zur Multiplex-PCR die Analyse weiterer Exons erforderlich. Diese kann sich auf die Bestimmung solcher Exons beschränken, bei deren Verlust eine Leserasterverschiebung zu erwarten ist. In mehreren retrospektiven Studien (z.B. Koenig et al. 1989) fanden sich bei DMD-Patienten in mehr als 95% der Fälle Gendeletionen, die das Leseraster verschieben („out-of-frame“- oder „frame shift“-Deletionen). Umgekehrt wurde bei mehr als 95% der BMD-Patienten das ursprüngliche Leseraster durch die Deletion nicht verändert („in-frame“-Deletionen). Die häufigste Ausnahme findet sich bei der Deletion der Exons 3-7 (Malhotra et al. 1988). Auch große „in-frame“-Deletionen können nicht immer sicher einer BMD zugeordnet werden.

Wird in der Multiplex-PCR keine Deletion gefunden, kann die klinische Verdachtsdiagnose nicht verworfen werden. Zur Abklärung der Diagnose kann eine Muskelbiopsie hilfreich sein. Dabei muß jedoch sichergestellt sein, daß immunhistochemische und/oder Western-Blot-Verfahren mit Anti-Dystrophin-Antikörpern zum Einsatz kommen. Eine rein morphologische Beurteilung auf der Basis der histologischen Standardfärbungen ist differentialdiagnostisch nicht wegweisend. Die Sequenzierung der Dystrophin-cDNA nach RT-PCR von Muskel-mRNA kommt beim derzeitigen Stand der Technik zur Diagnosefindung nur in sehr speziellen Situationen in Frage (s.u.).

Eine quantitative Multiplex-PCR zur Erfassung von heterozygoten Deletionen bei Frauen erfordert exakt kontrollierte Bedingungen und eine erhöhte Sensitivität des Nachweissystems (s.u.).

1.1.2 Pränataldiagnostik

Bei der Deletionssuche an fetaler DNA ist das Problem der Kontamination mit maternaler DNA zu beachten. Bei auffälligem Ergebnis der Multiplex-PCR muß durch die Bestimmung geeigneter

polymorpher Marker sichergestellt werden, daß der Befund nicht durch maternale Kontamination verfälscht ist.

1.2 Hybridisierung mit cDNA-Sonden

Alternativ zur Multiplex-PCR können Deletionen auch durch Southern-Blot-Hybridisierungen mit Subklonen der Dystrophin-cDNA nachgewiesen werden. Die Spaltung der genomischen DNA sollte parallel mit zwei verschiedenen Enzymen erfolgen (z.B. Hind III und Bgl II). Bei der Elektrophorese ist darauf zu achten, daß Fragmente in einem Längenbereich zwischen 0,5 und mehr als 20 kb beurteilt werden müssen. Die Zuordnung der Exons zu den einzelnen genomischen Restriktionsfragmenten ist mit wenigen Ausnahmen bekannt (→ Leiden). Der Vorteil der Methode liegt in der vollständigen Erfassung aller Deletionen, der Nachteil im hohen DNA-Bedarf, im experimentellen Aufwand und im Zeitbedarf. Aus diesem Grunde kommen cDNA-Hybridisierungen für pränatale Diagnosen i.d.R. nur zur gezielten Analyse einzelner Genabschnitte in Betracht.

2 Nachweis von Duplikationen

Bei bis zu 10% der DMD- und BMD-Fälle ist eine Duplikation von Teilen des Dystrophin-Gens ursächlich für die Muskeldystrophie. Der Nachweis einer Duplikation kann erfolgen durch

- quantitative Multiplex-PCR,
- quantitative cDNA-Hybridisierung nach konventioneller Gelelektrophorese,
- cDNA-Hybridisierung nach diskontinuierlicher Elektrophorese (z.B. „pulsed-field gel electrophoresis“, PFGE).

Die beiden ersten Methoden erfordern eine quantitative Auswertung, die entsprechend höhere Anforderungen an die kalibrierte Durchführung aller Teilschritte und die Sensitivität des Nachweisverfahrens stellen. Die cDNA-Hybridisierung nach PFGE liefert im Erfolgsfall ein qualitatives Ergebnis durch den Nachweis eines „junction“-Fragments.

Auch der Nachweis einer Duplikation im Dystrophin-Gen stellt die Diagnose

einer Dystrophinopathie. Ebenso wie durch Deletionen kann das Leseraster auch durch Duplikationen gestört bzw. erhalten werden. Bei Duplikationen kann die Leserasterhypothese für die Verlaufsprognose jedoch nicht angewandt werden, da es an größeren Korrelationsstudien fehlt.

3 Nachweis anderer Mutationen (z.B. Punktmutationen)

Prinzipiell ist es auch möglich, Punktmutationen (Basenaustausche, kleine Deletionen und Insertionen) in der kodierenden Sequenz und an den Spleiß-Stellen des Dystrophin-Gens nachzuweisen. Bisher sind mehr als 200 solcher Mutationen katalogisiert (→ Leiden), davon wurden weniger als 20 wiederholt gefunden. Es ist keine bevorzugte Genregion zu erkennen, so daß es keine vereinfachende Untersuchungsstrategie gibt.

Wegen der großen Zahl der Exons ist die bevorzugte Methode die Analyse von cDNA nach RT-PCR aus Muskel-mRNA. Ein Vorscreening auf sequenzabhängige Konformationsänderungen (z.B. SSCP, DGGE, DHPLC) kann sinnvoll sein, letztlich beweisend ist jedoch nur der Sequenzvergleich. Missense-Mutationen können nicht sicher als kausal für die Muskeldystrophie angesehen werden, da es sich auch um nichtpathogene Varianten handeln könnte.

Da ein großer Teil der Duchenne-Mutationen zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt, ist auch der Protein-Truncation-Test (PTT, Roest et al. 1993) ein geeignetes Vorscreening. Auch diese kombinierte in vitro-Transkription und -Translation der Dystrophin-cDNA geht von RT-PCR an Muskel-mRNA aus. Die Analyse ektoptischer Dystrophin-Transkripte (z.B. aus Leukozyten) erscheint für diagnostische Aussagen nicht hinreichend zuverlässig.

Wegen des hohen Zeitaufwandes und des Gebots der Wirtschaftlichkeit kommt die Suche nach Punktmutationen beim derzeitigen Stand der Analysetechnik eigentlich nur in Frage, wenn ein Mutationsnachweis zwingend indiziert ist, weil diagnostische Aussagen auf keinem anderen Wege

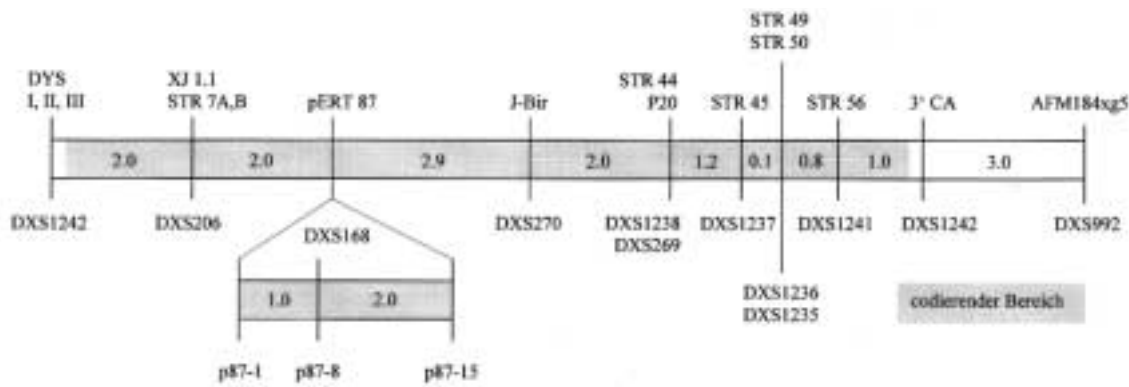


Abb 1
Rekombinationsraten der genetischen Marker im Dystrophin-Locus (in cM)

mit hinreichender Sicherheit getroffen werden können.

4 Haplotypanalyse (Segregationsanalyse)

Wenn es nicht möglich ist, die ursächliche Mutation des Index-Patienten zu ermitteln, kann dennoch in vielen Fällen eine Risikoabschätzung für weibliche Angehörige auf der Basis einer Segregationsanalyse gekoppelter DNA-Marker vorgenommen werden (Haplotypanalyse). Es stehen zahlreiche flankierende und intragene DNA-Marker zur Verfügung, deren Lokalisation im Verhältnis zu den kodierenden Sequenzen bekannt ist (→ Leiden). Wegen ihres höheren Informationsgehalts sollten generell Mikrosatelliten-Marker bevorzugt werden, für spezielle Fragestellungen können auch diallelische RFLPs hilfreich sein.

Die hohe Rate der meiotischen Rekombination zwischen den Markerloci im Dystrophin-Gen ist ein diagnostisch relevantes Problem. Die bekannten genetischen Abstände der Marker sind in Abbildung 1 dargestellt. Für die Auswertung der Segregationsdaten und die Quantifizierung des daraus abgeleiteten Risikos sind solide Kenntnisse der Koppelungsanalyse („multipoint linkage analysis“) und der speziellen Genetik des Dystrophin-Locus (s.u.) erforderlich. Wertvolle Informationen können in diesem Zusammenhang auch andere klinische Daten (z.B. Serum-CK-Werte) liefern (Keller et al. 1996).

4.1 Ermittlung des Risikohaplotyps

Bei unbekannter Mutation und/oder fehlendem Index-Patienten kann oft

eine vereinfachte Haplotypanalyse ausreichen. Geeignete Markerloci sind z.B. DXS1242 (DYSII), DXS1238 (STR 44), DXS1236 (STR49) und DXS992. Damit werden die 5'- und 3'-flankierenden Regionen des Gens und die bevorzugte distale Deletionsregion erfaßt. Die Interpretation der Haplotypen muß die Rekombinationsraten berücksichtigen.

4.2 Nachweis einer Deletion durch Allelverlust eines Markers

Vor allem mit Markern aus den bevorzugten Deletionsregionen kann u.U. eine Deletion direkt durch Allelverlust („loss of heterozygosity“) nachgewiesen werden (s.a. Heterozygotendiagnostik). Diese Methode ist besonders gut anwendbar, wenn beide Eltern der Ratsuchenden für die Untersuchung zur Verfügung stehen. Der Verlust eines elterlichen Allels ist dann meist unmittelbar erkennbar. Allelverlust kann u.U. einen Paternitätsausschluß ggf. durch zusätzliche Marker zu verifizieren, die von der vermuteten Deletion unabhängig sind. Nachgewiesene Heterozygotie für einen Marker im Bereich einer familiären Deletion schließt den Überträgerstatus aus.

5 Heterozygotendiagnostik

Die Heterozygotendiagnostik dient dem Nachweis bzw. Ausschluß eines Überträgerinnenstatus für die Muskeldystrophien Duchenne und Becker. Je nach Familienkonstellation kann ein erheblicher Untersuchungsaufwand erforderlich sein. Generell gilt, daß der Nachweis einer Deletion eine Ratsuchende mit Sicherheit als Kon-

duktorin identifiziert. Umgekehrt bedeutet der fehlende Nachweis einer Deletion nicht zwangsläufig den Ausschluß des Überträgerstatus. Es stehen folgende molekulargenetische Verfahren zur Verfügung:

- quantitative Multiplex-PCR,
- quantitative cDNA-Hybridisierung nach konventioneller Gelelektrophorese,
- cDNA-Hybridisierung nach diskontinuierlicher Elektrophorese (z.B. PFGE),
- Haplotypanalyse,
- Nachweis einer Deletion durch Allelverlust intragener Marker,
- Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

Die ersten fünf Methoden wurden bereits oben besprochen. Die FISH-Analyse beruht auf der Hybridisierung von genomischen Sonden aus dem Dystrophin-Gen an Chromosomenpräparaten. Bei bekannter Deletionen können gezielt Sonden ausgewählt werden, die vollständig innerhalb des deletierten Abschnitts liegen. Bei einer heterozygoten Deletion wird durch eine solche Sonde nur eines der beiden X-Chromosomen markiert, während im Kontrollpräparat beide Chromosomen Signale aufweisen müssen (Ried et al. 1990, Rosenberg et al. 1998). Die gleichzeitige Hybridisierung einer zweiten Sonde aus einer anderen Region des X-Chromosoms ist als interne Kon-

trolle unerlässlich. Eine diagnostische Aussage erfordert eine statistische Auswertung mehrerer Präparate.

Als Suchmethode ist FISH nur bedingt geeignet, da eine komplette Analyse des Dystrophin-Gens auf diesem Weg derzeit nicht möglich ist. Allerdings können die bevorzugten Deletionsregionen gezielt untersucht werden.

6 Spezielle Genetik des Dystrophin-Gens

Die hohe Mutationsrate des Dystrophin-Gens (ca. 10^{-4}) und die unterschiedlichen Mutationsmechanismen führen bei der Entstehung bzw. Weitergabe von Gendefekten zu einigen Abweichungen von den Mendelschen Regeln, die ggf. bei der Risikoermittlung berücksichtigt werden müssen.

6.1 Keimzellmosaik

Wiederholt sind Familien beschrieben worden, in denen mehrere Geschwister denselben Gendefekt aufwiesen, obwohl beim übertragenden Elternteil diese Mutation in somatischen Zellen (meist Leukozyten) nicht nachweisbar war (van Essen et al. 1992). Als Erklärung wird ein Mosaik aus normalen und mutierten Keimzellen angenommen (Keimzellmosaik, KZM). Nur selten erlauben es die Art der Mutation und die familiäre Konstellation, ein KZM experimentell nachzuweisen oder auszuschließen. Häufiger muß es aber bei der Risikoermittlung in Betracht gezogen und berücksichtigt werden. Die Mutter eines sporadischen Patienten hat aufgrund dieser Tatsache immer ein statistisches Risiko von 10%, weitere Kinder mit demselben Gendefekt zu bekommen, auch wenn die Mutation des erkrankten Sohnes in ihrer somatischen DNA nicht nachgewiesen werden kann (Grimm et al. 1990).

Auch somatische Mosaik sind beschrieben worden. Hier liegen die Wiederholungsrisiken zwischen denen eines KZM und der regulären X-chromosomal Mendelschen Vererbung.

6.2 Geschlechtsspezifische Mutationsraten

Alle epidemiologischen Daten stimmen darin überein, daß die Mutationsrate des Dystrophin-Gens bei Männern und Frauen per saldo etwa gleich hoch ist.

Jedoch wirken in männlichen und weiblichen Keimzellen unterschiedliche Mutationsmechanismen: Deletionen entstehen überwiegend in der Oogenese, während Punktmutationen überwiegend auf die Spermatogenese zurückgehen (Grimm et al. 1994).

Das hat unmittelbare Auswirkung auf die Risikoabschätzung nach molekulargenetischer Diagnostik, wenn der Mutationstyp bekannt ist. Ein Beispiel: a priori ist die Mutter eines sporadischen Duchenne-Patienten mit einer Wahrscheinlichkeit von 66% Konduktorin. Hat der Patient keine Deletion, so kann (in Abhängigkeit von der Familienkonstellation) dadurch das Konduktorinnen-Risiko der Mutter auf ca. 90% ansteigen, da sich die anzunehmende Punktmutation mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits in der Spermatogenese ihres Vaters ereignet hat. Über die Entstehung von Duplikationen gibt es noch keine vergleichbaren Daten, welche eine analoge Zuordnung erlauben.

Literatur

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM (1990) Detection of 98-percent DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 86:45-48.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nga Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res* 23:11141-11156.

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

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

Keller H, Emery AEH, Spiegler AJW, Apacik C, Müller CR, Grimm T (1996) Age effects on serum creatine kinase (SCK) levels in obligate carriers of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) and its implication on genetic counselling. *Acta cardiologica* 8: 27-34.

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

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG (1988) Frameshift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242:755-759.

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.

Ried T, Mahler V, Vogt P, Blonden L, van Ommen GJ, Cremer T, Cremer M (1990) Direct carrier detection by in situ suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 85:581-586.

Roest PAM, Roberts RG, Van Der Tuijn AC, Heikoop JC, Van Ommen GJB, Den Dunnen JT (1993) Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD-gene for translation-terminating mutations. *Neuromuscul Disord*. 3:391-394.

Rosenberg C, Navajas L, Vagenas DF, Bakker E, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Takata RI, Van Ommen GJB, Zatz M, Den Dunnen JT (1998) Clinical diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridization. *Neuromuscul Disord* 8: 447-452.

Van Essen AJ, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, Van Broeckhoven C, Bushby KMD et al. (1992) Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet* 88:249-257.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Clemens R. Müller
Institut für Humangenetik
Biozentrum, Am Hubland
D-97074 Würzburg

Zitierhinweis

Berufsverband Medizinische Genetik e.V., Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (1999) Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Muskeldystrophien Duchenne und Becker. *medgen* 11: 503-506.