

Zusammenfassung

Die Muskeldystrophien vom Typ Duchenne und Becker sind häufige X-chromosomal rezessive Erbkrankheiten. Da die meisten Fälle durch eine Deletion im Dystrophin-Gen verursacht werden, sind zuverlässige Methoden für den Deletionsnachweis bei Überträgerinnen erforderlich. Hier beschreiben wir die verfügbaren Methoden wie Mikrosatelliten-Analyse, FISH, RT-PCR, Southern-Blot Analyse und quantitative PCR. Die FISH-Diagnostik mit dystrophin-gen-spezifischen Cosmid-Klonen ist eine geeignete Methode zur Direkterkennung von Überträgerinnen. 70-80% der Deletionen können mit dieser Methode nachgewiesen werden. Mikrosatelliten-Analyse und quantitative PCR sind adäquate Alternativen, falls eine FISH-Diagnostik nicht verfügbar ist. Wir zeigen, dass die Bestimmung der Kopienzahl eines Exons mittels quantitativer Multiplex-PCR genauer ist als die Bestimmung mittels real-time-LightCycler-PCR.

Schlüsselwörter

DMD/BMD, Überträgerinnen, Deletionen, FISH

Summary

Diagnostic approaches for carriers with deletions in the dystrophin gene

Duchenne and Becker muscular dystrophy are frequent X-linked recessive diseases. As the majority of all cases are caused by deletions in the dystrophin gene, reliable methods for deletion detection in carriers are essential. Here we describe the currently available methods like microsatellite analysis, FISH, RT-PCR, Southern blotting and quantitative PCR. FISH diagnostics, using dystrophin gene specific cosmid clones is a very appropriate method for carrier detection. 70-80% of the deletions can be found by this method. Microsatellite analysis and quantitative PCR provide adequate alternatives. Moreover, we show that for the measurement of exon copy numbers quantitative multiplex PCR is more precise than real-time PCR using the LightCycler.

Keywords

DMD/BMD, carrier, deletion, FISH

Einleitung

Die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ist die häufigste Muskelerkrankung im Kindesalter. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei etwa 1:3500 männliche Neugeborene. Die milder verlaufende Muskeldystrophie Typ Becker (BMD) tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:18 500 männliche Neugeborene auf.

Die Muskeldystrophie Duchenne ist eine progrediente, letale Erkrankung. Sie manifestiert sich im frühen Kindesalter häufig zunächst in Form von Gangstörungen der betroffenen Jungen. In der Regel wird die Diagnose im Alter von etwa 4-5 Jahren gestellt. Die Betroffenen werden etwa im Alter von 12 Jahren rollstuhlpflichtig, der Tod tritt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr ein (Boland et al. 1996). Eine kausale Behandlungsmöglichkeit der Erkrankung existiert bisher noch nicht. Klinisch kommt es bei den Patienten zu einem fortschreitenden Abbau der Muskelzellen, der mit einem erhöhten Serumkreatinkinase-Wert (CK-Wert) einhergeht; etwa bis zu 100-fache des Normwertes bei DMD und BMD. Bei ca. 60-70% der Überträgerinnen einer Muskeldystrophie Duchenne und etwa bei 50% der Überträgerinnen einer Muskeldystrophie Typ Becker liegt ebenfalls ein erhöhter CK-Wert vor (Emery 1965), so dass dessen Bestimmung auch zur Klärung der Überträgerschaft bei weiblichen Verwandten eines Betroffenen herangezogen werden kann. Während ein mehrfach erhöhter CK-Wert den Verdacht auf eine bestehende Überträgerschaft erhärtet, schließt ein normaler CK-Wert eine Überträgerschaft nicht aus. Zu-

dem weisen auch in der Durchschnittsbevölkerung etwa 5% aller Frauen erhöhte CK-Werte auf (Emery et al. 1967). Bei gesicherten Überträgerinnen einer Muskeldystrophie Duchenne sinken die Serum CK-Werte mit zunehmendem Alter ab (Sumita et al. 1998). Eine besondere Problematik ergibt sich im Falle einer bestehenden Schwangerschaft, da die CK-Werte im Verlauf der Schwangerschaft abfallen und somit deren Bestimmung zu keinem eindeutig verwertbaren Ergebnis führt (Emery et al. 1971).

Genetik

Sowohl bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne als auch bei der Muskeldystrophie Typ Becker handelt es sich um X-chromosomal-rezessiv erbliche Erkrankungen, hervorgerufen durch Mutationen im Dystrophin-Gen auf Xp21. Das Dystrophin-Gen ist mit 2,4 Mb eines der größten bisher bekannten menschlichen Gene (den Dunnen et al. 1992). Es umfasst 79 Exons und kodiert für ein 14 kb mRNA-Transkript (Roberts et al. 1990). Bei dem Genprodukt, Dystrophin, handelt es sich um ein zytoskeletäres Protein. Dieses ist bei Gesunden unterhalb der Zellmembran lokalisiert. Bei Betroffenen von einer Muskeldystrophie Duchenne fehlt dieses Protein. Im Falle einer Muskeldystrophie Typ Becker ist es entweder stark reduziert (10-40% Anteil an normalem Dystrophin), in seiner Größe verändert oder in seiner Funktion beeinträchtigt (Hoffman et al. 1988).

Etwa 60-65% der Mutationen im Dystrophin-Gen machen größere Deletionen aus, welche häufig mehrere Exons umspannen. Bei etwa 5-10% der Betroffenen liegen partielle Duplikationen eines oder mehrerer Exons vor. Sowohl Deletionen als auch Duplikationen treten bevorzugt in sog. „hotspot“-Regionen des Dystrophin-Gens auf. Die proximale „hotspot“-Region liegt am 5' Ende des Gens und umfasst die Exons 2-20, die zweite „hotspot“-Region liegt etwas weiter distal und umfasst die Exons 44-53 (den Dunnen et al. 1989). Die übrigen Erkrankungsfälle beruhen auf Punktmutationen. Etwa 30% der Betroffenen erkranken aufgrund einer Neumutation, in ca. 70% handelt es sich um familiäre Fälle, in denen die Mutter

Überträgerin der Erkrankung ist. Aufgrund des letalen Verlaufs der Erkrankung und der fehlenden kausalen Therapie suchen auch entfernte weibliche Verwandte eines Betroffenen die genetische Beratung auf, um ihre eigenen Anlageträgerschaft für diese Erkrankung abklären zu lassen.

Die Aussagekraft einer Carrier-Diagnostik bei weiblichen Familienmitgliedern ist immer abhängig von der konkreten Familiensituation, insbesondere davon, ob bei dem Indexpatienten die genaue Mutation im Dystrophin-Gen charakterisiert werden konnte, da nur in diesen Familien eine gezielte und sichere Carrierdiagnostik zur Verfügung steht. Während die Mutationssuche bei betroffenen Patienten relativ einfach durchzuführen ist, ergeben sich bei der Carrier-Diagnostik Probleme durch das Vorhandensein des zweiten, nicht betroffenen X-Chromosoms.

Im Folgenden sollen die einzelnen molekulargenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungsmethoden zum Deletionsnachweis bei Überträgerinnen einer Muskeldystrophie Duchenne/Becker dargestellt werden.

1 Southern-Blot Analyse

Die nach ihrem Entdecker E. M. Southern benannte Methode ist die am längsten angewandte Technik zur Deletionsuche bzw. Carrier-Diagnostik im Dystrophin-Gen. Sie ist im Vergleich zur PCR-Technik mit einem erheblich höheren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Deletionen lassen sich anhand fehlender Banden oder sog. „junction bands“ diagnostizieren. Derartige „junction bands“ liegen allerdings nur bei etwa 5% aller DMD/BMD-Patienten vor, können aber häufig spezifischen Deletionen zugeordnet werden (Blonden et al. 1991). Mittels Southern-Blot-Technik können bei den Betroffenen im Prinzip alle Deletionen erkannt werden. Im Falle einer Carrier-Diagnostik sind Deletionen, die sich durch „junction bands“ darstellen lassen, mit großer Sicherheit diagnostizierbar. Bei Überträgerinnen muss sich die Auswertung der Southern-Blot Analyse jedoch auf die Quantifizierung von Intensitätsunterschieden zwischen einzelnen Banden

stützen. Diese Diagnostik ist daher nur geeignet, wenn eine DNA-Probe des Indexpatienten verfügbar ist, da sonst mit einer erhöhten Anzahl von Fehldiagnosen zu rechnen ist.

Es existieren zahlreiche Weiterentwicklungen dieser Technik, wie zum Beispiel die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Kodaira et al. 1993). Hierbei wird das Dystrophin-Gen mit selten schneidenden Restriktionsenzymen in wenige, große Abschnitte zerlegt. Diese werden in abwechselnder Spannungsrichtung über ein Agarosegel aufgetrennt. Da es sich hierbei um eine technisch sehr aufwendige Untersuchungsmethode handelt, wird sie nur selten zur Deletionssuche verwendet.

2 Mikrosatelliten-Analyse

Verteilt über das Dystrophin-Gen liegen viele hoch polymorphe CA-Repeats. Diese werden routinemäßig für die indirekte Kopplungsanalyse eingesetzt, die immer dann Anwendung findet, wenn beim Indexpatient keine Deletion nachgewiesen werden konnte. Mikrosatelliten können jedoch unter bestimmten Voraussetzungen auch für den direkten Deletionsnachweis verwendet werden (Bachrati et al. 1998; Shiroshita et al. 1997). Liegt beim Indexpatienten eine Deletion vor, die auch ein CA-Repeat umfasst, kann dieser zur direkten Abklärung des Überträgerstatus einer weiblichen Verwandten des Betroffenen herangezogen werden. Neben dem Indexpatienten und der Ratsuchenden müssen auch beide Eltern der Ratsuchenden in die Untersuchung mit einbezogen werden. Im Falle einer Überträger-schaft kann bei der Ratsuchenden nur ein Allel amplifiziert werden. Das deletierte Allel stellt ein sog. Nullallel dar. Lassen sich bei beiden Eltern der Ratsuchenden unterschiedliche Allelgrößen nachweisen, so kann bei der Ratsuchenden das Fehlen des paternalen oder maternalen Allels diagnostiziert werden. Mit Hilfe der Mikrosatelliten-Analyse kann dementsprechend auch eine Unterscheidung zwischen einer Neumutation und einer familiären Deletion getroffen werden. Eine Heterozygotie im Bereich der Mikrosatellitenmarker schließt eine Überträger-schaft für eine Deletion im Markerbereich aus. Ein Nachteil dieser

Tab 1
DNA-Sonden zur FISH-Deletionsdiagnostik bei DMD/BMD

Exon	FISH-Sonden	Insertgröße (kb)	Deletionen (%)
Promotor (Exon 1)	Cosmid CAW 7	40	1
3	Cosmid K2	40	8
5-7	Cosmid CAW 40	40	1
44	Cosmid DY 4.117	40	7
45	Cosmid Cpt 1	40	37
46/47	Cosmid PERT	40	41
48	Cosmid MA 2B3	40	37
49	Cosmid LA2F5	40	34
50	Cosmid TM 14	40	33
51	Cosmid TM 13	40	26
52	Cosmid TM 7	40	23
Summe Cosmide		70-80	
3-9	YAC 5'-1	400	
8-17	YAC 5'-3	200	
34-52	YAC 3-11	800	

FOTO 1a nur in Druckversion

FOTO 1b nur in Druckversion

Abb 1
DMD/BMD-Deletions-Diagnostik mittels FISH

A Metaphase-Spreitung nach Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Dystrophin-Gen, das im kurzen Arm des X-Chromosoms in der Bande Xp21 lokalisiert ist, und einer Referenz-Probe vom langen Arm zur einfachen Erkennung der beiden X-Chromosomen. Beide X-Chromosomen zeigen spezifische Hybridisierungssignale. Es liegt keine Deletion im Dystrophin-Gen vor.

B Metaphase-Spreitung einer Frau mit Deletion im Dystrophin-Gen. Nur auf einem der beiden X-Chromosomen finden sich mit der exon-spezifischen Sonde ein Signal im kurzen Arm.

Untersuchungsmethode liegt derzeit darin, dass in den Deletions-„hotspot“-Regionen des Dystrophin-Gens bisher nur wenige hochpolymorphe CA-Repeats bzw. Mikrosatelliten bekannt sind. Ein limitierender Faktor ist auch die Informativität der Marker. Anhand der veröffentlichten Deletionsmuster und der Markerinformativität schätzen wir, dass mit einem Satz von 9 allgemein verwendeten Mikrosatellitenmarkern (Dysl, DysII, DysIII, Str07a, 7n4, Str44, Str45, Str49 und Str50) etwa 60-65% der Deletionen im Dystrophin-Gen erfasst werden können.

3 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Hierbei handelt es sich um eine sehr aufwendige Untersuchungsmethode, bei der eine frische Blutprobe der fraglichen Überträgerin benötigt wird. Aus Lymphozyten werden zunächst sehr kleine Mengen mRNA isoliert (ca. ein Molekül pro 500 Zellen) (Roberts et al. 1990). Diese wird in cDNA transformiert und in überlappenden Teilabschnitten amplifiziert. Deletionen stellen sich in der Gelelektrophorese als verkürzte Produkte dar. Bei Überträgerinnen liegen zwei unterschiedlich große Produkte vor. Da Deletionen mit heterogenen Bruchpunkten auf DNA-

Ebene sich auch auf mRNA-Ebene auswirken, sind mit dieser Methode zwar theoretisch nahezu alle Deletionen nachweisbar, aufgrund der hohen technischen Anforderungen und der Störanfälligkeit wird dies derzeit jedoch nicht erreicht.

4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Bei dieser molekularzytogenetischen Methode werden Dystrophin-Gen-spezifische Sonden zur direkten Erkennung von Überträgerinnen eingesetzt (Ried et al. 1990, Voit et al. 1992, Tocharoentanaphol et al. 1994, Calvano et al. 1997, Voskova-Goldman et al. 1997, Rosenberg et al. 1998). Am Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg stehen 11 Cosmid-Klone aus den sog. „hotspot“ Deletionsregionen zur Carrier-Diagnostik zur Verfügung. Diese Cosmid-Klone umfassen die Exons 1, 3, 5-7, 44, 45, 46/47, 48, 49, 50, 51 und 52 (Tab 1). Daneben können Dystrophin-Gen-spezifische YAC-Klone für die Exons 3-9, 8-17 und 34-52 zur Hybridisierung eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Länge von einigen 100 kb sind YAC-Klone jedoch nur in Einzelfällen zum Deletionsnachweis geeignet, da sie in den meisten Fällen die Bruch-

punkte überspannen. Mit Hilfe dieser Sonden können 70-80% der in der Literatur beschriebenen Deletionen nachgewiesen werden (Tab 1). Aufgrund dieser hohen Erfolgsaussichten besteht die Möglichkeit einer Deletions-Diagnostik auch in DMD/BMD Familien, bei denen der Indexpatient bereits verstorben ist und zu Lebzeiten keine molekulare Diagnostik durchgeführt wurde. Eine gezielte Deletions-Diagnostik mittels FISH bietet sich an, wenn beim Indexpatienten eine definierte Deletion vorliegt. Wichtig ist dabei die Größe des Deletionsbereichs. Bei Deletionen mehrerer Exons genügt die Hybridisierung einer Sonde aus dem inneren Bereich der Deletion zusammen mit einer Referenz-Probe zur eindeutigen Identifizierung der X-Chromosomen. Frauen zeigen normalerweise Signale auf beiden X-Chromosomen (Abb 1a). Liegt hingegen eine Deletion im Dystrophin-Gen vor, findet man nur auf einem der beiden X-Chromosomen ein spezifisches Hybridisierungssignal (Abb 1b). Bei kleinen Deletionen, wie beispielsweise eine Deletion des Exons 51 muss neben den Frauen auch den Indexpatienten mittels FISH zu untersucht werden, um die Eignung der hybridisierten Sonde zu überprüfen. Nur wenn

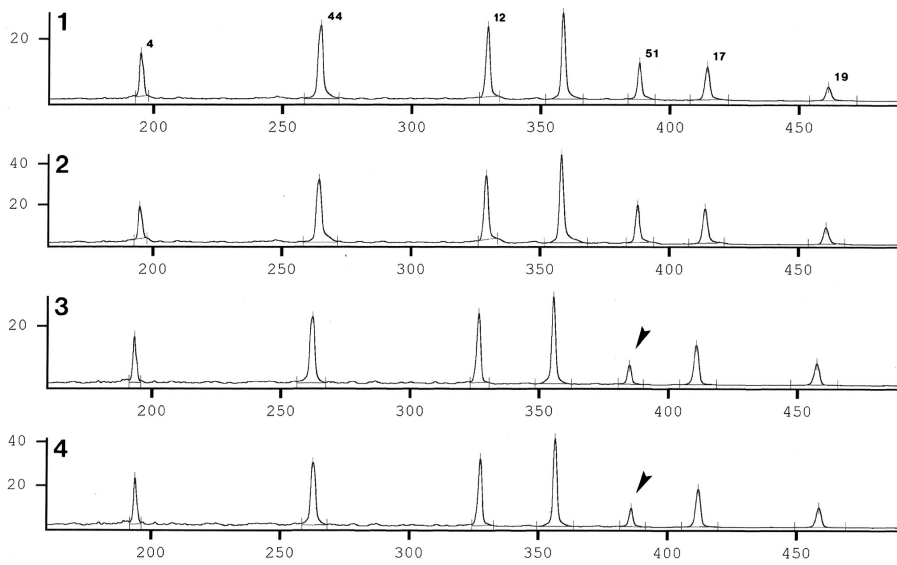


Abb 2
Quantitative Multiplex-PCR der Exons 4, 44, 12, 8, 51, 17 und 19 (in Folge der Produktgröße)

Die **Spuren 1 und 2** (oben) enthalten Material von männlichen Kontrollpersonen (geprüft deletions-negativ).

Die **Spuren 3 und 4** (unten) zeigen Material von Überträgerinnen mit einer Deletion der Exons 51-53 (Nr. 3) bzw. der Exons 50-52 (Nr. 4).

Die Muster sind sowohl optisch als auch nach Quantifizierung der Peakoberfläche fast identisch. Das relative Quotientensignal von Exon 51 zu Exon 17 der beiden Frauen (Spur 3, 4) ist verglichen mit dem Quotientensignal der beiden Kontrollpersonen (Spur 1, 2) mit 53% bzw. 54% abgeschwächt.

X-Achse: Fragmentgröße in bp
Y-Achse: Fluoreszenz-Signalstärke

Das kleinste Produkt (Exon 4) ist 196 Basen groß, der Peak von Exon 19 liegt bei 458 Basen.

der Indexpatient mit der eingesetzten Sonde kein Hybridisierungssignal zeigt, ist eine gesicherte Deletions-Diagnostik in dieser Familie möglich. Ist der Indexpatient bereits verstorben, lassen sich beispielsweise Intensitätsunterschiede von Hybridisierungssignalen auf den beiden X-Chromosomen der Ratsuchenden nur schwer interpretieren. Eine Abschwächung der Signalintensität kann entweder aufgrund einer Mikrodeletion innerhalb der Dystrophin-Gen-spezifischen Sonde oder als Hybridisierungsartefakt erklärt werden. Trotz dieser Einschränkungen beim Nachweis kleiner Deletionen bietet die Deletions-Diagnostik mittels FISH eine zuverlässige Routinemethode zur Erkennung von Überträgerinnen einer Deletion im Dystrophin-Gen bei familiären Fällen von Muskeldystrophie Duchenne/Becker.

5 Quantitative end-point-PCR

Die zur Zeit meist verwendete Methode zur Deletionssuche bei männlichen Patienten ist der Deletionsnachweis mittels Multiplex-PCR (Chamberlain et al. 1988, Beggs et al. 1990). Hierbei werden pro Ansatz mehrere Exons gleichzeitig amplifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der PCR-Produkte sind Deletionen einzelner oder mehrerer Exons nach der Gelelektrophorese durch Fehlen der charakteristischen Banden direkt erkennbar. Bei weiblichen Überträgerinnen werden neben den Exons der mutierten Genkopie auch die Exons der unveränderten Genkopie amplifiziert. Die Deletion eines Exons wird sich daher nicht in Form einer fehlenden Bande

sondern lediglich als abgeschwächte Bande darstellen. Da Intensitätsunterschiede von 50% in der Regel nicht mittels Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen nachweisbar sind, werden zur quantitativen Auswertung fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt. (Abbs et al. 1992, Yau et al. 1996).

Alle modernen Sequenziergeräte bieten die Möglichkeit, Produktmengen (peaks) zu quantifizieren. Die routinemäßig verwendeten qualitativen Multiplex-Tests können - obwohl das Etablieren einer quantitativen PCR bedeutend komplizierter ist als die Etablierung einer qualitativen Multiplex-PCR - als Ausgangspunkt für den quantitativen Test dienen. Probleme stellen jedoch minimale Schwankungen in der Reaktionskinetik zwischen verschiedenen Ansätzen dar. Man empfiehlt daher eine Reaktion mehrfach (zwei- oder dreimal) zu wiederholen und nicht die absolute Peakoberfläche, sondern das Verhältnis der Flächen unterhalb des Deletionspeaks und eines Nachbarpeaks als Messgröße zu verwenden. Ist die Lage der Deletion noch unbekannt, können die Quotienten jedes einzelnen Peaks mit allen anderen Peaks innerhalb einer Multiplex-PCR berechnet werden (Yau et al. 1996). Idealerweise bestimmt man die Produktmengen am Ende der exponentiellen Phase der PCR.

Mittels quantitativer Multiplex-PCR sind in Prinzip alle BMD/DMD-Deletionen nachweisbar, wobei jedoch zu beachten ist, dass größere Produkte nicht immer effizient amplifiziert werden und Polymorphismen im Primer-

bereich Dosiseffekte eines einzelnen Peaks hervorrufen können.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse einer Multiplex-PCR nach Auswertung mittels eines ALF-Sequenziergerätes. Insgesamt wurde DNA von 20 männlichen Kontrollpersonen amplifiziert. Da auch eine Aussage darüber getroffen werden sollte, wie stabil die Methode nach Ablauf der exponentielle Phase ist, wurden 28 Zyklen verwendet. Jede Reaktion ergab eine recht einheitliche relative Produktmenge des Exons 51 (Exon 51/Exon 17)), die Standardabweichung betrug 0,07 (Maximaler Wert 1,19, niedrigster Wert 0,86).

6 Quantitative real-time-PCR mittels LightCycler-Technik

Die bisher beschriebenen Verfahren zur Quantifizierung einer Produktmenge stützen sich entweder auf die Erfassung von Intensitätsunterschieden, sind technisch sehr aufwendig oder erfordern im Anschluss an die eigentliche Untersuchung noch weitergehende statistische Auswertungen. Vorteilhaft wäre dagegen die direkte Messung einer vorhandenen Produktmenge während der logarithmischen Phase der PCR (real-time-PCR), die eine zuverlässige Quantifizierung erlauben würde. Möglich wird diese Untersuchung z.B. mittels der sog. LightCycler-Technologie (Wittwer et al. 1997a,b). Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der sehr kurzen Reaktionszeit. Im Regelfall beträgt die Analysezeit etwa 20 Minuten, dabei werden etwa 30 PCR-Zyklen durchlaufen. Daran anschließend erfolgt die quantitative Auswertung. Die kurze Reaktionszeit

wird durch die Verwendung sehr feinkalibriger Glaskapillaren erreicht, wo durch Temperaturwechsel in jedem PCR-Zyklus in kürzester Zeit erfolgen können. Nach jedem Amplifikations-schritt erfolgt eine graphische Darstellung des Produktzuwachses. Dies wird durch die Verwendung sog. „Hybridization Probes“, spezieller Oligonukleotide, erreicht, die am 3' und am 5' Ende des zu untersuchenden Genabschnittes fluoreszierende Farbstoffe unterschiedlicher Wellenlänge tragen. Nähern sich diese Farbstoffe im Zuge der Amplifikation einander an, so kommt es nach Anregung durch eine Lichtquelle zur Aussendung eines Lichtimpulses, welcher von dem zweiten Oligonukleotid aufgenommen und als Lichtimpuls unterschiedlicher Wellenlänge (z.B. 640 nm) abgegeben wird (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Dieser wird während der Annealing-Phase der PCR gemessen. Nach jedem PCR-Zyklus erhöht sich die Menge des gemessenen Signals proportional zur Menge des spezifischen DNA-Produkts.

In der von uns durchgeführten Versuchsreihe wurden die 20 oben angeführten gesunden männliche Kontrollpersonen untersucht. Miteinbezogen wurden 3 gesicherte Deletionsträgerinnen, bei denen eine Deletion des Exons 52 mittels FISH nachgewiesen wurde. Die Gendosis wird durch Vergleich der Anfangsmomente der logarithmischen Phase der PCR der Patienten-DNA und einer definierten Verdünnungsreihe einer Kontrollprobe ermittelt. Das normalisierte Produktverhältnis zwischen einem amplifizierten Exon des Dystrophin-Gens und dem Exon eines autosomalen Kontrollgens, in unserem Fall Abl Exon 2, sollte bei einem Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne 0, bei einem nichtbetroffenen Mann oder einer weiblichen Überträgerin 0,5 und bei einer gesunden Frau 1 betragen. Die gefundenen Werte der 20 männlichen Kontrollpersonen lagen jedoch zwischen 0,19 und 0,64 und wiesen mit einer Standardabweichung von 0,13 eine zu große Schwankungsbreite auf, um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen.

Diskussion

Nur in wenigen Labors sind alle oben genannten Methoden etabliert, daher werden abhängig von der individuellen Ausstattung des einzelnen Labors unterschiedliche Untersuchungsmethoden als Methode der ersten Wahl zur Deletions-Diagnostik bei DMD/BMD-Überträgerinnen eingesetzt. In den meisten Zentren ist die FISH-Technik derzeit noch nicht etabliert oder es steht nur eine eingeschränkte Zahl von Sonden zur Verfügung. Deshalb wird in den meisten Fällen die Mikrosatelliten-Analyse als Methode der Wahl angewandt. Allerdings können kleine Deletionen (<40 kb) in der Regel weder mittels FISH noch durch die Mikrosatelliten-Analyse nachgewiesen werden. Der Nachweis einer Deletion in diesem Größenbereich kann mittels quantitativer PCR erfolgen. Bei dieser Untersuchungsmethode stellt sich jedoch regelmäßig das Problem der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Frage nach der zulässigen Spreitung der erhobenen Alleldosiswerte. Obwohl man theoretisch erwarten würde, dass die real-time-PCR zuverlässigere Ergebnisse als die end-point-PCR erbringt, haben unsere Versuche, eine quantitative DMD/BMD-Analyse auf dem LightCycler zu etablieren, bisher keine vielversprechenden Testergebnisse erbracht. Die end-point-Dosisbestimmung mittels Multiplex-PCR erwies sich dagegen als reproduzierbar und exakt quantifizierbar.

Da die FISH-Diagnostik und die Mikrosatelliten-Analyse unabhängig von Quantifizierungsproblemen sichere und jederzeit reproduzierbare Ergebnisse in der Deletionsdiagnostik liefern, sollten sie als Methoden der ersten Wahl bei der Carrier-Diagnostik eingesetzt werden. Die quantitative PCR sollte weiterhin der Diagnostik kleinerer Deletionen vorbehalten bleiben.

Einige der oben genannten Untersuchungsmethoden können neben dem Deletionsnachweis auch zum Nachweis von Duplikationen im Dystrophin-Gen angewandt werden. Hierzu eignen sich insbesondere die quantitative PCR, die Southern Blot-Analyse und die RT-PCR. Die Grenzen der molekulargenetischen Routinediagnostik

werden jedoch beim Vorliegen einer Punktmutation im Dystrophin-Gen erreicht. Prinzipiell besteht die Möglichkeit eine Mutationsanalyse beim Indexpatienten mittels „Single Strand Conformation Polymorphism“-Analyse (SSCP), Heteroduplex-Analyse oder „Denaturing-Gradient-Gel-Elektrophoresis“ (DGGE) durchzuführen. Bedingt durch die Größe des Dystrophin-Gens wurden diese Methoden bisher überwiegend im Rahmen kleinerer Studien angewandt. Über 50% der Punktmutationen bei DMD-Patienten führen zu Stopcodons oder Leserasterverschiebungen. Diese können mit dem weniger aufwendigen, aber technisch anspruchsvolleren „Protein Truncation Test“ (PTT) nachgewiesen werden. Diese Art von Mutationen spielt jedoch bei BMD kaum eine Rolle.

In Familien, bei denen beim Indexpatienten keine Deletion oder Duplikation nachweisbar ist und eine Punktmutationssuche nicht durchführbar oder erfolglos geblieben ist, kann eine weitere Risikoabschätzung mittels indirekter Haplotypenanalyse angeboten werden. Durch den Einsatz intragenischer Marker und flankierender extragenischer Marker kann das Risiko einer nicht erkannten Doppelrekombination minimalisiert werden. In Abhängigkeit von der Informativität der Marker in der jeweiligen Familie kann dadurch in der Carrier-Diagnostik ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Zusätzlich sollten auch die CK-Werte und die Neumutationsrate zur Beurteilung herangezogen werden.

Liegt bei einem Indexpatienten eine Mutation im Dystrophin-Gen vor, die sich bei der Mutter des Betroffenen nicht nachweisen lässt, kann nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Neumutation handelt. In diesem Fall muss das Vorliegen eines Keimbahnmosaiks bei der Mutter in Betracht gezogen werden. Aufgrund theoretischer Überlegungen wird das Risiko für ein Keimbahnmosaik bei der Mutter mit 5-33% angegeben (Grimm et al. 1990). Segregations Analysen in 1885 DMD-Familien ergaben eine Keimbahnmosaikrate von etwa 10% (Barbujani et al. 1990). Wichtiger für die Betroffenen erscheint jedoch das geschätzte Wie-

derholungsrisiko bei Trägerinnen eines Keimbahnmosaiks. Auch hierzu finden sich keine einheitlichen Angaben. Während Hartl ein theoretisches Wiederholungsrisiko von unter 5% bei einem betroffenen Kind und 20-35% bei zwei oder mehr betroffenen Söhnen angibt (Hartl 1971), ergab sich in einer empirischen Studie ein Wiederholungsrisiko von 7% (Bakker et al. 1989).

Aufgrund der Komplexität der möglichen Erkrankungsursachen und der diagnostischen Möglichkeiten im Falle einer Muskeldystrophie Duchenne/Becker sollte einer Carrier-Diagnostik eine genetische Beratung vorausgehen. Mit den Ratsuchenden sollten hierbei die möglichen Probleme der Carrier-Diagnostik in Abhängigkeit von der konkreten Familiensituation, den vorhandenen Techniken und den zur Verfügung stehenden Befunden des Betroffenen erörtert werden.

Literatur

- Abbs S, Bobrow M (1992) Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet* 29:191-196
- Bachrati CZ, Somodi Z, Endreffy E, Kalmar T, Rasko I (1998) Carrier detection by mikrosatellite analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Hungarian families. *Ann Hum Genet* 62:511-520
- Bakker E, Veenema H, Den Dunnen JT, Van Broekhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, Van Ommen GJB, Pearson PL (1989) Germinal mosaicism increases the recurrence risk for new Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet* 26:553-559
- Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AWJ, Borkowska J, Hausmanova Petrusiewicz I (1990) Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet* 84:552-526
- 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
- Blonden LAJ, Grootsholten PM, den Dunnen JT, et al (1991) 242 breakpoints in a 200-kb deletion prone P20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics* 10:631-639
- Boland BJ, Silbert PL, Groover R.V, Wollan PC, Silverstein MD (1996) Skeletal, cardiac and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 14:7-12
- Calvano S, Memeo E, Piemontese MR, Melchionada S, Bisceglia L, Gasparini P, Zelante L (1997) Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin Genet* 52:17-22
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16:11141-11156
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LAJ, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HMB, van Broekhoven C, Pearson PL, van Ommen GJB (1989) Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletion and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 45:835-847
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerde JG, et al. (1992) Reconstruction of the 2,4 MB human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1:19-28
- Emery AEH (1965) Carrier detection in sex-linked muscular dystrophy. *J Genet Hum* 14:318-329
- Emery AEH, Clack ER, Simon S, Taylor JL (1967) Detection of carriers of benign X-linked muscular dystrophy. *BMJ* 4:522-523
- Emery AEH, King B (1971) Pregnancy and serum-creatinine-kinase levels in potential carriers of Duchenne X-linked muscular dystrophy. *Lancet* i: 1013
- Grimm T, Müller B, Müller CR, Janka M (1990) Theoretical considerations on germline mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 27:683-687
- Hartl D (1971) Recurrence risks for germinal mosaics. *Am J Hum Genet* 23:124-134
- Hoffmann EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928
- Hoffmann EP, Fischbeck KH, Brown RH, et al (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
- Kodaira M, Hiyama K, Karakawa T, Kameo H, Satoh C (1993) Duplication detection in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients and identification of carriers with partial gene deletions using pulsed-field gel electrophoresis. *Hum Genet* 1;92:237-243
- Ried T, Mahler V, Vogt P, Blonden L, van Ommen GJ, Cremer T, Cremer M (1990) Direct carrier detection by in situ hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 85:581-586
- 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
- Rosenberg C, Navajas L, Vagenas DF, Bakker E, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Takata RI, Van Ommen GJ, Zatz M, Den Dunnen JT (1998) Clinical diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridization. *Neuromuscul Disord* 8:447-452
- Shiroshita Y, Katayama S (1997) Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in the Japanese population by fluorescent CA repeat polymorphisms analysis. *J Obstet Gynaecol Res* 23(5):453-461
- Sumita DR, Vainzof M, Campiott S, Cerqueira AM, Ca'novas M, Otto PA, Passos-Bueno MR, Zatz M (1998) Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am J Med Genet* 80:356-361
- Tocharoentanaphol C, Debatin I, Cremer M (1994) Fluoreszenz in situ Hybridisierung zur Carrier-Diagnostik der Muskeldystrophie Duchenne/Becker. *Med Genetik* 6:392-395
- Voit T, Neuen-Jacob E, Mahler V, Jauch A, Cremer M (1992) Somatic mosaicism for a deletion of the dystrophin gene in a carrier of Becker muscular dystrophy. *Eur J Pediatr* 151:112-116
- Voskova-Goldman A, Peier A, Caskey CT, Richards CS, Shaffer LG (1997) DMD-specific FISH probes are diagnostically useful in the detection of female carriers of DMD gene deletions. *Neurology* 48:1633-1638
- Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ (1996) Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications of Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet* 33:550-558
- Wittwer C, Ririe K, Andrew R, David D, Gundry R, Balis U (1997a) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 22 (1): 176-181
- Wittwer C, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R (1997b) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22(1):130-138

Korrespondenzadresse

Dr. Anna Jauch
 Institut für Humangenetik
 Im Neuenheimer Feld 328
 D-69120 Heidelberg
 Tel +49 (0) 6221 56 50 63
 Fax +49 (0) 6221 56 53 32
 ajauch@sun0.urz.uni-heidelberg.de