

# Dystrophin in der neuromuskulären Diagnostik und Therapie

ANTJE BORNEMANN

## Zusammenfassung

Die Duchennesche Muskeldystrophie ist mit einer Inzidenz von 1:3500 neugeborenen Jungen die häufigste Muskeldystrophie; die Beckersche Muskeldystrophie kommt etwa zehnmal seltener vor. Beide Krankheiten sind X-chromosomal vererbt durch einen Defekt desjenigen Gens, das das hochmolekulare Dystrophinmolekül kodiert. Die Diagnose der Duchenneschen und der Beckerschen Muskeldystrophie wird daher heute auf Grund der Analyse des Dystrophinmoleküls und des genetischen Defektes gestellt unter Verwendung von immunhistochemischen und molekulargenetischen Methoden.

## The role of dystrophin in neuromuscular diseases

X-linked Duchenne muscular dystrophy is the most common one of the muscular dystrophies. It occurs in one out of 3500 male newborns. Becker's muscular dystrophy occurs about ten times less. The gene responsible for both diseases encodes the high molecular weight protein dystrophin. Therefore, the acronym "dystrophinopathies" was coined, and diagnosis of either Duchenne's or Becker's muscular dystrophy involves analysis of dystrophin and its DNA. The function of dystrophin in healthy muscle has not been elucidated yet. It is located at the periphery of the muscle fibers underneath the plasma membrane. Hence, a Stabilising effect on the plasma membrane is at the moment considered to be its most likely function.

**Key words:** dystrophin - muscular dystrophy - morphology - immunohistochemistry - molecular genetics

Dystrophin ist untrennbar mit zwei Muskeldystrophien verbunden: der *Duchenneschen Muskeldystrophie* (im folgenden DMD genannt) und der *Beckerschen Muskeldystrophie* (im folgenden BMD genannt), und nur mit diesen. Seit der Entdeckung des Dystrophinmoleküls 1987 sind die beiden Krankheiten neu definiert als „Dystrophinopathien“. Während früher die Diagnose von DMD und BMD ausschließlich auf Grund klinischer Beobachtung gestellt wurde, ist heute die Diagnostik ohne die Untersuchung des Dystrophinmoleküls nicht mehr denkbar: Die Diagnose der DMD ist an den Nachweis des völligen Fehlens von Dystrophin geknüpft, während für die Diagnose der BMD ein pathologisch verändertes Molekül nachzuweisen ist. Auch ist seit 1987 die Untersuchung von Dystrophin am Muskelgewebe unerlässlich für die Überprüfung jeden Therapieversuchs von DMD und BMD.

### Die Duchennesche Muskeldystrophie

Die DMD ist unter den Muskeldystrophien nicht nur die häufigste, sondern auch die am schwersten verlaufende. Sie manifestiert sich nach unauffälliger Geburt und frühkindlicher Entwicklung im Alter von etwa 3 bis 5 Jahren mit einem progressiven Rückgang der motorischen Fähigkeiten bis hin zum völligen Verlust der Gehfähigkeit: Etwa um das 11. Lebensjahr sitzen diese Kinder im Rollstuhl. Die Krankheit erfaßt zunächst die Muskulatur des Beckengürtels, später auch distale Beinmuskeln und Muskeln der oberen Extremität, auch das Zwerchfell und die Atemmuskulatur. In einem Drittel der Fälle kommt eine Kardiomyopathie hinzu. Die Lebenserwartung beträgt im Durchschnitt etwas mehr als 20 Jahre (2).

Die Krankheit ist erblich. Betroffen sind nur Jungen, wobei ihre Mütter Überträgerinnen des defekten Gens sind. Etwa ein Drittel der Fälle treten allerdings sporadisch auf. Die Inzidenz beträgt insgesamt 1 zu 3500 neugeborenen Jungen (2).

### Die Beckersche Muskeldystrophie

Die BMD ist vom Verlauf her ähnlich, aber milder. Sie beginnt üblicherweise im Alter zwischen vier und 19 Jahren und manifestiert sich zu Beginn ebenfalls in der Becken- und Oberschenkelmuskulatur. Im Durchschnitt sind Patienten ab 30 Jahren nicht mehr gehfähig, und der Tod tritt mit 42 Jahren ein. Es sind aber auch solche Patienten bekannt, die nie rollstuhlpflichtig wurden und

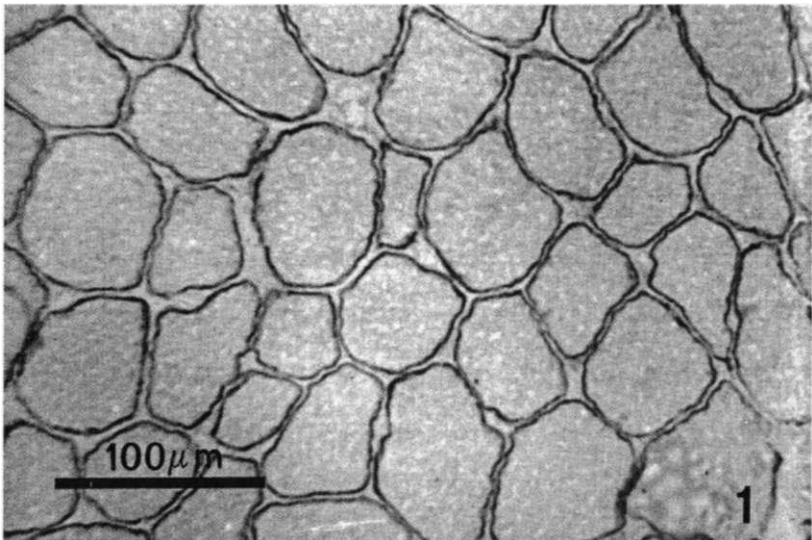


Abb. 1. Lichtmikroskopie. Das Reaktionsprodukt liegt an der Peripherie der Muskelfasern (Pfeile).

solche, die über 70 Jahre alt wurden. EKG-Veränderungen sind sehr selten. Aus diesen Angaben ist ersichtlich, daß das klinische Spektrum der BMD nicht so homogen ist wie das der DMD. Die Krankheit wird ebenfalls von Müttern nur an Jungen vererbt. Sie ist etwa zehnmalseltener als die DMD (4).

#### Das die DMD und die BMD verursachende Gen

Beide Krankheiten beruhen auf dem Defekt ein und desselben Gens, man nennt die Genorte „allel“. Da nur Mütter die Krankheit vererben und nur an Söhne, muß die Krankheit auf dem X-Chromosom liegen. Der Genort wurde an einer Stelle auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms entdeckt und „Xp21“ genannt. „Xp21“ bezeichnet diejenige Bande eines Chromosoms, in der das bei

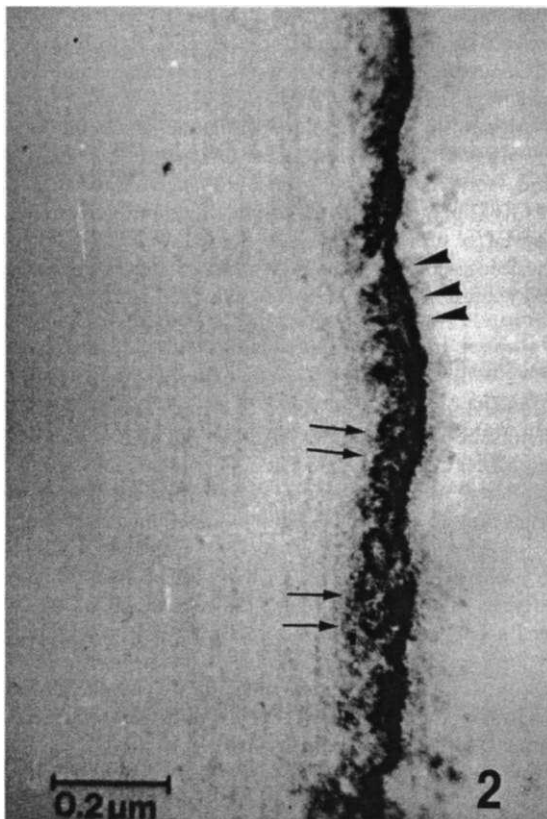


Abb. 2. Elektronenmikroskopie. Es ist ein Ausschnitt aus der Peripherie einer Muskelfaser zu erkennen. Die höhere Auflösung zeigt, daß das Reaktionsprodukt unterhalb der Plasmamembran gelegen ist (Pfeile). Aus methodisch bedingten Gründen reagiert die Plasmamembran jedoch mit (Pfeilspitzen).

der DMD und der BMD defekte Gen - zusammen mit anderen Genen - auf einem Chromosom lokalisiert ist, und stellt nach heutigen Gesichtspunkten eine sehr grobe Angabe des Genorts dar. In der zweiten Hälfte der achtziger Jahre wurden in mehrjähriger Arbeit die Grenzen dieses Gens zu anderen Genen der Bande Xp21 genau bestimmt, d.h. das Gen wurde „isoliert“. Anschließend konnte das Gen genau charakterisiert und die Anzahl und Reihenfolge der Basenpaare ermittelt werden, d.h., das Gen wurde „sequenziert“. Es wurde bekannt, daß das die DMD bzw. die BMD verursachende Gen 14 000 Basenpaare enthält. Damit ist es das größte bekannte Gen des menschlichen Organismus (7, 8).

Die in einem Gen enthaltene Information führt zur Kodierung eines Proteins, dem Genprodukt. Der nächste Schritt war daher, das von diesem Gen normalerweise vom Gesunden kodierte Protein zu ermitteln. Entsprechend der Gengröße handelt es sich um ein sehr großes Protein: Es enthält 3685 Aminosäuren bei einem relativen Molekulargewicht von 427 Kilodalton (kd). Wegen seiner Beziehung zur Genese der Duchenneschen bzw. Beckerschen Muskeldystrophie wurde das Protein „*Dystrophin*“ genannt (5).

Dystrophin ist ein stäbchenförmiges Molekül, das beim Gesunden in der Peripherie der Muskelfaser lokalisiert ist (Abb. 1), aber nicht direkt in der Plasmamembran, sondern darunter im Zytoplasma (Abb. 2). Es ist indirekt durch mehrere Glykoproteine mit der Plasmamembran verbunden, auch mit der extrazellulären Matrix und mit innerhalb der Muskelfaser liegenden Proteinen. Über seine physiologische Bedeutung ist nichts Sicheres bekannt. Wahrscheinlich dient es im weitesten Sinne der Membranstabilisierung (9).

### **Dystrophin bei Muskeldystrophien**

Bei der DMD wird überhaupt kein Molekül exprimiert. Dies kann durch eine immunhistochemische Untersuchung leicht nachgewiesen werden. Es ist wegen der Größe des Moleküls aus technischen Gründen nicht möglich, das ganze Molekül zu isolieren und auch nicht, Antikörper gegen das ganze Molekül herzustellen. Aus diesem Grund sind nur Antikörper gegen verschiedene Fragmente des Dystrophinmoleküls verfügbar. Das Dystrophinmolekül kann bei der DMD deshalb nicht exprimiert werden, weil das kodierende Gen auf dem X-Chromosom defekt ist. Dem Gen fehlen Basenpaare, d. h., es liegen „Deletionen“ vor, oder Basenpaarsequenzen kommen doppelt vor („Duplikationen“).

Das Gen ist bei der BMD ebenfalls durch Deletionen oder Duplikationen geschädigt, es kommt jedoch noch zur Bildung von Dystrophin. Das Molekül ist allerdings pathologisch verändert: Entweder ist es quantitativ vermindert, d. h., ein normales Molekül wird in zu geringer Menge gebildet, oder es ist qualitativ verändert, d. h., das Molekulargewicht ist höher oder niedriger als 427 kd. Dies wird mit Hilfe des Western blots festgestellt.

Die immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen Dystrophinfragmente erlaubt Aufschlüsse darüber, ob jemand Überträger für die DMD oder die BMD ist. Im typischen Fall findet sich in beiden Fällen in der Muskelbiopsie ein „Mosaik“ aus dystrophinexprimierenden und dystrophin-

negativen Muskelfasern (1). Überträgerinnen sind meist klinisch asymptomatisch.

### **Kriterien für die Diagnostik von DMD und BMD**

Die Diagnostik der DMD und der BMD ist heutzutage eine Analyse des Dystrophins. Sie umfaßt drei Untersuchungen: Darstellung des Dystrophinmoleküls mittels Immunhistochemie am Gefrierschnitt einer Muskelbiopsie; Feststellung des Molekulargewichts von Dystrophin mit dem Western blot; und die DNA-Analyse zur Ermittlung von Deletionen oder Duplikationen im Gen. Zur Ergänzung wird weiterhin die herkömmliche morphologische Untersuchung am Gefrierschnitt durchgeführt mit histologischen und enzymhistochemischen Präparationen.

### **Dystrophin in der Therapie von DMD**

Dystrophin kann nicht therapeutisch verabreicht werden, da es wegen der Größe des Moleküls aus technischen Gründen nicht möglich ist, Dystrophin aus tierischen Organismen zu gewinnen oder synthetisch herzustellen. Die Rolle des Dystrophins in der Therapie besteht darin, den Therapieerfolg zu kontrollieren. Jede bei der DMD eingesetzte Therapie muß sich heute daran messen lassen, ob nach erfolgter Behandlung in den kranken Muskelfasern Dystrophin exprimiert wird.

Bisher gibt es zwei Therapieansätze: Entweder werden in einem Organtransplantation vergleichbaren Vorgang Myoblasten von immunkompatiblen Spendern in einen kranken Muskel injiziert, oder es wird gesunde DNA in einen Muskel eingebracht. Während die erste Methode, der sog. Myoblastentransfer, bereits klinisch erprobt wurde, ist die Therapie mit DNA bisher nur tierexperimentell untersucht worden, und zwar an einer Mausmutante, der mdx-Maus, der auch das Dystrophinmolekül fehlt. Die klinischen Studien des Myoblastentransfers sind inzwischen abgeschlossen worden. Es liegen Ergebnisse mehrerer Doppelblind-Studien vor. Sie stimmen darin überein, daß der Myoblastentransfer keine geeignete Therapie der DMD ist (3, 6).

Bei der bisher nur experimentell an der mdx-Maus durchgeführten Therapie mit DNA exprimieren nach erfolgter Injektion bis zu 50 % der Muskelfasern Dystrophin (3, 10).

### **Literatur**

1. BUSHBY, K. M. D., J. A. GOODSHIP, L. V. B. NICHOLSON, M. A. JOHNSON, I. D. HAGGERTY, D. GARDNER-MEDWIN: **Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy.** *Neuromusc. Disord.* **3** (1993) 57-64
2. ENGEL, A. G.: **Duchenne Dystrophy.** In: A. ENGEL, B. Q. BANKER (Eds.): *Myology.* McGraw-Hill, New York (1986) 1185-1240
3. ENGEL, A. G.: **Gene therapy for Duchenne dystrophy.** *Ann. Neurol.* **34** (1993) 3-4
4. GRIMM, T.: **Becker Dystrophy.** In: A. G. ENGEL, B. Q. BANKER (Eds.): *Myology.* McGraw-Hill, New York (1986) 1241-1250

5. HOFFMAN, E. P., R. H. BROWN jr., L. M. KUNKEL: **Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus.** *Cell* **51** (1987) 919-928
6. KARPATI, G., D. AJDUKOVIC, D. ARNOLD, R. B. GLEDHILL, R. GUTTMANN, P. HOLLAND, P. A. KOCH, E. SHOUBRIDGE, D. SPENCE, M. VANASSE, G. V. WATTERS, M. ABRAHAMOWICZ, C. DUFF, R. G. WORTON: **Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy.** *Ann. Neurol.* **34** (1993) 8-17
7. KOENIG, M., E. P. HOFFMAN, C. J. BERTELSON, A. P. MONACO, C. FEENER, L. M. KUNKEL: **Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic Organization of the DMD gene in normal and affected individuals.** *Cell* **50** (1987) 509-517
8. MONACO, A. P., R. L. NEVE, C. COLLETTI-FEENER, C. J. BERTELSON, D. M. KURNIT, L. M. KUNKEL: **Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene.** *Nature* **323** (1986) 646-650
9. PETROF, B. J., J. B. SHRAGER, H. H. STEDMAN, A. M. KELLY, H. L. SWEENEY: **Dystrophin protects the sarcolemma from Stresses developed during muscle contraction.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 3710-3714
10. RAGOT, T., N. VINCENT, P. CHAFEY, E. VIGNE, H. GILGENKRANTZ, D. COUTON, J. CARTAUD, P. BRIAND, J.-C. KAPLAN, M. PERRICAUDET, A. KAHN: **Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice.** *Nature* **361** (1993) 647-650

**Dr. med. ANTJEBORNEMANN, Abteilung für Neuropathologie, Universität Mainz, D-55101 Mainz**