

Duchenne Muskeldystrophie (DMD)

DIE VERSCHIEDENEN MUTATIONSTYPEN IM DYSTROPHIN-GEN

Inhalt

4	Einleitung
5	Genetische Nomenklatur
6	Das Dystrophin-Gen
7	Glossar
8–9	Entstehung von Mutationen
10–11	Tabelle 1: große Mutationen
12–13	Tabelle 2: kleine Mutationen - In Frame
14–15	Tabelle 3: kleine Mutationen - Out of Frame
16	Genetischer Code
17	Referenzen
18	Impressum

Verschiedene Arten von Mutationen

Das **Dystrophin-Gen** auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms ist das **größte bekannte Gen** im menschlichen Genom und besitzt 79 Exons. Die **Neumutationsrate** ist sehr hoch und es gibt sehr viele verschiedene Mutationen. Je nach Mutation resultieren daraus unterschiedliche Dystrophinopathien wie Duchenne oder Becker Muskeldystrophie.

Diese Broschüre gibt einen Überblick über die verschiedenen Mutationen des Dystrophin-Gens und zeigt Beispiele für bisher bekannte Mutationen bei **Duchenne-Muskeldystrophie (DMD)** mit ihrer genetischen Nomenklatur.

Im Dystrophin-Gen (DMD) sind viele unterschiedliche Mutationstypen beschrieben.

- **Große Mutationen** wie **Deletionen** und **Duplikationen** von einem oder mehreren Exons kommen am häufigsten vor.⁵⁻⁷
- **Kleine Mutationen** wie **kleine Deletionen, Insertionen, Nonsense-, Spleiß-** und in seltenen Fällen auch **Missense-Mutationen** kommen bei etwa 25% der Fälle vor, hier sind nur ein oder einige wenige Basenpaare betroffen.⁵

- Ist nur ein **Basenpaar** betroffen (ca. 13%), spricht man von einer Punktmutation. Wenn durch eine **Punktmutation** das betroffene Codon zu einem **Stoppcodon** verändert wird, spricht man von einer **Nonsense-Mutation**. Diese Mutationen werden - der Nomenklatur folgend - mit einem Sternchen (*) an der betreffenden Codonposition gekennzeichnet (bzw. wurden in der Vergangenheit auch mit einem „X“, „Ter“ oder „Stop“ markiert).
- Sind **ein oder mehrere Basenpaare deletiert** oder **insertiert**, so kann dadurch der Leserahmen entweder zerstört werden („**frame-shift**“ bzw. „**out-of-frame**“) oder aber erhalten bleiben („**in-frame**“).
Ist **ein Basenpaar insertiert** oder **deletiert**, so verursacht diese Mutation immer einen „**frame-shift**“. Auch hier können Stoppcodons entstehen, jedoch ist hier (anders als bei der Nonsense-Mutation) zusätzlich das gesamte Leseraster verschoben, was dann durch „fs“ und (*) gekennzeichnet ist.

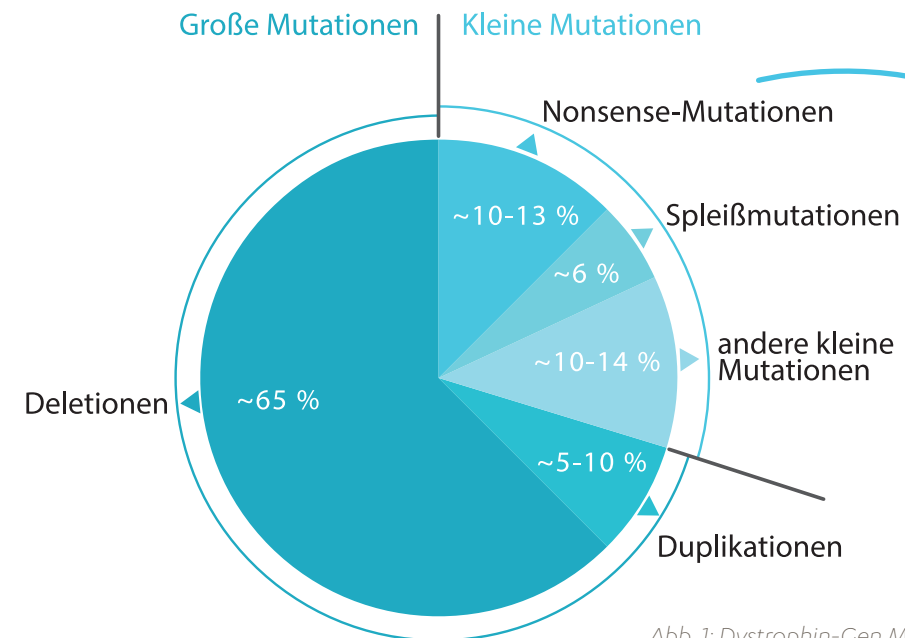
Genetische Nomenklatur, Dokumentation und Detektion der Mutationen

Es ist wichtig, identifizierte Mutationen in nationalen **Mutationsregistern** sowie in genspezifischen **Mutationsdatenbanken** wie z.B. Leiden Open Variation Database (www.dmd.nl) mit Zustimmung des Patienten/der Eltern zu dokumentieren, um die Mutationen zu erfassen und miteinander vergleichen zu können.

Um Mutationen miteinander vergleichen zu können, ist es entscheidend, dass diese entsprechend der **standardisierten Nomenklatur**, welche von

der Human Genome Variation Society (HGVS, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) festgelegt wird, dokumentiert werden.

Deletionen und **Duplikationen** von einem oder mehreren **Exons** werden im Allgemeinen in einer **MLPA-Analyse** (Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification) ermittelt und mit den entsprechenden individuellen Exons angegeben. Kleine Mutationen werden durch vollständige **Gen-Sequenzierung** ermittelt.

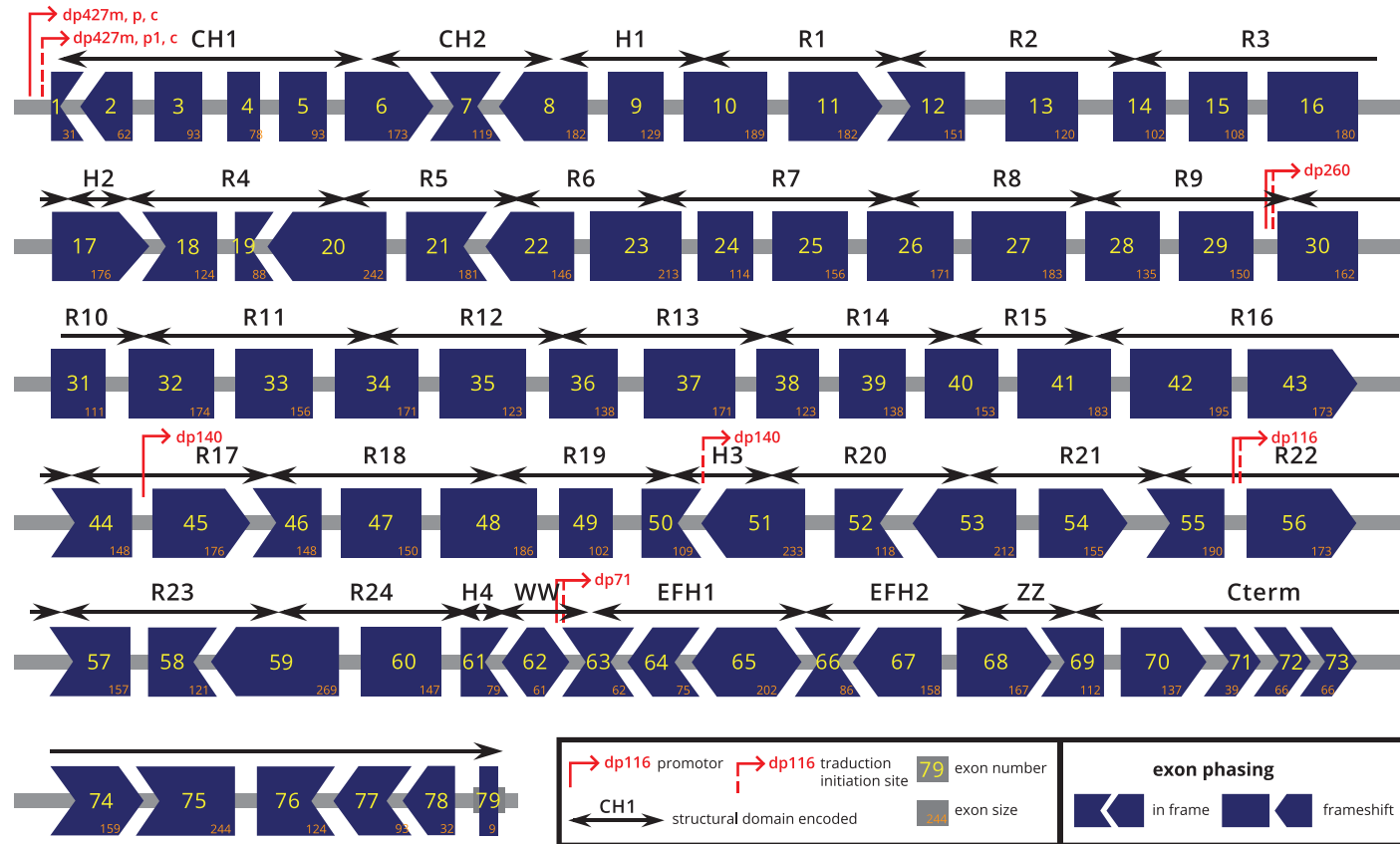


Bei Nonsense-Mutationen steht für definierte Patienten eine genspezifische Therapie zur Verfügung.

Abb. 1: Dystrophin-Gen Mutationen bei DMD¹⁻⁴

Das Dystrophin-Gen⁹

Das Dystrophin-Gen ist mit 2,4 Millionen Basenpaaren das größte bekannte menschliche Gen und macht rund 0,08 % des Erbguts aus. Die Transkription des Gens dauert etwa 16 Stunden. Mutationen des Dystrophin-Gens können unter anderem zu Duchenne-Muskeldystrophie führen.



Gen-Name	Dystrophin	Chromosome locus	Xp21
Gen-Symbol	<i>DMD</i>	Genomische Größe	~2,4 Mb
Genom. Referenz	NG_012232.1	cDNA Größe	11 kb
cDNA Referenz	NM_004006.2	Anzahl der Exons	79

Glossar

Zum besseren Verständnis erläutern wir Ihnen mit diesem Glossar die folgenden Abkürzungen:

Nukleotid	Molekül mit Phosphat-, Zucker- und Basenbestandteil. Grundbaustein der DNA bzw. RNA.
Transkription	Ablesen eines Gens aus der DNA zur Synthese eines RNA-Strangs. Dabei werden die DNA Nukleinbasen (A-T-G-C) in die RNA-Nukleinbasen (U-A-C-G) umgeschrieben. Hierbei entsteht die prä-mRNA, die aus Introns und Exons besteht.
Spleißen	Entfernen der Introns (nicht codierende DNA-Abschnitte) aus der prä-mRNA und Verknüpfen der angrenzenden Exons (codierende DNA-Abschnitte) zur mRNA.
Translation	Synthese von Proteinen, bei der die Basensequenz eines mRNA-Moleküls in die entsprechende Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird. Dieser Prozess erfolgt in den Ribosomen.
c.	cDNA Sequenz
p.	Proteinsequenz
r.	RNA Sequenz
del	Deletion
dup	Duplikation
fs	Frame-shift
ins	Insertion
spl	Spleißstelle
* (oder X, Stop, Ter)	Stoppcodon

Entstehung von Mutationen im DMD-Gen

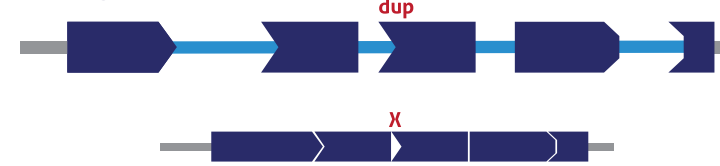
Nach der Transkription der DNA entsteht die prä-mRNA, die **Exons** und **Introns** enthält. Im nächsten Schritt, dem **Spleißen**, werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die angrenzenden Exons zur **m(messenger)RNA** verknüpft.

Große Mutationen

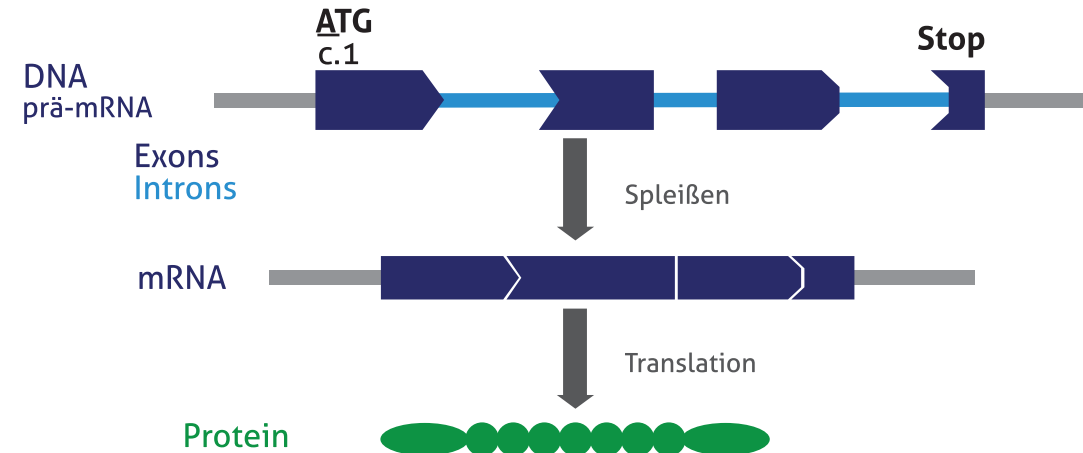
Deletion



Duplikation

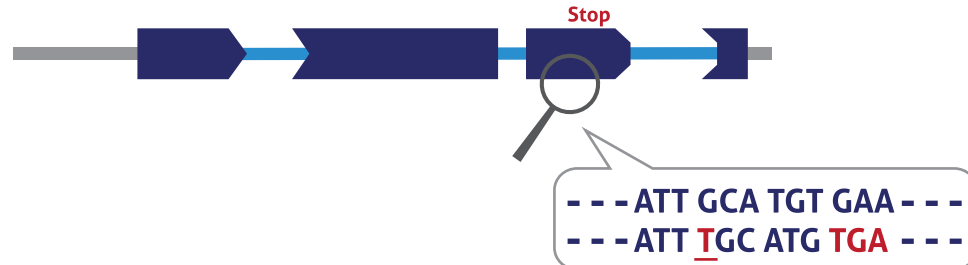


Transkription der DNA

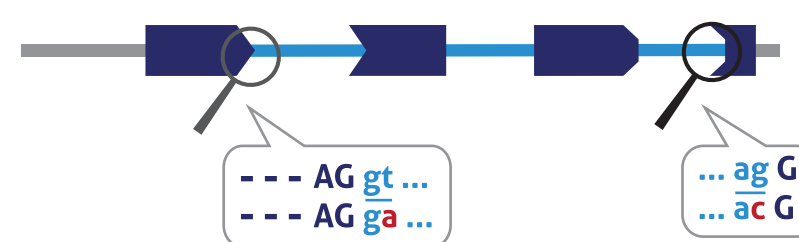


Kleine Mutationen

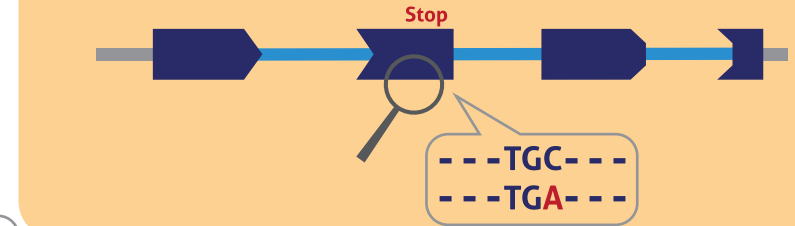
„frame-shift“-Mutation



„splice-site“-Mutation



„nonsense“-Mutation



Beispiele für große Mutationen bei DMD

In den folgenden Tabellen sind exemplarisch typische Mutationen im DMD-Gen und ihre genaue Nomenklatur angeführt. Bis dato sind Mutationen in nahezu allen 79 Exons des DMD-Gens nachgewiesen worden.

Mutationstyp	Leseraster	Konsequenz/Bedeutung	Betroffene Exons	Nomenklatur (DNA)	Beschreibung
Deletion	Out-of-frame	Verlust eines oder mehrerer Exons. Das Leseraster wird verschoben. Es kann kein funktionelles Dystrophin-Protein synthetisiert werden. Dies ist der häufigste Mutationstyp bei DMD.	45	c.(6438+1_6439-1)_(6614+1_6615-1)del r.(6439_6614del) p.(fs*)	Die exakten Positionen der proximalen (im Intron 44 gelegenen) und der distalen (im Intron 45 gelegenen) Bruchstellen sind nicht bekannt. Durch den Verlust der Exon-45-Sequenz kommt es zu einem „frame-shift“, da durch die Verknüpfung von Exon 44 mit Exon 46 der Leseraster zerstört wird. Es wird kein funktionelles Dystrophin synthetisiert.
Deletion	In-frame	Verlust eines oder mehrerer Exons. Das Leseraster bleibt erhalten, aber ein leicht verkürztes, jedoch semi-funktionelles Dystrophin-Protein kann synthetisiert werden. Ein Mutationstyp, der typischerweise bei der Becker Muskeldystrophie angetroffen wird.	45-47	c.(6438+1_6439-1)_(6912+1_6913-1)del r.(6439_6912del) p.(del)	Die exakten Positionen der proximalen (im Intron 44 gelegenen) und der distalen (im Intron 47 gelegenen) Bruchstellen sind nicht bekannt. Durch den Verlust der von Exon 45 bis 47 kodierten Sequenzen kommt es jedoch nicht zu einem „frame-shift“, da durch die Verknüpfung von Exon 44 mit Exon 48 der Leseraster nicht zerstört wird („in-frame“). Es kann ein verkürztes, semi-funktionelles Dystrophin synthetisiert werden.
Duplikation	Out-of-frame	Zugewinn eines oder mehrerer Exons. Das Leseraster wird verschoben. Es kann kein funktionelles Dystrophin-Protein synthetisiert werden.	2	c.(32-?)_(93+?)dup r.(32_93dup) p.(fs*)	Die exakten Positionen der proximalen (im Intron 1 gelegenen) und der distalen (im Intron 2 gelegenen) Bruchstellen sind nicht bekannt. Durch die Duplikation der Exon-2-Sequenz kommt es zu einem „frame-shift“, da durch die Verknüpfung von Exon 2 mit dem duplizierten Exon 2 der Leseraster zerstört wird. Es wird kein funktionelles Dystrophin synthetisiert.
Duplikation	In-frame	Zugewinn eines oder mehrerer Exons. Das Leseraster bleibt erhalten, aber ein leicht verlängertes, jedoch semi-funktionelles Dystrophin-Protein kann synthetisiert werden. Ein Mutationstyp, der typischerweise bei Becker Muskeldystrophie angetroffen wird.	43-47	c.(6117+1_6118-1)_(6912+1_6913-1)dup r.(6118_6912dup) p.(dup)	Die exakten Positionen der proximalen (im Intron 42 gelegenen) und der distalen (im Intron 47 gelegenen) Bruchstellen sind nicht bekannt. Durch die Duplikation der Exon-43-47-Sequenzen kommt es jedoch nicht zu einem „frame-shift“, da durch die Verknüpfung von Exon 47 mit dem Exon 43 (dem ersten Exon der duplizierten Exons) der Leseraster nicht zerstört wird. Es kann ein verlängertes, semi-funktionelles Dystrophin synthetisiert werden.

Beispiele für kleine Mutationen – In-Frame

Austausch einer einzelnen Base, jedoch bleibt das Leseraster erhalten

Mutationstyp	Konsequenz/Bedeutung	Betroffene Exons	Nomenklatur (DNA)	Nomenklatur (Protein)	Beschreibung
Missense-Mutation ("non-synonymous")	Austausch einer Base gegen eine andere, wodurch eine Aminosäure gegen eine andere getauscht wird.†	70	c.10108C>G	p.(Arg3370Gly)	
Nonsense-Mutation	Austausch einer Base gegen eine andere, wodurch ein Stoppcodon entsteht und es zum Abbruch der Translation kommt. Die drei Stoppcodons sind TGA, TAA und TAG (auf DNA-Ebene) bzw. UGA, UAA und UAG (auf mRNA-Ebene).	21	c.2755A>T	p.(Lys919*)	An Position 2755 der kodierenden Sequenz (Exon 21) wird ein A gegen ein T ausgetauscht. Auf Proteinebene verändert sich dadurch das Codon für Lysin in ein Stoppcodon an Position 919.
	<p>Normale Translation:</p> <p>DNA: 5' - GAA GAT GTT CGA - mRNA: 5' - GAA GAU GUU CGA - Protein: Glu Asp Val Arg</p> <p>Nonsense-Mutation:</p> <p>DNA: 5' - GAA GAT GTT TGA - mRNA: 5' - GAA GAU GUU UGA - Protein: Glu Asp Val Stopp</p> <p>Bei Nonsense-Mutationen steht für definierte Patienten eine genspezifische Therapie zur Verfügung.</p>	70	c.10108C>T	p.(Arg3370*) Veraltet: p.(Arg3370X) p.(Arg3370Stop) p.(Arg3370Ter)	An Position 10108 wird ein C gegen ein T ausgetauscht. Das verändert das Codon für Arginin in ein Stoppcodon an Position 3370. X, Stop und Ter sind alternative (veraltete) Schreibweisen für ein Stoppcodon.
Stille (Silent) Mutation ("synonymous")	Austausch einer Base gegen eine andere, jedoch wird weiterhin die gleiche Aminosäure codiert; also keine Auswirkungen auf die Bildung des Proteins.†	70	c.10108C>A	p.(=)	
Mutation an der Spleißstelle (Spleißmutation)	Spleißen bezeichnet den Prozess der Weiterverarbeitung der RNA, bei dem die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die angrenzenden Exons zur mRNA verknüpft werden. Eine Spleißmutation führt möglicherweise dazu, dass eine korrekte Weiterverarbeitung der RNA nicht mehr möglich ist und somit kein funktionelles Dystrophin gebildet werden kann. Die exakte Konsequenz dieser Mutationen kann ohne Analyse der RNA aus einer Muskelbiopsie nicht ermittelt werden.	38	c.5449-1G>C	r.(spl?) / p.(fs?)	Die Spleißstelle am Übergang von Intron 38 und Exon 39 (Akzeptor-Spleißstelle, („3-splice-site“) ist mutiert. Möglicherweise fehlt dadurch Exon 39 in der reifen mRNA, eine genaue Vorhersage ist jedoch nicht möglich.
		43	c.6290+1G>T	r.(spl?) p.(fs?)	Die Spleißstelle am Übergang von Exon 43 und Intron 43 (Donor-Spleißstelle – „5-splice-site“) ist mutiert. Möglicherweise fehlt dadurch Exon 43 in der reifen mRNA, eine genaue Vorhersage ist jedoch nicht möglich.
Deep-Intronic-Mutation	Mutationen in intronischen Sequenzen können falsche Spleißstellen erzeugen, welche die fehlerhafte Inklusion – sog. „Pseudoexons“ – in der reifen mRNA verursachen können. Dadurch kann es zu einer Verschiebung des Leserahmens kommen. Diese Mutationen werden in der Regel nur über eine RNA-Analyse des Muskelgewebes nachgewiesen.	Intron 40	c.5739+362A>G	r.5739_5740ins78 p.(Gln1914Metfs*3)	Eine im Intron 40 gelegene Punktmutation (distal von Exon 40) erzeugt eine falsche Donor-Spleißstelle, welche mit der kanonischen Akzeptor-Spleißstelle des Introns 40 verwendet wird. Dadurch wird ein Pseudoexon (78 Nukleotide) aktiviert, dessen Insertion zwischen den Exons 40 und 41 den Leserahmen zerstört.

† In seltenen Fällen wurde berichtet, dass auch „missense“ oder „stille“ Mutationen eine Auswirkung auf das korrekte Spleißen der Dystrophin-mRNA haben (nur nachweisbar über Muskelbiopsie).

Beispiele für kleine Mutationen – Out-of-Frame

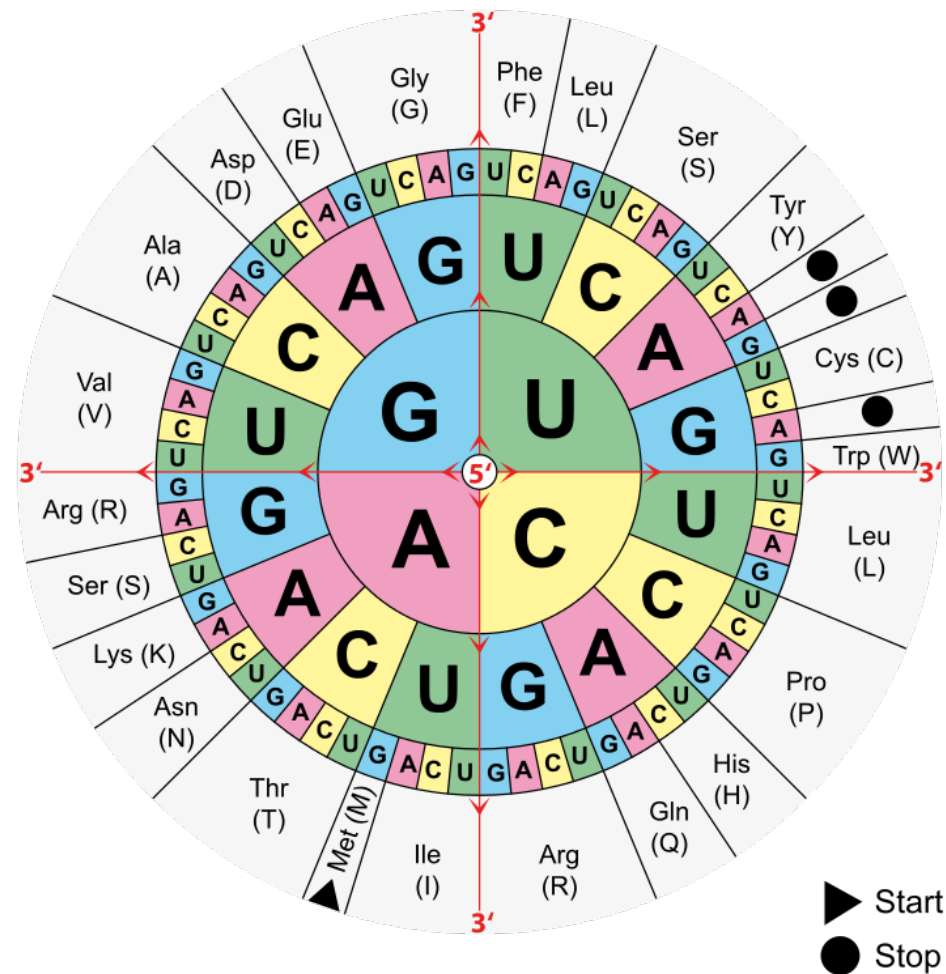
Verschiebung des Leserasters indem eine oder mehrere Basen wegfallen oder hinzukommen – auch “frame-shift“-Mutation genannt. Dadurch entsteht ein völlig anderes Protein ohne Funktion.

Mutationstyp	Konsequenz/Bedeutung	Betroffene Exons	Nomenklatur (DNA)	Nomenklatur (Protein)	Beschreibung
(Kleine) Duplikation	Zugewinn einer einzelnen Base THE CAT AND THE RAT SEE RED THE CAA TAN DTH ERA TSE ERE	5	c.317dupT	p.(Thr107Aspfs*31)	In Exon 5 gibt es auf Position 317 ein zusätzliches T in der kodierenden Sequenz. Auf Proteinebene führt dies zu einer Verschiebung des Leserasters ab Position 107, wodurch Threonin durch Asparaginsäure ersetzt wird. Nach 31 abweichenden Aminosäuren trifft das Ribosom auf ein Stoppcodon und die Proteintranslation hört auf.
(Kleine) Insertion	Einbau einer Base in die DNA THE CAT AND THE RAT SEE RED THE CHA TAN DTH ERA TSE ERD	11	c.1319_1320insT	p.(Glu440Aspfs*8)	In der kodierenden Sequenz (Exon 11) ist zwischen Position 1319 und 1320 ein zusätzliches T eingefügt. Auf Proteinebene führt dies zu einer Verschiebung des Leserasters ab Position 440, wodurch Glutaminsäure gegen Asparaginsäure ersetzt wird. Die Proteintranslation wird nach 8 Aminosäuren beendet.
(Kleine) Deletion	Verlust einer einzelnen Base THE CAT AND THE RAT SEE RED THE CTA NDT HER ATS EER EDT	17	c.2086_2098del	p.(Val696Lysfs*29)	Es liegt eine Deletion von 13 Nukleotiden in Exon 17 vor, die sich auf die Positionen 2086-2098 der kodierenden Sequenz bezieht. Auf Proteinebene führt dies zu einer Verschiebung des Leserasters ab Position 696, wodurch Valin durch Lysin ersetzt wird. Die Proteintranslation ist nach 29 Aminosäuren beendet.
Indel-Mutation	Einbau und Verlust von Basen THE CAT AND THE RAT SEE RED THE CHH HTA NDT HER ATS EER	23	c.3120_3122delinsCC	p.(Lys1042Serfs*2)	Es liegt eine Deletion von 3 Nukleotiden in Exon 23 vor, die sich auf die Positionen 3120-3122 der kodierenden Sequenz bezieht. Desweiteren wurden zwei zusätzliche C-Basenpaare eingefügt. Auf Proteinebene führt dies zu einer Verschiebung des Leserasters ab Position 1042, wodurch Lysin durch Serin ersetzt wird. Die Proteintranslation ist nach 2 Aminosäuren beendet.

Genetischer Code

Die Code-Sonne ist eine Darstellung des genetischen Codes:

In der Abfolge von innen nach außen wird einem **Basentriplett** der mRNA (gelesen von 5' nach 3') hier eine der zwanzig **kanonischen Aminosäuren** zugeordnet oder ein **Stoppcodon** markiert.⁸



Referenzen

1. Bladen CL, et al. Hum Mutat. 2015;36(4):395-402. doi: 10.1002/humu.22758
2. Pichavant C, et al. Mol Ther. 2011;19(5):830-840.
3. Ferlini A, et al. Neuromuscul Disord. 2013;23(1):4-14.
4. Aartsma-Rus A, et al. J Med Genet. 2016 Jan 11. pii: jmedgenet-2015-103387.
5. Prior TW, et al. Am J Hum Genet. 1995;57:22-33.
6. Abbs S, et al. Neuromusc Disord. 2010;46:672-681.
7. Richards CS, et al. Am J Hum Genet. 1990;46:672-81.
8. Wikipedia, Die freie Enzyklopädie, Seite „Genetischer Code“. Bearbeitungsstand: 20. September 2016, 19:55 UTC. URL: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Genetischer_Code&oldid=158087379 (Abgerufen: 28. September 2016, 11:17 UTC)
9. modifiziert nach: eDystrophin, A database dedicated to human dystrophin variants, Seite „Knowledge“, URL <http://edystrophin.genouest.org/index.php?page=knowledge&box=gene#geneBox> (Abgerufen: 10. Oktober 2016)

Weiterführende Literatur

- a. Richards CS, et al. Am J Hum Genet. 1990;46:672-81.
- b. Genetics Home Reference. What kind of gene mutations are possible? Available at: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/possiblemutations>. Last accessed: September 2015.
- c. Flanigan KM et al. Am J Hum Genet. 2003;72:931-939.
- d. Dent KM, et al. Am J Med Genet. A 2005;134:295-298.
- e. Essentials of Genetics, Unit 1.2. A Brief History of Genetics: De ning Experiments in Genetics, Unit 5.2. Nature Education. Available at: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-is-a-structure-that-en-codes-biological-6493050>. Last accessed February 2016.
- f. Schröter C., Dystrophinopathien (Teil 1: Muskeldystrophien vom Typ Duchenne). Available at: <http://www.muskel-dystrophie.de/duchenne/>. Last accessed February 2016.

Impressum

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung und Vervielfältigung, vorbehalten.
Ohne schriftliche Genehmigung von PTC Therapeutics darf kein Teil der Broschüre durch
Mikroverfilmung, Fotokopie oder ein anderes Verfahren reproduziert werden.

1. Auflage Oktober 2016

Herausgeber: PTC Therapeutics Germany GmbH, THE SQUAIRE 12 - Am Flughafen, 60549 Frankfurt am Main

Mit wissenschaftlicher Unterstützung von Prof. Dr. Wolfgang M. Schmidt, Genetiker an der Neuromuskulären
Forschungsabteilung der Medizinischen Universität Wien.

Agentur: aimed - a strategic corporate communications GmbH, Hamburg - www.aimed.healthcare

Satz und Layout: Serpil Sen - www.serpilsen.de

Druck: mdbm GmbH, Bergstraße 21, 85405 Nandlstadt

Nachweis Bildrechte: Cover: PTC Therapeutics, Seite 8,9: Prof. Dr. Wolfgang M. Schmidt

Die Empfehlungen in dieser Broschüre sind von den Autoren sorgfältig erwogen und geprüft worden.
Eine Haftung kann dennoch nicht übernommen werden. Die Empfehlungen stellen keinen Ersatz für eine
medizinische Beratung und Betreuung jeglicher Art dar. Für die korrekte Interpretation des Ergebnisses der
genetischen Testung fragen Sie bitte Ihren Genetiker.

