

Aus dem Institut/der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wachstum und psychomotorische Entwicklung von Kindern mit
Duchenne Muskeldystrophie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisabeth Katharina Sarrazin

aus Bonn

Gutachter/in: 1. Priv. Doz. Dr. med. A. Kaindl
 2. N.N.
 3. N.N.

Datum der Promotion: 30.05.2015

Für meine Eltern und meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>Vorwort</i>	<i>VII</i>
1 Abstrakt	1
2 Einleitung	3
2.1 Definition und Epidemiologie der Muskeldystrophie Duchenne	3
2.2 Genetik der Muskeldystrophie Duchenne	3
2.2.1 Das Dystrophin-Gen.....	3
2.2.2 Mutationen im Dystrophin-Gen	3
2.2.3 Pathomechanismus der Muskeldystrophie Duchenne.....	4
2.2.4 Proteinprodukte des Dystrophin-Gens	4
2.3 Klinische Präsentation und Phänotyp der Muskeldystrophie Duchenne	6
2.3.1 Muskelphänotyp	6
2.3.2 Kognitiver Phänotyp und Hirnfunktion.....	7
2.3.3 Anthropometrische Daten	7
2.3.4 Psychomotorische Entwicklung	8
2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	8
2.5 Diagnostik und Therapie der Muskeldystrophie Duchenne	9
2.5.1 Diagnostisches Vorgehen und Methoden.....	9
2.5.2 Multidisziplinäre symptomatische Therapieansätze	10
2.5.3 Behandlung von Spätkomplikationen	11
2.5.4 Experimentelle Therapien	11
3 Zielsetzung und Fragestellung der Studie	12
4 Patienten und Methoden	14
4.1 Patienten	14
4.1.1 Rekrutierung der Patienten.....	14
4.1.2 Universitätskinderklinik Essen.....	14

4.1.3	Sozialpädiatrisches Zentrum der Charité Berlin	15
4.1.4	Universitätskinderklinik Dresden.....	15
4.2	Parameter der Datenaufnahme.....	16
4.2.1	Generelle Vorgehensweise	16
4.2.2	Diagnosestellung der Muskeldystrophie Duchenne	17
4.2.3	Anthropometrische Daten	17
4.2.4	Steroidtherapie	18
4.2.5	Motorische und kognitive Entwicklung	18
4.3	Analyse der Daten und statistische Auswertung	19
4.3.1	Interpretation der Daten zum Wachstum	19
4.3.2	Einteilung der Kategorien für motorische und kognitive Entwicklung	19
4.3.3	Gruppierung der Patienten anhand des Genotyps	19
4.3.4	Statistische Auswertung	20
5	Ergebnisse.....	22
5.1	Anthropometrische Daten	22
5.1.1	Werte bei Geburt	22
5.1.2	Postnatale Entwicklung der Patientenkohorte.....	23
5.1.3	Postnatale Werte nach Altersgruppen aufgeteilt	24
5.1.4	Auswirkungen der Steroidtherapie auf anthropometrische Daten	26
5.2	Motorische und kognitive Entwicklung	27
5.3	Genetik	27
5.3.1	Häufigkeiten der Mutationstypen.....	27
5.3.2	Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen.....	28
5.3.3	Verteilung der Deletions-Hotspots und Deletions-Bruchpunkte	29
5.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	31
5.4.1	Wachstum nach Genotyp	31
5.4.2	Motorische Entwicklung nach Genotyp.....	33
5.4.3	Kognitive Entwicklung nach Genotyp	33
6	Diskussion.....	35
6.1	Studiendesign und Limitationen der retrospektiven Vorgehensweise.....	35
6.2	Anthropometrische Daten von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne	35

6.2.1	Kleinwuchs.....	35
6.2.2	Ernährungsstatus	36
6.2.3	Kopfumfang und Hirnfunktion.....	37
6.2.4	Einfluss der Steroide auf das Wachstum.....	38
6.3	Psychomotorische Entwicklung von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne	39
6.3.1	Motorische Entwicklung	39
6.3.2	Kognitive Entwicklung	40
6.3.3	Spezifisches kognitives Profil	41
6.3.4	Neuropsychiatrische Komorbiditäten.....	41
6.3.5	Verzögerungen in der Diagnostik und klinische Frühzeichen	42
6.4	Genetik	43
6.4.1	Verteilung der Mutationstypen.....	43
6.4.2	Lokalisation der Mutationen auf dem Dystrophin-Gen	44
6.4.3	Deletionsbruchpunkte im Dystrophin-Gen	44
6.5	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	45
6.5.1	Anthropometrische Daten	45
6.5.2	Psychomotorische Entwicklung	46
6.5.3	Kognitiver Phänotyp	47
6.5.4	Spezifisches Kognitives Profil und Genotyp	49
6.6	Ausblick.....	49
7	Literaturverzeichnis.....	50
	Eidesstattliche Versicherung	61
	Lebenslauf	63
	Danksagungen.....	64

Abkürzungsverzeichnis

BMD	Becker Muskeldystrophie
BMI	Body Mass Index
CK	Kreatinkinase
cm	Zentimeter
cMRI	zerebrale Magnetresonanztomografie
CT	Computertomografie
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DGC	Dystrophin- Glykoprotein-Komplex
DQ	Entwicklungsquotient ('developmental quotient')
Gr.	Gruppe
IQ	Intelligenzquotient
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mg	Milligramm
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
OFC	Kopfumfang ('occipital frontal circumference')
P	Perzentile, zum Beispiel P3 = dritte Perzentile
Pat.	Patienten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ('polymerase chain reaction')
SD	Standardabweichung
SSW	Schwangerschaftswoche
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Dystrophin-Gens mit 7 Promotoren und den daraus entstehenden Isoformen des Dystrophin sowie den Orten ihrer vorwiegenden Expression.....	5
Abbildung 2: Schema zur Patientenrekrutierung aus den Universitätskinderkliniken Essen, Berlin und Dresden.....	14
Abbildung 3: Altersstruktur der Patientenkohorte zum Zeitpunkt des Follow-up.....	17
Abbildung 4: Länge, Gewicht und OFC bei Geburt	22
Abbildung 5: Darstellung von Größe, BMI und OFC der gesamten Patientenkohorte als Scatterplot.....	23
Abbildung 6: Postnatale Größe, BMI und OFC	25
Abbildung 7: Postnatale Größe, BMI und OFC für Patienten mit Steroidtherapie.....	26
Abbildung 8: Entwicklung der DMD-Patienten)	27
Abbildung 9: Häufigkeiten der Mutationstypen.....	28
Abbildung 10: Verteilung der Mutationen innerhalb des Dystrophin-Gens	29
Abbildung 11: Deletionen im Dystrophin-Gen	30
Abbildung 12: Größe, BMI und OFC in Perzentilen aufgeteilt nach Patientengruppierung anhand des Genotyps	32
Abbildung 13: Psychomotorische Entwicklung nach Genotyp.....	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parameter der Datenaufnahme und Anzahl der Patienten pro Parameter	16
Tabelle 2: Gruppierung der Patienten anhand des Genotyps	20
Tabelle 3: Patientenzahl pro Parameter für anthropometrische Daten bei Geburt.....	23
Tabelle 4: Patientenzahl pro Parameter für postnatale anthropometrische Daten	24
Tabelle 5: Häufigkeit verschiedener Mutationsarten in der Patientenkohorte	28
Tabelle 6: Patientenzahl für anthropometrische Daten und psychomotorische Entwicklung für Patientengruppierungen anhand des Genotypen	31

Vorwort

Der Grundstein für die vorliegende Arbeit wurde gelegt, als im Rahmen einer Studie in Berlin zur Ätiologie von Mikrozephalie auch zwei Kinder mit Muskeldystrophie Duchenne auffielen. In der Literatur ist keine derartige Assoziation beschrieben. So entstand die Idee, diese Beobachtung an einem größeren Patientenkollektiv zu überprüfen und dazu neben dem Sozialpädiatrischen Zentrum der Charité Berlin auch eine Kooperation mit den Universitätskinderkliniken Essen und Dresden anzustreben. Bei der Datengewinnung wurde die Zielsetzung der Studie von der Erhebung anthropometrischer Daten und der körperlichen Entwicklung der Kinder auch auf motorische und kognitive Entwicklung erweitert. Dank vielfach vorhandener Daten zur Genotypisierung konnte auch auf genetische Aspekte eingegangen werden. Aus dem ursprünglichen Ansatz, die Assoziation zwischen Duchenne Muskeldystrophie und Mikrozephalie zu untersuchen, wurde somit eine viel umfassendere Studie zu Wachstum und Entwicklung der Kinder mit dieser Krankheit.

1 Abstrakt

Einleitung Muskeldystrophie Duchenne (DMD, MIM#310200) ist eine der häufigsten erblichen neurodegenerativen Erkrankungen, die durch Mutationen im Dystrophin-Gen verursacht wird. Verschieden große Isoformen des Dystrophin-Proteins werden vor allem in Muskel und zentralem Nervensystem exprimiert. Klinisch ist DMD durch eine progressive symmetrische Muskelschwäche gekennzeichnet. Bei etwa einem Drittel der Patientin sind auch kognitive Funktionen beteiligt. Ziel der Studie war es, Wachstum und psychomotorische Entwicklung von Patienten mit DMD zu beschreiben sowie eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erstellen.

Methodik Im Rahmen einer retrospektiven Datenanalyse wurden von 263 Patienten (mittleres Alter 7,1 Jahre) aus drei deutschen neuropädiatrischen Zentren die Körpermaße (Körperlänge, Körpergewichtsindex BMI, Kopfumfang) sowie Daten zur motorischen und kognitiven Entwicklung erhoben. Soweit vorhanden, wurde der genaue Genotyp erfasst. Die Daten wurden mit standardisierten Referenzpopulationen verglichen und sowohl auf ihre Häufigkeitsverteilung innerhalb der gesamten Patientengruppe als auch entsprechend dem Genotyp aufgeteilt untersucht.

Ergebnisse Insgesamt entwickeln 30% der Patienten einen Kleinwuchs (Körperlänge < 3. Perzentile), der meist bereits früh in der Entwicklung im Kleinkindalter zwischen 2 und 5 Jahren einsetzt und durch eine Steroidtherapie verstärkt wird (45% der Patienten unter Steroidtherapie). Der BMI zeigt verglichen mit Referenzpopulationen eine Rechtsverschiebung (68% > 50. Perzentile), wobei auch Untergewicht besonderes bei älteren Patienten ein Problem darstellt. Der Kopfumfang zeigt eine Linksverschiebung (65% < 50. Perzentile). Die grobmotorische Entwicklung ist verzögert in einem Drittel der Patientin (mittleres Laufalter 18,3 Monate, 30% > 18 Monate, 8% > 24 Monate). Fast die Hälfte der Patienten zeigen kognitive Beeinträchtigungen (26% Lernbehinderung, 17% geistige Behinderung). Die häufigsten Mutationen sind große Deletionen meist im zentralen Teil des Gens, während die selteneren Duplikationen proximal gehäuft sind und Punktmutationen gleichmäßig verteilt auftreten. Obwohl es keine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation gibt, sind besonders Mutationen im distalen Teil des Gens, die alle Isoformen des Dystrophin betreffen, häufig mit Kleinwuchs, einer hohen Rate an Mikrozephalie sowie Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen assoziiert.

Schlussfolgerungen DMD ist in etwa einem Drittel der Patienten mit Kleinwuchs assoziiert. Distale Mutationen mit Verlust aller Isoformen besitzen eine Aussagefähigkeit als prognostischer Faktor für den Phänotyp. Trotzdem sollten Prognosen sehr vorsichtig getroffen werden, da es eine große Variabilität von Entwicklungsverläufen gibt.

Abstract

Introduction Duchenne muscular dystrophy (DMD, MIM#310200) is one of the most common hereditary neurodegenerative diseases. It is caused by a mutation in the gene for the protein dystrophin whose isoforms of different length are expressed mainly in muscle and in the central nervous system. Clinically DMD is characterized by a progressive symmetric muscular weakness and in about one third of the patients is associated with involvement of cognitive functioning. Aim of the study was to characterize growth and psychomotor development of children with DMD as well as find a possible correlation of genotype with phenotype.

Methods In a retrospective data analysis anthropometric measures (length, weight, body mass index BMI, head circumference) and data concerning motor and cognitive development as well as genotype were taken from 263 patients (mean age 7.1 years) treated at centres for neuropediatrics of three German university hospitals. Data was then compared to a reference population. Frequency analyses were performed within the entire cohort as well as divided by genotype.

Results 30% of the patients developed short stature (length < 3rd centile) that was aggravated by steroid therapy (45% of patients with steroid therapy had short stature) and starts early in development between the ages of 2-5. The BMI shows a rightward shift (68% > 50th centile). However, malnourishment presents a problem as well mainly in older patients. Head circumference shows a leftward shift (65% < 50th centile). One third of the patients exhibit a delay in gross motor development (mean age at walking is 18.3 months, 30% walking age > 18 months, 8% > 24 months). Cognitive impairment is present in almost half of the patients (learning disability in 26%, intellectual disability in 17%). The most common forms of mutations are large deletions located mostly in the central part of the gene, whereas rarer duplications are located preferably in the proximal regions. Point mutations are distributed randomly across the gene. There is no strict genotype phenotype correlation. However, mutations in the distal part of the gene affecting all isoforms of dystrophin seem to be associated with small stature, a high rate of microcephaly as well as cognitive impairment.

Conclusion DMD is in one third of the patients associated with small stature. Distal mutations can be used as a prognostic factor for phenotype, although prognoses need to be made carefully as there is great individual variability of developmental courses.

2 Einleitung

2.1 Definition und Epidemiologie der Muskeldystrophie Duchenne

Duchenne Muskeldystrophie (DMD, MIM#310200) ist eine X-chromosomal vererbte neuromuskuläre Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 1:3500 männlichen Neugeborenen (Emery, 1991). Ursache sind Mutationen im Dystrophin-Gen, die zu einem funktionslosen Dystrophin-Protein und damit zum progredienten Untergang von Muskelzellen führen (Hoffman *et al.*, 1987). Die Krankheit ist daher charakterisiert durch eine progressive Muskelschwäche und Abbau der motorischen Fähigkeiten vom frühen Kindesalter an sowie später zunehmend durch respiratorische und kardiale Komplikationen (Brooke *et al.*, 1989, Passamano *et al.*, 2012). Mentale Retardierung und andere assoziierte kognitive Symptome sind in der Literatur beschrieben (Cotton *et al.*, 2001, Hendriksen and Vles, 2008). Im Folgenden wird näher auf Genetik und Pathomechanismus sowie auf Klinik, Diagnostik und Therapie der Erkrankung eingegangen.

2.2 Genetik der Muskeldystrophie Duchenne

2.2.1 Das Dystrophin-Gen

Mutationen im Dystrophin-Gen als Ursache der Muskeldystrophien Duchenne und Becker wurden erstmals 1986 beschrieben (Monaco *et al.*, 1986). Ein Jahr später wurde die Abwesenheit von Dystrophin als Proteinprodukt dieses Genlocus im Skelettmuskelgewebe von DMD Patienten nachgewiesen (Hoffman *et al.*, 1987). Das Dystrophin-Gen ist auf Chromosom Xp21 lokalisiert (Monaco *et al.*, 1987) und mit einer Länge von 2.4 Megabasen das größte Gen im menschlichen Genom (Den Dunnen *et al.*, 1992). Die kodierende Sequenz umfasst etwa 0.6% des Genoms (14 Kilobasen im fertigen RNA Transkript) und ist in 79 Exons aufgeteilt (Ahn and Kunkel, 1993, Roberts *et al.*, 1993). Verschiedene Promotoren kontrollieren die Expression von mindestens sieben, zum Teil verkürzten Isoformen (Muntoni *et al.*, 2003) (siehe auch Kapitel 2.2.2). Weitere Variabilität in den Proteinprodukten entsteht durch gewebsspezifisches alternatives Splicen (Bies *et al.*, 1992, Feener *et al.*, 1989).

2.2.2 Mutationen im Dystrophin-Gen

Ein defektes Dystrophin-Gen kann entweder durch einen in der Regel asymptomatischen weiblichen Mutationsträger weitergegeben werden oder durch de-novo Mutationen entstehen (etwa ein Drittel der Fälle, vgl. (Ahn and Kunkel, 1993, Grimm *et al.*, 2012)). Mutationen können prinzi-

piell überall im Dystrophin-Gen auftreten, es sind allerdings zwei sogenannte Deletions-Hotspots bekannt (den Dunnen *et al.* , 1989a, Koenig *et al.* , 1987). Die am häufigsten von Mutationen betroffene Region umfasst Exon 45-55 mit dem *deletion breakpoint* (Bruchpunkt in der DNA, von dem die Deletion ausgeht) meist in Intron 44 gelegen, während ein kleinerer Hotspot bei Exon 2-19 existiert mit häufigen *deletion breakpoints* in Intron 2 und 7 (White and den Dunnen, 2006). Bei der Mehrzahl der Mutationen im Dystrophin-Gen handelt es sich um große intragenetische Deletionen (Aartsma-Rus *et al.* , 2006, Koenig *et al.* , 1989, White *et al.* , 2002), gefolgt von Punktmutationen und Duplikationen. Sehr viel seltener kommen rein intronische Deletionen oder Insertionen von Exons vor (Muntoni *et al.*, 2003).

2.2.3 Pathomechanismus der Muskeldystrophie Duchenne

Es besteht keine einfache Korrelation zwischen strukturellen Charakteristika der Mutation wie beispielsweise Größe einer Deletion und der Schwere der phänotypischen Ausprägung der Erkrankung. Der Effekt einer Mutation im Dystrophin-Gen auf den Phänotyp ist vor allem davon abhängig, ob durch die Deletion oder Duplikation der kodierende Leserahmen verschoben wird. Dieses Konzept wird auch als Frame-Shift-Hypothese bezeichnet (Monaco *et al.* , 1988). Während bei intaktem Leserahmen noch ein teilweise funktionsfähiges Dystrophin gebildet werden kann und der mildere Phänotyp der Becker Muskeldystrophie (BMD) resultiert, ist bei DMD der Leserahmen verschoben und es entsteht ein Stopcodon sowie ein verkürztes und funktionsloses Dystrophin. Die Frame-Shift-Hypothese gilt für über 90% der Fälle (Aartsma-Rus *et al.*, 2006). Die meisten Ausnahmen zu dieser Regel bestehen lediglich auf der DNA- oder Proteinebene, nicht jedoch auf Ebene der RNA und sind hervorgerufen durch Mechanismen wie Exon Skipping oder alternatives Splicen (Gualandi *et al.* , 2003, Winnard *et al.* , 1995). Weiterhin können Ausnahmen entstehen, wenn funktionell wichtige Bereiche des Proteins von größeren Deletionen betroffen sind. Bei Punktmutationen entsteht in der Regel ein Stop-Codon, was zu vorzeitigem Abbruch der Proteinsynthese (Translation) und damit zu einem funktionslosen verkürzten Dystrophin-Protein führt.

2.2.4 Proteinprodukte des Dystrophin-Gens

Das Dystrophin ist Teil des großen transmembranalen Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (DGC). Verschiedene Formen von Muskeldystrophien werden durch Defekte einzelner Bestandteile dieses Proteinkomplexes hervorgerufen (vgl. (Blake *et al.* , 2002)). Es existieren insgesamt sieben verschiedene Isoformen des Dystrophins, die alle eine aminoterminal (NH₂) Domäne

besitzen, gefolgt von einer zentralen Spectrin-ähnlichen Domäne, einer cysteinreichen Region sowie schließlich einer carboxyterminalen (COOH) Domäne (Muntoni *et al.*, 2003). Die drei Isoformen in der vollen Länge des mRNA-Transkripts (Dp427 = Dystrophin-Protein mit einer Größe von 427 Kilodalton) werden durch unterschiedliche Promotoren gesteuert und mit jeweils eigenständigem ersten Exon in Gehirn, Muskel und Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert (Gorecki *et al.*, 1992, Nudel *et al.*, 1989). Die Synthese von vier weiteren kürzeren Isoformen (Dp260, Dp140, Dp116, Dp71) wird ausgehend von eigenen intronischen Promotoren initiiert, die *upstream* ihres jeweiligen ersten Exon (Exon 30, 44, 56 und 63) gelegen sind (Bar *et al.*, 1990, Byers *et al.*, 1993, D'Souza *et al.*, 1995, Lidov *et al.*, 1995). In *Abbildung 1* ist der Aufbau des Dystrophin-Gens mit 7 Promotoren, die daraus entstehenden Proteinprodukte sowie der Ort ihrer vorwiegenden Expression schematisch dargestellt.

Fehlerhaftes Dystrophin führt zu einem partiellen oder totalen Funktionsverlust des DGC und damit zu progressiver Instabilität im Sarkolemma, zu reduzierter mechanischer Belastbarkeit des Muskels und schließlich zum Untergang von Muskelfasern (Petrof *et al.*, 1993). Der DGC ist außerdem an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase sowie an zellulären Signalvorgängen beteiligt (Review siehe (Batchelor and Winder, 2006)). Im ZNS wird Dystrophin vor allem in postsynaptischen Regionen kortikaler Neurone sowie in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns

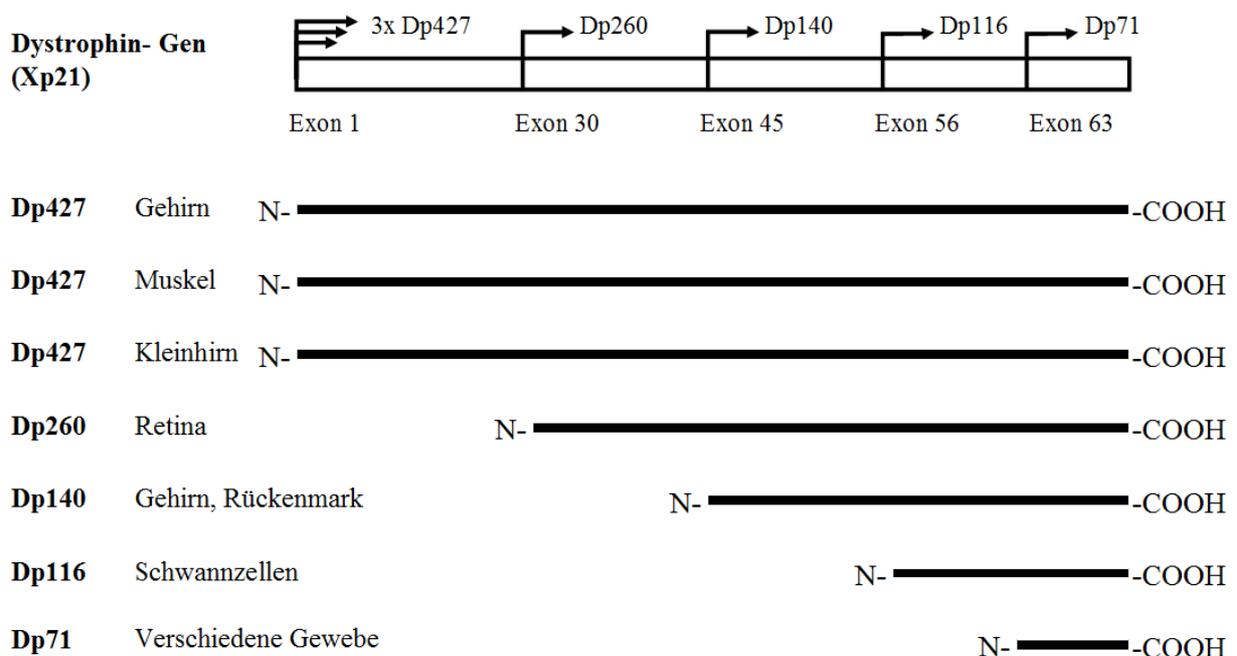


Abbildung 1: Aufbau des Dystrophin-Gens mit 7 Promotoren und den daraus entstehenden Isoformen des Dystrophin sowie den Orten ihrer vorwiegenden Expression. Dystrophin- Proteine (Dp) mit Molekulargewicht in Kilodalton (Zahlen); Promotoren sind durch schwarze Pfeile repräsentiert.

exprimiert (Lidov *et al.* , 1993, Lidov *et al.* , 1990). Die verkürzte Isoform Dp71 ist zusätzlich in perivaskulären Glia-Zellen zu finden und wird daher mit der Blut-Hirn-Schranke assoziiert (Haenggi *et al.* , 2004). Der DGC ist im ZNS an synaptischen Strukturen sowie an komplexe Vorgänge wie Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses beteiligt (Übersichtsarbeit zur Rolle des DGC im ZNS siehe (Pilgram *et al.* , 2010)). Die verkürzte Isoform Dp71 wurde in die Regulierung der Organisation und Funktion glutamaterger Synapsen im Gehirn impliziert (Daoud *et al.* , 2009). Die Isoform Dp140 wird stärker im fetalen als im adulten Gehirn exprimiert und somit als wichtig für die Gehirnentwicklung angesehen (Morris *et al.* , 1995). Das charakteristische Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen des Dystrophin in Muskel, Gehirn und weiteren Organen kann dazu herangezogen werden, den charakteristischen Phänotyp der DMD aus Muskelbeteiligung sowie kognitiver Dysfunktion zu erklären.

2.3 Klinische Präsentation und Phänotyp der Muskeldystrophie Duchenne

2.3.1 Muskelphänotyp

Die klinische Präsentation der Duchenne Muskeldystrophie ist in erster Linie gekennzeichnet durch eine progressive proximal und beinbetonte Myopathie mit Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur. Im Kleinkindalter fallen betroffene Jungen meist durch Schwierigkeiten beim Treppensteigen und beim Rennen oder durch motorische Ungeschicklichkeit auf (Ciafaloni *et al.* , 2009). Der Kraftverlust scheint annähernd linear zum Alter zu verlaufen (McDonald *et al.* , 1995, Scott *et al.* , 1982). Ab der zweiten Lebensdekade sind die Patienten auf einen Rollstuhl angewiesen (Magri *et al.* , 2011). Zusätzlich treten mit der zunehmenden Immobilität zusammenhängende orthopädische Probleme wie Gelenkkontrakturen und Skoliose auf (McDonald *et al.* , 1995). Entscheidend für die Lebenserwartung ist die respiratorische und kardiale Funktion. Die Mitbeteiligung der respiratorischen Muskulatur erfordert mit der Zeit oftmals eine nächtliche mechanische Ventilation der Patienten, was das Überleben deutlich verbessert (Eagle *et al.* , 2002). Eine Beteiligung des Herzmuskels ist obligatorisch, verläuft aber vielfach initial asymptomatisch (Giglio *et al.* , 2003, Nigro *et al.* , 1990). Dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz treten als Todesursache bei DMD-Patienten allerdings zunehmend in den Vordergrund, was vor allem durch das längere Überleben der Patienten aufgrund der verbesserten Beatmungstechniken bedingt ist. Der Beginn einer optimalen kardioprotektiven Therapie bereits vor dem Auftreten der ersten Symptome wird empfohlen (2005).

2.3.2 Kognitiver Phänotyp und Hirnfunktion

Ein Zusammenhang zwischen nicht-progredienter mentaler Retardierung und DMD ist gut bekannt, obwohl der kognitive Phänotyp der Erkrankung deutlich variabler ist als die muskuläre Symptomatik. In einer Meta-Analyse fanden die Autoren den Intelligenzquotienten (IQ) von Patienten mit DMD etwa eine Standardabweichung (SD) unter dem der Normalbevölkerung, und etwa ein Drittel der Patienten zeigte eine mentale Retardierung (IQ <70) (Cotton *et al.*, 2001, Hinton *et al.*, 2000). Es besteht allerdings eine Diskrepanz zwischen Sprach- und Handlungsin-telligenz, mit stärkeren Defiziten im Bereich der verbalen Fähigkeiten (Cotton *et al.*, 2001). Ein Zusammenhang zwischen der Schwere der klinischen Symptomatik und dem kognitiven Phäno-tyt konnte nicht gefunden werden (Desguerre *et al.*, 2009). Die Abwesenheit von Dystrophin resultiert in messbaren Veränderungen der Hirnfunktion (Übersichtsarbeit zur Hirnfunktion bei DMD siehe (Anderson *et al.*, 2002)). In zerebralen Magnetresonanztomografie-Untersuchungen (cMRI) von Patienten mit DMD wurden zwar keine groben strukturellen Anomalien des Gehirns festgestellt (Rae *et al.*, 1998), mit Hilfe sensitiverer Analysetechniken konnten subtile Verände-rungen der grauen Substanz und ein abnormes neuronales Verhalten detektiert werden (Lv *et al.*, 2011, Tracey *et al.*, 1995). Eine erhöhte Inzidenz von Epilepsie bei Patienten mit DMD weist ebenfalls auf funktionelle oder strukturelle Anomalien des Gehirns hin, auch wenn kein Zusam-menhang zwischen dem Auftreten von Epilepsie und kognitiver Funktion gefunden werden konnte (Pane *et al.*, 2013a). Insgesamt sind die Rolle des Dystrophin im ZNS und die daraus folgenden klinischen Implikationen noch nicht abschließend aufgeklärt.

2.3.3 Anthropometrische Daten

Anomalien im Wachstum sind ein frühes Zeichen der DMD und können in der Extremform so-gar als Gedeihstörung im Säuglingsalter in Erscheinung treten (Rapisarda *et al.*, 1995). Generell scheint Kleinwuchs ein klinisches Merkmal der Erkrankung zu sein. Die Geburtslänge ist im normalen Rahmen, aber in den ersten Lebensjahren findet eine Verlangsamung des Längen-wachstums statt. Die Durchschnittsgröße der Patienten im Kindes- und Jugendalter liegt etwa eine SD unter der der Normalbevölkerung (Eiholzer *et al.*, 1988, McDonald *et al.*, 1995, Nagel *et al.*, 1999, Rapaport *et al.*, 1991, West *et al.*, 2013). Beim Gewicht, ebenfalls normal bei Ge-burt, zeigen jüngere Patienten eine Tendenz zum Übergewicht, während in DMD Patienten von über 14 Jahren schwereres Untergewicht mit Body Mass Index (BMI) unterhalb der 10. Perzentile ein Problem darstellt (McDonald *et al.*, 1995, West *et al.*, 2013, Willig *et al.*, 1993). Über den Kopfumfang bei DMD Patienten existieren wenige Daten. Es gibt Berichte über eine erhöhte

Inzidenz von Makrozephalie (Appleton *et al.* , 1991, Schmidt *et al.* , 1985). Ein Zusammenhang zwischen Kopfumfang und der kognitiven Funktion konnte nicht festgestellt werden (Appleton *et al.*, 1991).

2.3.4 Psychomotorische Entwicklung

Auffälligkeiten in der motorischen, sprachlichen und kognitiven Entwicklung gehören zu den frühesten Zeichen von DMD (Essex and Roper, 2001, Pane *et al.* , 2013b). Es wird sogar überlegt, als Methode zur frühzeitigen Diagnosestellung alle Kinder mit Entwicklungsverzögerung auf die Erkrankung zu testen (Dorling and Salt, 2001, Lundy *et al.* , 2007, Parsons *et al.* , 2004). In der motorischen Entwicklung zeigt sich im frühkindlichen Alter, dass DMD Patienten im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Kindern verlangsamt sind (Brooke *et al.*, 1989, Mazzone *et al.* , 2011). Obgleich in diesem Alter auch bei DMD Patienten insgesamt Entwicklungsfortschritte zu verzeichnen sind, werden die Meilensteine der motorischen Entwicklung wie Sitzen, Stehen und Laufen verspätet erreicht (Cyrulnik *et al.* , 2007). Kognitive Defizite zeigen sich unter dem Bild einer globalen Entwicklungsverzögerung mit besonderer Betroffenheit der sprachlichen Fähigkeiten (Cyrulnik *et al.* , 2008, Cyrulnik *et al.*, 2007, Smith *et al.* , 1989). Mit zunehmendem Alter verändert sich das Profil der intellektuellen Funktionen, vor allem im Bereich der verbalen Intelligenz (Cotton *et al.* , 2005). Im Laufe der kindlichen Entwicklung kristallisiert sich das Bild eines spezifischen kognitiven Profils bei DMD heraus, welches unabhängig ist von der generellen Ebene der intellektuellen Funktion (Hinton *et al.*, 2000). Es ist noch nicht bekannt, wie genau dieses kognitive Profil zustande kommt.

2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Im riesigen Dystrophin-Gen sind tausende von verschiedenen Mutationen beschrieben, und Untersuchungen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation müssen komplexe Zusammenhänge berücksichtigen. Maßgeblich hängt der klinische Phänotyp eines Patienten mit mutiertem Dystrophin-Gen davon ab, ob trotz der Mutation das kodierende Leseraster erhalten ist oder nicht (sogenannte Frame Shift Hypothese, vgl. 2.2.3). Selbst bei riesigen Deletionen von 46% des Dystrophin-Gens ist bei intaktem Leseraster lediglich ein milder Becker-Phänotyp beschrieben (England *et al.* , 1990). In umfassenden Untersuchungen konnte keine klare Korrelation zwischen Art, Ort oder Größe der Mutation und Ausprägung der Erkrankung gefunden werden (Desguerre *et al.*, 2009, Magri *et al.*, 2011). Studien, die anthropometrische Daten mit dem Genotyp korrelieren, existieren nicht. Eine Assoziation von mentaler Retardierung mit distalen Deletionen im

Dystrophin-Gen, die einen Verlust der ZNS-Isoformen Dp140 oder Dp71 hervorrufen, ist vielfach beschrieben (Felisari *et al.* , 2000, Moizard *et al.* , 1998, Moizard *et al.* , 2000). Für Dp140 und Dp71 konnte eine signifikante Korrelationen zwischen Genotyp und kognitiver und sprachlicher Entwicklung nachgewiesen werden, während für die motorische Entwicklung kein Unterschied gefunden wurde (Connolly *et al.* , 2013, Pane *et al.*, 2013b). Distale Mutationen scheinen zudem nicht nur die Schwere, sondern auch das individuelle Muster der kognitiven Defizite zu beeinflussen (D'Angelo *et al.* , 2011). Das spezifische kognitive Profil von DMD-Patienten (vgl. 2.3.4) wird dabei als Produkt des kumulativen Verlusts von funktionalen Isoformen angesehen (Taylor *et al.* , 2010, Waite *et al.* , 2012).

2.5 Diagnostik und Therapie der Muskeldystrophie Duchenne

2.5.1 Diagnostisches Vorgehen und Methoden

Nach gründlicher Anamnese sowie neurologischer und klinischer Untersuchung des Patienten ist der einfachste und preiswerteste Test bei Verdacht auf DMD die Untersuchung der Kreatinkinase (CK) im Blut, die sich meist bereits ab der Geburt massiv erhöht zeigt (Okinaka *et al.* , 1961). In jedem Fall sollte aber zusätzlich eine molekulare Bestätigung der Diagnose angestrebt werden. Am einfachsten ist es, dabei als erstes die am häufigsten von Deletionen betroffenen Exons zu untersuchen (Mutations-Hotspots; siehe 2.2.2). Dies geschieht mit Hilfe von Nachweiskits, die auf der Methode der *Multiplex polymerase chain reaction* (Multiplex-PCR) basieren (Beggs *et al.* , 1990, Chamberlain *et al.* , 1988). Das heutzutage am häufigsten angewendete quantitative Verfahren (Abbs *et al.* , 2010) ist die *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (Schouten *et al.* , 2002, Schwartz and Duno, 2004), mit der auch Deletionen außerhalb der Hotspots sowie Duplikationen erkannt werden können. Zur Identifikation von Punktmutationen kann es nötig sein, das ganze Gen zu sequenzieren, was zunehmend schneller und kostengünstiger möglich ist (Flanigan *et al.* , 2003). Noch sind diese und weitere Methoden der gentechnischen Untersuchung allerdings nicht überall verfügbar, sondern können lediglich in spezialisierten Zentren durchgeführt werden (Review zur Diagnostik und Therapie bei DMD siehe (Bushby *et al.* , 2010)). Ist die der Erkrankung zugrundeliegende Mutation bekannt, kann anhand dessen der Phänotyp durch Applikation der Frame-Shift-Hypothese meistens in Annäherung vorhergesagt werden.

Aufgrund der Fortschritte und der besseren Verfügbarkeit der molekularen Diagnostik wird die Muskelbiopsie als invasive Methode heute seltener angewandt. Sie ist dann indiziert, wenn die

genetische Testung bei typischer Klinik kein Resultat erbracht hat oder differentialdiagnostisch andere Muskeldystrophien ausgeschlossen werden sollen (Bushby *et al.*, 2010, Muntoni, 2001). Das Biopsat wird mit immunzytochemischen Verfahren und Western Blot auf das Vorhandensein von Dystrophin und anderen Muskelproteinen wie Sacroglykanen untersucht (Anderson and Davison, 1999). Bei DMD ist Dystrophin entweder nicht nachweisbar oder lediglich in einzelnen Muskelfasern vorhanden, sogenannten *revertant fibres*, die wahrscheinlich durch alternatives Splicen entstehen (Lu *et al.*, 2000, Nicholson *et al.*, 1990). Auch nach Erhalt eines klaren Muskelbiopsie-Ergebnisses ist eine molekulare Diagnostik zur besseren genetischen Beratung der Angehörigen sowie für experimentelle mutationsspezifische Gentherapien empfohlen (Bushby *et al.*, 2010).

2.5.2 Multidisziplinäre symptomatische Therapieansätze

Es existiert bis heute keine kausale Therapie für DMD-Patienten. Im Rahmen eines multidisziplinären Therapiekonzepts kann allerdings durch medikamentöse und supportive Therapiemaßnahmen das Fortschreiten der Krankheit beeinflusst und das Überleben der Patienten signifikant verlängert werden (Eagle *et al.*, 2002, Passamano *et al.*, 2012). Eine mittlerweile gut etablierte pharmakologische Maßnahme ist die Therapie mit den Kortikosteroiden Prednisolon (meist 0,75 mg/kgKG/d) oder Deflazacort (meist 0,9 mg/kgKG/d) ab dem 4.-8. Lebensjahr bei erhaltener Gehfähigkeit (Cochrane Metaanalyse siehe (Manzur *et al.*, 2008)). Durch einen ungeklärten Mechanismus können Kortikosteroide über einen gewissen Zeitraum die Muskelfunktion verbessern oder stabilisieren, die Gehfähigkeit von Patienten erhalten und bei Langzeitbehandlung sogar die Häufigkeit respiratorischer und kardialer Komplikationen vermindern (Biggar *et al.*, 2006, Moxley *et al.*, 2005). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Kleinwuchs, Übergewicht und verminderte Knochendichte mit entsprechenden Komplikationen (Angelini and Peterle, 2012, Manzur *et al.*, 2008, Moxley *et al.*, 2010). Deflazacort soll etwas weniger Nebenwirkungen zeigen als Prednisolon (Bonifati *et al.*, 2000).

Gelenkkontrakturen sowie Skoliose entwickeln sich durch die zunehmende Muskelschwäche und Unbeweglichkeit des Patienten und limitieren den eingeschränkten Bewegungsradius der Patienten noch mehr (McDonald *et al.*, 1995). Zur Prävention sind frühzeitige Physiotherapie und der Gebrauch von Orthesen wichtig (Skalsky and McDonald, 2012). Es gibt keine einheitlichen evidenzbasierten Empfehlungen über eine chirurgische Vorgehensweise bei Kontrakturen oder Skoliose; die Therapieentscheidung sollte individuell erfolgen (Cochrane Reviews zu chirurgischer Behandlung von Kontrakturen bei neuromuskulären Erkrankungen siehe (Cheuk *et al.*, 2013,

Rose *et al.* , 2010)). Der Effekt von Bewegung auf die Muskelfunktion bei DMD wird kontrovers beurteilt (Eagle, 2002, Markert *et al.* , 2011). Moderates Training scheint allerdings eine Besserung des muskulären Outcomes zu bewirken (Jansen *et al.* , 2013).

2.5.3 Behandlung von Spätkomplikationen

Mit zunehmender Muskelschwäche entwickeln DMD Patienten eine hyperkapnische respiratorische Insuffizienz (Inkley *et al.* , 1974). Bei der assistierten Beatmung wird vielfach die Technik der nicht-invasiven Heimbeatmung bevorzugt, die rein nächtlich oder kontinuierlich über 24 Stunden durchgeführt werden kann (Bach *et al.* , 1993, Soudon *et al.* , 2008). In Verbindung mit regelmäßigen Maßnahmen zur Atemwegs-Clearance wird dies heute als Standardbehandlung für respiratorische Insuffizienz bei DMD Patienten empfohlen und eine Tracheotomie nur bei Komplikationen oder Kontraindikationen für die nicht-invasive Technik durchgeführt (Richtlinien siehe (Finder *et al.* , 2004)). Durch die effektive Behandlung der respiratorischen Insuffizienz ist die Kardiomyopathie mittlerweile die häufigste Todesursache bei DMD (Passamano *et al.*, 2012). Als Therapie und Prophylaxe hat sich analog zu dilatativen Kardiomyopathien anderer Genese eine Behandlung mit ACE-Hemmern und/oder Betablockern als wirksam erwiesen (Duboc *et al.* , 2007, Ogata *et al.* , 2009, Rhodes *et al.* , 2008). Der Beginn der pharmakologischen Therapie wird heute bereits vor Einsetzen der ersten Symptome empfohlen (2005).

2.5.4 Experimentelle Therapien

Mithilfe von multidisziplinären symptomatischen Therapieansätzen konnte der natürliche Krankheitsverlauf der DMD verlangsamt und ein Überleben der Patienten oft bis in die dritte oder vierte Lebensdekade erreicht werden (Eagle *et al.*, 2002, Passamano *et al.*, 2012). An kurativen Behandlungsansätzen wird vor allem im Bereich der Gentherapie und Stammzelltherapie geforscht. Tierexperimentell gab es zum Teil vielversprechende Ergebnisse, und einige Substanzen werden aktuell in frühen Phasen von klinischen Studien getestet (Übersichtsarbeiten zu experimentellen Therapieansätzen bei DMD siehe (Konieczny *et al.* , 2013, Rodino-Klapac *et al.* , 2013)). Obwohl große Hoffnung auf diesen Methoden ruht, ist es bis zu ihrem routinemäßigen klinischen Einsatz noch ein weiter Weg.

3 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

Ein Ziel der Studie war es, mittels retrospektiver Untersuchung an einer großen Patientenkohorte Informationen zu Wachstum und psychomotorischer Entwicklung von DMD Patienten zu erhalten. Dies ist besonders zur früheren Erkennung und Diagnose betroffener Kinder wichtig. Hierbei sollten besonders folgende Fragestellungen erörtert werden:

- *Gibt es Wachstumsauffälligkeiten bei Kindern mit DMD? Wie lässt sich deren Entstehung in den zeitlichen Verlauf der Entwicklung einordnen?*
- *Wie verläuft die motorische und kognitive Entwicklung der Kinder mit DMD? Zu welchem Prozentsatz tritt eine motorische oder kognitive Entwicklungsretardierung auf?*

Das Wachstum sollte anhand der Parameter Größe, Gewicht und Kopfumfang charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch die Auswirkung einer Steroidtherapie auf das Wachstum der Kinder untersucht. Die im Rahmen der Studie gewonnenen Daten sollten mit den Angaben der Literatur verglichen werden.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Analyse von den der Erkrankung zugrundeliegenden Mutationen im Dystrophin-Gen. Wichtige Gesichtspunkte dieser Analyse waren:

- *Welche Anteile haben Mutationsarten jeweils an der Gesamtzahl der Mutationen?*
- *Gibt es bevorzugte Lokalisationen der Mutationen auf dem Dystrophin-Gen? Unterscheiden sich diese für die einzelnen Mutationsarten?*
- *Welche Exone sind bevorzugt von Deletionen betroffen, und wo sind die Bruchpunkte der Deletionen häufig lokalisiert?*

Die genaue Charakterisierung der Mutationen im Dystrophin-Gen sind nicht nur für das Verständnis der Pathogenese und Pathophysiologie von DMD wichtig, sondern auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten aus dem Bereich der Gentherapie. Die Ergebnisse der Patientenkohorte sollten mit anderen Datenbanken mit genetischen Befunden von Patienten mit Mutation im Dystrophin-Gen verglichen werden (zum Beispiel *Leiden Database* unter www.dmd.nl).

Zur Untersuchung einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurden die Daten für Wachstum und Entwicklung in Zusammenhang mit den genotypischen Informationen gesetzt. Hier sollte untersucht werden:

- *Existiert eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation für anthropometrische Daten oder psychomotorische Entwicklung? Stimmen die gewonnenen Erkenntnisse mit Literaturangaben überein?*
- *Welche Implikationen hat dies für die Funktion der Isoformen des Dystrophin?*

In der Literatur wurden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bisher vor allem für kognitive Entwicklung erforscht. Zu anthropometrischen Daten hingegen existieren keine Studien, die den Genotyp berücksichtigen. Zu den genauen Funktionen der Isoformen des Dystrophin sind ebenfalls noch viele Fragen offen. Möglicherweise können aus Genotyp-Phänotyp-Analysen Rückschlüsse auf die Funktion der Isoformen gezogen werden.

4 Patienten und Methoden

4.1 Patienten

4.1.1 Rekrutierung der Patienten

Für die vorliegende Studie wurden medizinische Aufzeichnungen der Neuropädiatrien der Universitätskinderkliniken Essen, Berlin und Dresden aus der Zeit von 1975 bis 2011 von Patienten mit Duchenne Muskeldystrophie (DMD) herangezogen. Als Einschlusskriterien wurden ein Alter von über 2 Jahren und höchstens 17 Jahren bei Follow-up, das Vorhandensein von Daten zum Kopfumfang in der Akte, ein klinischer Dystrophinopathie-Phänotyp sowie eine molekulargenetische und/oder muskelbiopsische Sicherung der Diagnose DMD formuliert. Insgesamt konnten so 263 Jungen mit einem Altersdurchschnitt von 7 Jahren und 1,5 Monaten in die Studie eingeschlossen werden, davon 144 Patienten aus Essen, 71 aus Berlin und 48 aus Dresden (Abbildung 2). Über 90% der Patienten sind kaukasischen Ursprungs.

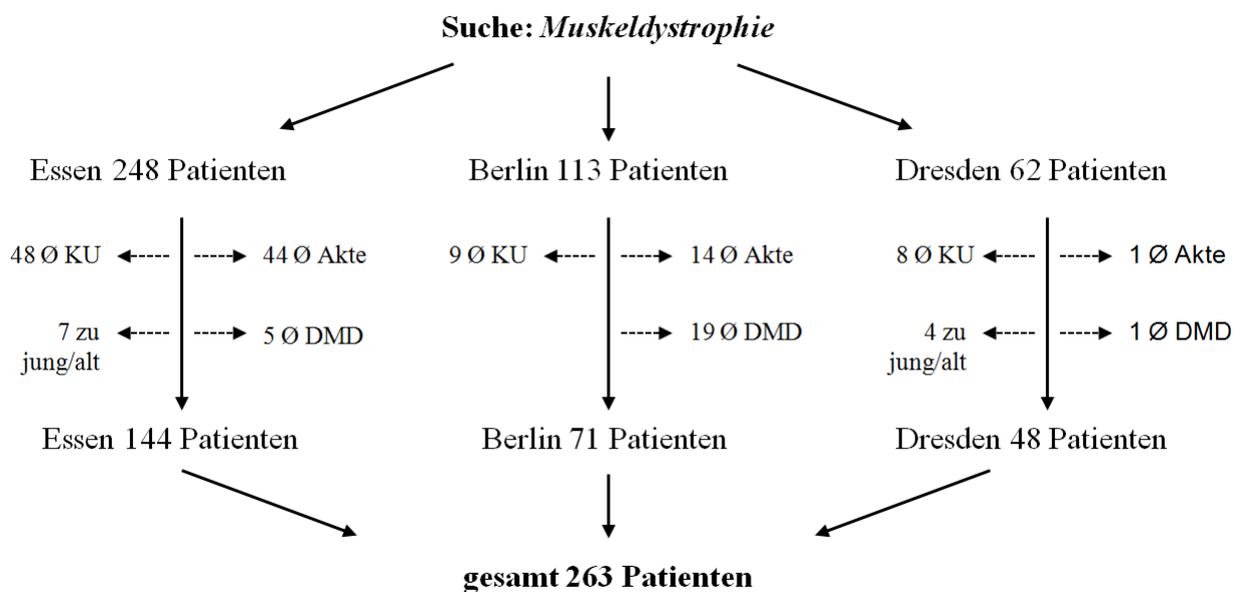


Abbildung 2: Schema zur Patientenrekrutierung aus den Universitätskinderkliniken Essen, Berlin und Dresden; Abkürzungen: Ø KU, keine Kopfumfangsangabe; Ø DMD, keine Bestätigung der Diagnose einer DMD; Ø Akte, keine Akte auffindbar.

4.1.2 Universitätskinderklinik Essen

Eine Suche im Computersystem der Universitätskinderklinik Essen unter dem Diagnosestichwort „Muskel dystrophie“ im August 2011 identifizierte 248 Patienten mit DMD, die im angegebenen

Zeitraum in der Abteilung für Neuropädiatrie behandelt wurden. Davon mussten 104 Patienten aus den folgenden Gründen aus der Studie ausgeschlossen werden: Es waren keine Akten auffindbar (44 Patienten; ein Zugriff auf das Altarchiv bestand nicht), es gab keine Daten zum Kopfumfang in den ambulanten oder stationären Akten (48 Patienten), die Diagnose DMD war nicht genetisch oder muskelbiologisch gesichert worden (insgesamt 5 Patienten: 1 Diagnose einer Muskeldystrophie Typ Becker, 3 lediglich unbestätigte Verdachtsdiagnosen, 1 Diagnose einer Dystrophie unklarer Genese) oder es bestand bei Follow-up ein Alter von unter 2 Jahren (3 Patienten) oder von über 17 Jahren (4 Patienten). Aus Essen konnten 144 Patienten in die Studie aufgenommen werden.

4.1.3 Sozialpädiatrisches Zentrum der Charité Berlin

Eine Suche im Computersystem des Sozialpädiatrischen Zentrum (SPZ) der Charité Berlin im April 2011 unter dem Diagnosestichwort „Muskeldystrophie“ identifizierte 113 Patienten, die dort im angegebenen Zeitraum in Behandlung waren. Aus dem Archiv des SPZ sowie aus Beständen des Altarchivs (Patienten, die seit mehr als 2 Jahren nicht mehr zur Behandlung im SPZ waren) konnten die Akten von insgesamt 99 Patienten eingesehen werden. Bei 14 Patienten waren die Akten im Zeitraum April-Mai 2011 nicht auffindbar. 28 Patienten mussten aus den folgenden Gründen aus der Studie ausgeschlossen werden: es waren keine Daten zum Kopfumfang in der Akte vorhanden (9 Patienten) oder es gab keine gesicherte DMD Diagnose (Dystrophie Typ Becker, Gliedergürteldystrophie, Dystrophie unklarer Genese; 19 Patienten). Insgesamt wurden 71 Patienten aus Berlin eingeschlossen.

4.1.4 Universitätskinderklinik Dresden

Für die neuropädiatrische Abteilung der Universitätskinderklinik Dresden wurden im April 2011 unter dem Diagnosestichwort „Muskeldystrophie“ 62 Patienten identifiziert. 14 Patienten wurden aus den folgenden Gründen ausgeschlossen: Es war keine Akte auffindbar (1 Patient), es gab keine Daten zum Kopfumfang in der Akte (8 Patienten), es bestand die Diagnose einer Dystrophie vom Intermediärtyp (1 Patient) oder die Patienten hatten bei Follow-up ein Alter unter 2 Jahren (2 Patienten) oder über 17 Jahren (2 Patienten). Aufgenommen in die Studie wurden 48 Patienten aus Dresden.

4.2 Parameter der Datenaufnahme

4.2.1 Generelle Vorgehensweise

Die relevanten Daten wurden retrospektiv aus den ambulanten und stationären Akten der Patienten entnommen und in eine Excel-Tabelle eingetragen. In der weiteren Analyse wurden die Daten anonymisiert unter einer Nummer verarbeitet. Zu jedem Patienten wurden Basisdaten (Geburtsdatum, Herkunft) und Informationen zur Diagnosestellung der DMD aufgenommen. Sofern bekannt wurde zusätzlich der genaue genetische Defekt erfasst. Außerdem wurden anthropometrische Daten bei Geburt und zu einem Follow-up Zeitpunkt postnatal, weitere relevante Erkrankungen, Medikamente (vor allem eine Steroidtherapie) sowie Daten zur motorischen und kognitiven Entwicklung der Patienten festgehalten. Eine Auflistung der einzelnen Parameter sowie die Anzahl der verfügbaren Patientendaten pro Parameter finden sich in *Tabelle 1* sowie im Ergebnisteil dieser Arbeit.

Tabelle 1: Parameter der Datenaufnahme und Anzahl der Patienten pro Parameter

Parameter der Datenaufnahme		Pat.
Gesamte Kohorte		263
Art der Diagnosestellung	Genetisch	219
	Muskelbiopsie	44
Schwangerschaft und Geburt	37.-41.SSW (reif)	188
	<37.SSW (früh)	26
	Keine Information	49
Anthropometrische Daten bei Geburt	Geburtslänge	177
	Geburtsgewicht	186
	Kopfumfang	87
Anthropometrische Daten bei Follow-up	Größe	261
	Gewicht/BMI	260
	Kopfumfang	263
Patienten unter Steroidtherapie	Gesamt	29
	Prednisolon	3
	Deflazacort	26
Daten zur motorischen Entwicklung		193
Daten zur kognitiven Entwicklung		195

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt des Follow-up lag bei 7 Jahren und 1,5 Monaten. Die Altersspanne reichte von 2 bis 17 Jahren. Eine grafische Darstellung der Altersstruktur der Patientenkohorte findet sich in *Abbildung 3*.

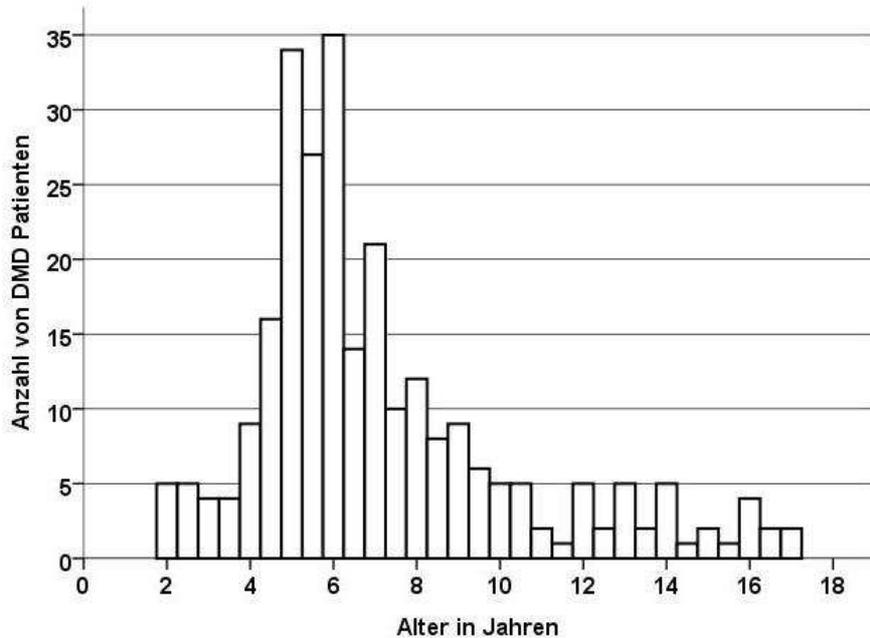


Abbildung 3: Altersstruktur der Patientenkohorte zum Zeitpunkt des Follow-up

4.2.2 Diagnosestellung der Muskeldystrophie Duchenne

Die Art der Diagnosestellung der DMD wurde vermerkt (molekulargenetische und/oder muskelbiopsische Sicherung der Diagnose) sowie das Zentrum, das die Untersuchung durchgeführt hatte. Der Genotyp wurde nur aus dem Gutachten des durchführenden Instituts entnommen. Erwähnungen des Genotyps in Arztbriefen wurden nicht als ausreichend erachtet. Als Kriterien für einen positiven Befund der Muskelbiopsie wurde ein völliges Fehlen von Dystrophin im Muskel angesehen. Sofern eine molekulargenetische Sicherung der Diagnose DMD erfolgt war, wurde der genaue Genotyp der Patienten vermerkt.

4.2.3 Anthropometrische Daten

Soweit in den Akten eine Schwangerschaftsanamnese vorhanden war, wurden Daten über Körpergröße, Gewicht und Kopfumfang bei der Geburt zusammen mit der Dauer der Schwangerschaft in Schwangerschaftswochen (SSW) aufgenommen. Als Follow-up wurden unter Vermerk des Patientenalters zu diesem Zeitpunkt ebenfalls Körpergröße, Gewicht und Kopfumfang der

Jungen vermerkt. Zur besseren Beurteilung des Ernährungszustandes der Patienten (Unter-, Über- oder Normalgewicht zum Zeitpunkt des Follow-up) wurde der Body Mass Index (BMI) herangezogen, der das Gewicht pro m² Körperoberfläche angibt und nach der Formel

$$BMI = (\text{Körpergewicht in kg})/(\text{Körpergröße in m})^2$$

berechnet wird. Es kann damit selbstverständlich keine Aussagen über die individuelle Zusammensetzung der Körpermasse gemacht werden.

4.2.4 Steroidtherapie

Es ist bekannt, dass die Gabe von Steroiden in der Wachstumsphase die körperliche Entwicklung beeinflusst. Daher wurde eine Steroidtherapie von mindestens 6 Monaten Dauer vor dem Zeitpunkt des Follow-up in den Datensatz aufgenommen und beim Vergleich der anthropometrischen Daten berücksichtigt. Die Therapie wurde bei allen Patienten entweder mit Deflazacort 0,9 mg/kg Körpergewicht jeden Tag oder alternativ mit Prednisolon 0,75 mg/kg Körpergewicht nach einem Schema 10 Tage Einnahme – 10 Tage Pause durchgeführt.

4.2.5 Motorische und kognitive Entwicklung

Als Parameter für die motorische Entwicklung der Kinder wurde das Alter des Laufenlernens (erste freie Schritte) als wichtiger Meilenstein der grobmotorischen Entwicklung herangezogen. Zur Einschätzung der kognitiven Entwicklung wurden, soweit vorhanden, IQ-Tests benutzt. Für die Untersuchung verwendete Test sind *Kaufman Assessment Battery for Children* und *Wechsler Intelligence Scale for Children*. Zusätzlich wurde das kognitive Niveau der Jungen mit Hilfe der besuchten Schulform (Regel-Grundschule/Hauptschule/Realschule/Gymnasium bzw. Förderschule für Körperbehinderte auf demselben Niveau; Förderschule für Lernbehinderte; Förderschule für geistig Behinderte) eingeschätzt. In den Akten der Patienten fanden sich eine Reihe neuropsychologischer Nebendiagnosen aus den Bereichen der Intelligenzstörungen (ICD10 F70-F79) und Entwicklungsstörungen (ICD10 F80-89), die ebenfalls Aufschluss über kognitive Leistungen geben konnten.

4.3 Analyse der Daten und statistische Auswertung

4.3.1 Interpretation der Daten zum Wachstum

Aufgrund des unterschiedlichen Alters der Patienten bei Follow-up war es nicht praktikabel, die absoluten Datenwerte zur direkten Analyse heranzuziehen. Um die körperliche Entwicklung der Patienten zu analysieren, wurden die anthropometrischen Daten stattdessen anhand einer alters- und geschlechtsangeglichenen Referenzpopulation beurteilt und als Perzentilen (P, z.B. P3 = dritte Perzentile) ausgedrückt. Dies geschah mit Hilfe von standardisierten Perzentilenkurven und -tabellen. Es wurden Perzentilenkurven verwendet für anthropometrische Daten bei Geburt (Voigt *et al.* , 2006), für postnatale Körpergröße und Kopfumfang (Stolzenberg *et al.* , 2007) sowie für postnatalen BMI (Kromeyer-Hauschild *et al.* , 2001).

4.3.2 Einteilung der Kategorien für motorische und kognitive Entwicklung

Zur Evaluation der motorischen Entwicklung der Kinder wurde das Alter des Laufenlernens (erste freie Schritte) als wichtiger grobmotorischer Meilenstein herangezogen. Die Entwicklung wurde dann weiterhin als unauffällig (Laufen bis einschließlich 18 Monate), verzögert (Laufen zwischen 19 und 24 Monaten) und stark verzögert (Laufen später als 24 Monate) eingestuft. Die kognitive Entwicklung wurde als innerhalb des Normalen (IQ über 85 und/oder Besuch einer normalen Schule), Lernbehinderung (IQ zwischen 85 und 55 und/oder Besuche einer Schule für Lernbehinderte) oder geistige Behinderung (IQ unter 55 und/oder Besuch einer Förderschule für geistig Behinderte) charakterisiert.

4.3.3 Gruppierung der Patienten anhand des Genotyps

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei DMD zu untersuchen. Dazu wurden bei allen genotypisierten Patienten (N=220) sowohl die anthropometrischen Daten als auch die psychomotorische Entwicklung in Relation zum Genotypen betrachtet. Die genetische Vielfalt der Mutationen im Dystrophin-Gen ist allerdings enorm. In der *Leiden Database*, einer Datenbank mit genetischen Befunden von Patienten mit Mutation im Dystrophin (Aartsma-Rus *et al.*, 2006, White and den Dunnen, 2006) sind mehrere tausend verschiedene Mutationen beschrieben. Im vorliegenden Patientenkollektiv lagen bei 220 genotypisierten Patienten 126 verschiedene Mutationen vor. Es war daher nicht möglich, die einzelnen Mutationen auf ihren Phänotyp hin zu vergleichen, sondern die Patienten mussten entsprechend ihrer Mutationen in ein Klassifikationssystem eingeordnet werden.

Studien haben gezeigt, dass eine auf strukturellen DNA-Elementen (z.B. der Größe der Deletion oder Deletion spezifischer Exone) beruhende Einteilung der Mutationen nicht gut zur Aufdeckung von Genotyp-Phänotyp Korrelationen herangezogen werden kann (Taylor *et al.*, 2010). Stattdessen wurde in der vorliegenden Studie ein Klassifikationssystem verwendet, das auf durch die Mutation betroffenen Dystrophin-Isoformen beruht. Es gibt 5 verschieden große Protein-Isoformen des Dystrophins. Je distaler die Genmutation, desto mehr Isoformen sind betroffen (vgl. Kapitel 2.2.2). Somit konnten die Patienten anhand der durch ihre Mutation betroffenen Isoformen des Dystrophin in 5 Gruppen eingeteilt werden, die sich durch die Lokalisation ihrer Mutation im Dystrophin-Gen ergeben (Tabelle 2).

Tabelle 2: Gruppierung der Patienten anhand des Genotyps. Gruppen (Gr.) eingeteilt anhand der intakten/betroffenen Isoformen des Dystrophin-Protein (Dp); Zahl repräsentiert Molekulargewicht in Kilodalton (siehe auch Abbildung 1 für mehr Information zu den verschiedenen Proteinisoformen des Dystrophin)

Gr.	Bereich der Mutation	Von der Mutation betroffene Isoformen	Korrekt exprimierte Isoformen
1	Exon 1-29	Dp427	Dp260, Dp140, Dp116, Dp71
2	Exon 30-44	Dp427, Dp260	Dp140, Dp116, Dp71
3	Exon 45-55	Dp427, Dp260, Dp140	Dp116, Dp71
4	Exon 56-62	Dp427, Dp260, Dp140, Dp116	Dp71
5	Exon 63-79	Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71	-

4.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme „Microsoft Office Excel 2003“ sowie „SPSS IBM Statistics 19“. Für die deskriptive Statistik wurden Mittelwerte, maximale und minimale Werte sowie Standardabweichungen bestimmt. Häufigkeitsanalysen wurden für die Perzentilerverteilung der anthropometrischen Daten (Größe, Gewicht, OFC) bei Geburt und bei Follow-up gemacht. Für die reif geborenen Kinder wurde auch aus den absoluten Werten für Geburtslänge, Gewicht und Kopfumfang eine Analyse erstellt. Alle Parameter wurden einerseits auf ihre Häufigkeit innerhalb der gesamten Patientenkohorte und andererseits aufgeteilt nach Genotyp (siehe Kapitel 4.3.2) analysiert. Die Daten zur motorischen und kognitiven Entwicklung wurden ebenfalls sowohl auf ihre Verteilung innerhalb der gesamten Kohorte als auch nach Genotypen getrennt auf ihre Häufigkeit untersucht.

Es erfolgte ebenfalls eine genauere Untersuchung der vorliegenden genetischen Daten der Patientenkohorte. Die Häufigkeit der verschiedenen Arten von Mutationen im Dystrophin-Gen (Deletion, Duplikation, Punktmutation) wurden ermittelt. Außerdem erfolgte eine Analyse der Verteilung der *deletion breakpoints* (Intron, in dem das 3' und das 5' Ende der Deletion liegt) sowie der Gesamthäufigkeit der Deletion der einzelnen Exons.

5 Ergebnisse

5.1 Anthropometrische Daten

5.1.1 Werte bei Geburt

Die Perzentilen für Länge, Gewicht und Kopfumfang bei Geburt waren in der Patientenkohorte annähernd normal verteilt (*Abbildung 4A; Tabelle 3*). Eine Analyse der Werte Reifgeborener (37.-41. SSW) ergab eine durchschnittliche Länge von 51,7 cm (SD 2,43 cm), ein Gewicht von 3492 g (SD 411 g) und einen OFC von 35,5 cm (SD 1,4 cm) (*Abbildung 4B*). Die 50. Perzentile einer Vergleichspopulation lag für die 40. SSW bei 52 cm Länge, 3600 g Gewicht und 35,7 cm OFC.

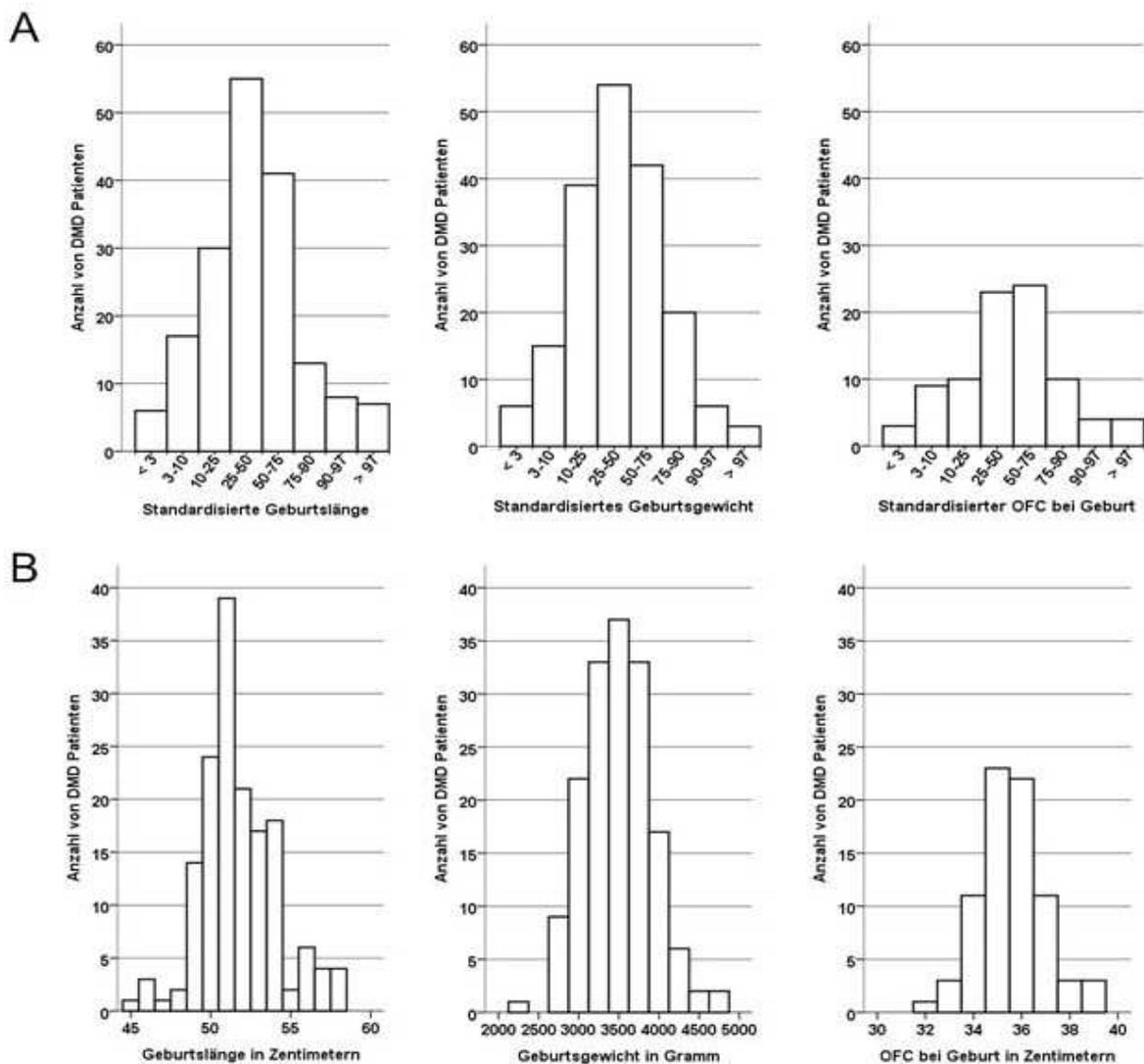


Abbildung 4: Länge, Gewicht und OFC bei Geburt (A) Angabe als standardisierte Perzentilen (B) Angabe als Absolutwerte, nur reifgeborene Kinder eingeschlossen (37.-41. Schwangerschaftswoche)

Tabelle 3: Patientenzahl pro Parameter für anthropometrische Daten bei Geburt

Parameter der Datenaufnahme		Pat.
Anthropometrische Daten bei Geburt	Größe	177
	Gewicht	185
	Kopfumfang	87
Anthropometrische Daten bei Geburt (<i>nur reife Neugeborene</i>)	Größe	156
	Gewicht	162
	Kopfumfang	77

5.1.2 Postnatale Entwicklung der Patientenkohorte

In der postnatalen Entwicklung der DMD Patienten zeigten sich Abweichungen ihrer anthropometrischen Daten von altersangeglichenen Normen (vgl. *Abbildung 5* und *Abbildung 6A*). Die Körpergröße der Patienten blieb deutlich hinter dem erwarteten Wachstum zurück. Insgesamt entwickelten fast 30% der Jungen einen Kleinwuchs (Körpergröße < P3), und mehr als 80% der Patienten befanden sich mit ihrer Größe unterhalb der 50. Perzentile. Die Verteilung des postnatalen BMI zeigte eine Rechtsverschiebung mit 68% der Patienten oberhalb der 50. Gewichtspzentile. Beim OFC hingegen fiel eine Linksverschiebung der Verteilung auf mit 65% der Patienten unterhalb P50. Die Rate an Mikrozephalie (OFC < P3) lag bei 5% anstatt der statistisch zu erwartenden 3%.

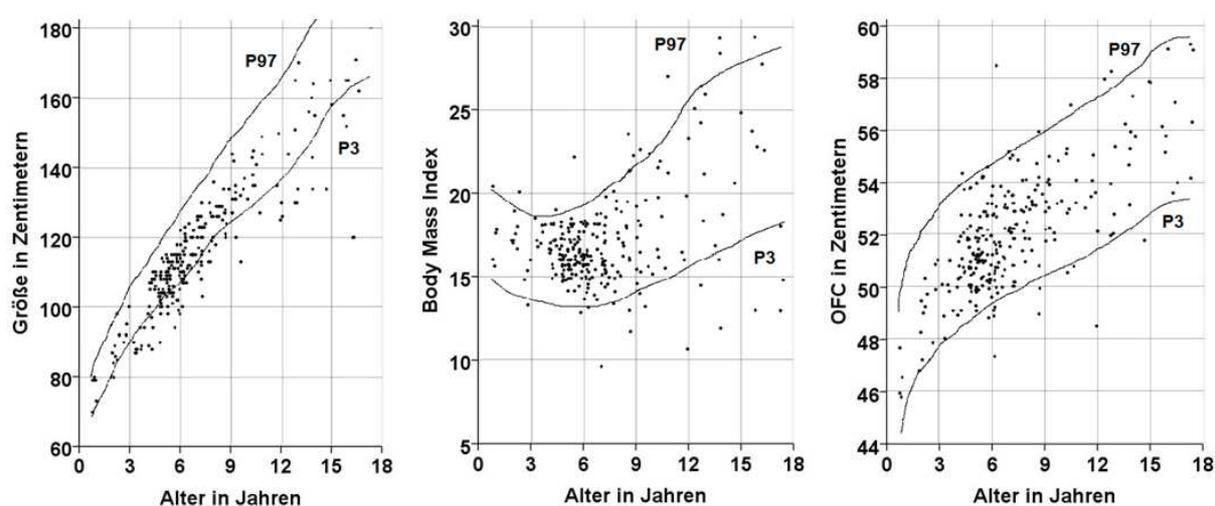


Abbildung 5: Darstellung von Größe, BMI und OFC der gesamten Patientenkohorte als Scatterplots; Linien P3 und P97 repräsentieren die 3. bzw. 97. Perzentile im Vergleich mit einer alters- und geschlechtsangeglichenen Referenzpopulation

5.1.3 Postnatale Werte nach Altersgruppen aufgeteilt

Um den zeitlichen Verlauf der körperlichen Entwicklung besser einschätzen zu können, wurden gesondert die anthropometrischen Daten von jüngeren Kindern im Alter zwischen 2 und 5 Jahren sowie die älterer Kinder im Alter von 8 bis 17 Jahren analysiert (*Abbildung 6B, C; Tabelle 4*). Patienten, die eine Steroidtherapie erhielten (N=29), wurden von dieser Analyse ausgeschlossen, um eine mögliche Verfälschung der Werte zu verhindern. In der Altersgruppe 2-5 Jahre war der Anteil der kleinwüchsigen Kinder mit 27% bereits vergleichbar mit dem Anteil in der gesamten Patientenpopulation (29%). Bei lediglich 22% überschritt die Körpergröße die 50. Perzentile (gesamtes Patientenkollektiv: 17%). Der Kleinwuchs bei DMD scheint sich also bereits früh in der Entwicklung zu manifestieren. Dementsprechend veränderte sich der Anteil an Kleinwüchsigen in der Altersgruppe der älteren Patienten nicht maßgeblich. Der Kopfumfang lag bei den jungen und älteren Kindern in 69% und 64% unterhalb P50, was ebenfalls jeweils vergleichbar ist mit dem des gesamten Patientenkollektiv (65% unterhalb P50). Die Rate der Mikrozephalien betrug 4% bzw. 6% (gesamtes Patientenkollektiv 5% Mikrozephalie). Beim BMI hingegen fand mit zunehmendem Alter eine Veränderung statt. Die jüngeren Kinder zeigten, wie in den Daten für die Gesamtpopulation widergespiegelt, eine Rechtsverschiebung der Normalverteilungskurve des BMI und tendierten somit eher zu höherem Körpergewicht (79% über P50). Die Anteile an starkem Über- oder Untergewicht (BMI >P97 und <P3) lagen, wie es statistisch zu erwarten ist, unter 3%. Im Gegensatz dazu war die Verteilungskurve bei den älteren Kindern stark abgeflacht. In dieser Patientengruppe stellten sowohl schwere Unterernährung als auch starkes Übergewicht ein Problem dar mit einem jeweiligen Anteil von 14% betroffenen Patienten.

Tabelle 4: Patientenzahl pro Parameter für postnatale anthropometrische Daten

Parameter der Datenaufnahme		Pat.
Anthropometrische Daten bei Follow-up	Größe	261
	Gewicht/BMI	260
	Kopfumfang	263
Anthropometrische Daten Patienten 2-5 Jahre	Größe	77
	Gewicht/BMI	77
	Kopfumfang	77
Anthropometrische Daten Patienten 8-17 Jahre (ohne Steroidpatienten)	Größe	50
	Gewicht/BMI	50
	Kopfumfang	52

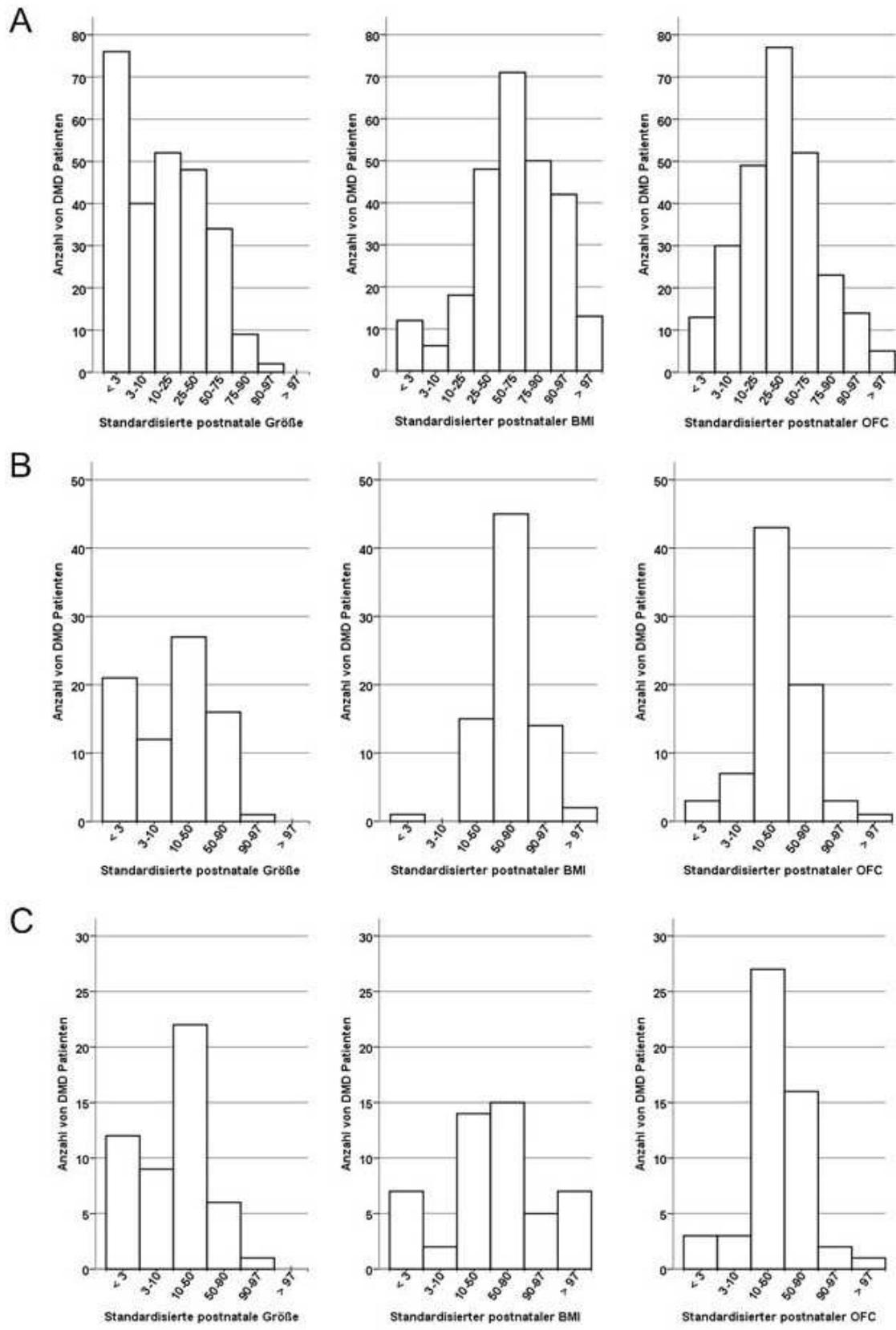


Abbildung 6: Postnatale Größe, BMI und OFC (A) für das gesamte Patientenkollektiv (B) für Kleinkinder der Altersgruppe 2-5 Jahre (N=77) (C) für ältere Patienten der Altersgruppe 8-17 Jahre ohne Steroidtherapie (N = 50 für Größe und BMI, N = 52 für OFC)

5.1.4 Auswirkungen der Steroidtherapie auf anthropometrische Daten

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung hatten 29 von 263 Patienten für mindestens 6 Monate eine Steroidtherapie erhalten. Trotz der kleinen Stichprobengröße lässt die Analyse der anthropometrischen Daten dieser Untergruppe einige Rückschlüsse auf den Einfluss der Steroide auf das Wachstum zu. Der Anteil der kleinwüchsigen Patienten war unter Steroidtherapie mit 45% der Patienten <P3 deutlich höher als im gesamten Patientenkollektiv (*Abbildung 7*). Eine Steroidtherapie verstärkt also die ohnehin bestehende Tendenz der DMD Patienten zum Kleinwuchs (vgl. *Abbildung 5* und *Abbildung 6A*). Bei 90% der Patienten unter Steroidtherapie lag die Körpergröße unterhalb der 50. Größenperzentile, was in ähnlicher Größenordnung auch bei steroidfreien Patienten gleichen Alters beobachtet wurde (86% der Altersgruppe 8-17 Jahren; vgl. *Abbildung 6C*). Bei der Analyse des BMI fiel eine abgeflachte Verteilungskurve auf, die ebenfalls an die Verteilung bei den älteren steroidfreien Patienten erinnert (*Abbildung 6C*). Der Anteil an untergewichtigen Patienten war allerdings bei den Steroidpatienten im Vergleich mit dieser Patientengruppe deutlich geringer (3% im Vergleich zu 14% der 8-17 Jährigen ohne Steroidtherapie). Auf den Kopfumfang scheint eine Steroidtherapie nach dem 6. Lebensjahr keinen Einfluss zu haben, da die Perzentilenverteilung des OFC der Verteilung in den übrigen Analysegruppen ähnelt.

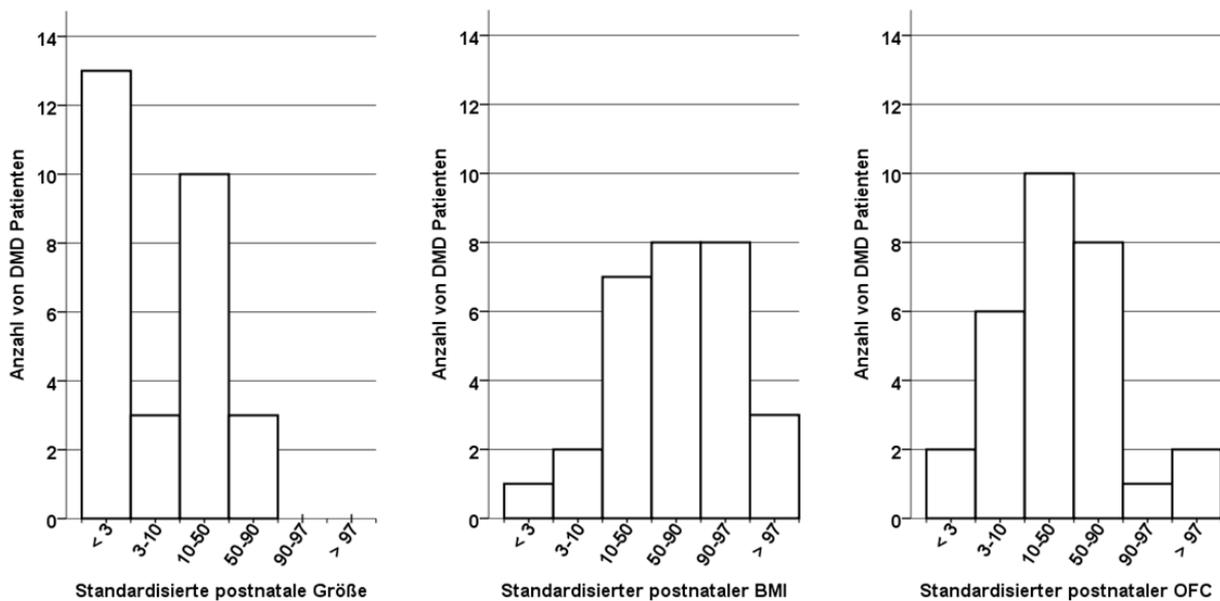


Abbildung 7: Postnatale Größe, BMI und OFC für Patienten mit Steroidtherapie (N = 2; Alter 6,5-17 Jahre, Durchschnittsalter 10,8 Jahre)

5.2 Motorische und kognitive Entwicklung

Zur Einschätzung der grobmotorischen Entwicklung der DMD-Patienten wurde das Alter der ersten freien Schritte als wichtiger grobmotorischer Meilenstein herangezogen. Das mittlere Laufalter in der vorliegenden Patientenkohorte war 18,3 Monate. 30% der Kinder liefen mit 18 Monaten noch nicht (verzögerte motorische Entwicklung), und 8% liefen sogar später als 24 Monate (stark verzögerte motorische Entwicklung; *Abbildung 8A*). Für die Beurteilung der kognitiven Entwicklung wurden IQ-Tests sowie die besuchte Schulform herangezogen. Beinahe die Hälfte der Kohorte zeigte eine Einschränkung der kognitiven Leistung (*Abbildung 8B*). Es waren lediglich 57% der Patienten kognitiv unauffällig entwickelt, 26% wiesen eine Lernbehinderung (IQ 85-70) und 17% eine geistige Behinderung (IQ <70) auf. Von den 13 mikrozephalen Patienten dieser Studie lag bei 9 Informationen zur kognitiven Funktion vor. Jeweils 3 Patienten waren kognitiv unauffällig, 3 lernbehindert und 3 geistig behindert.

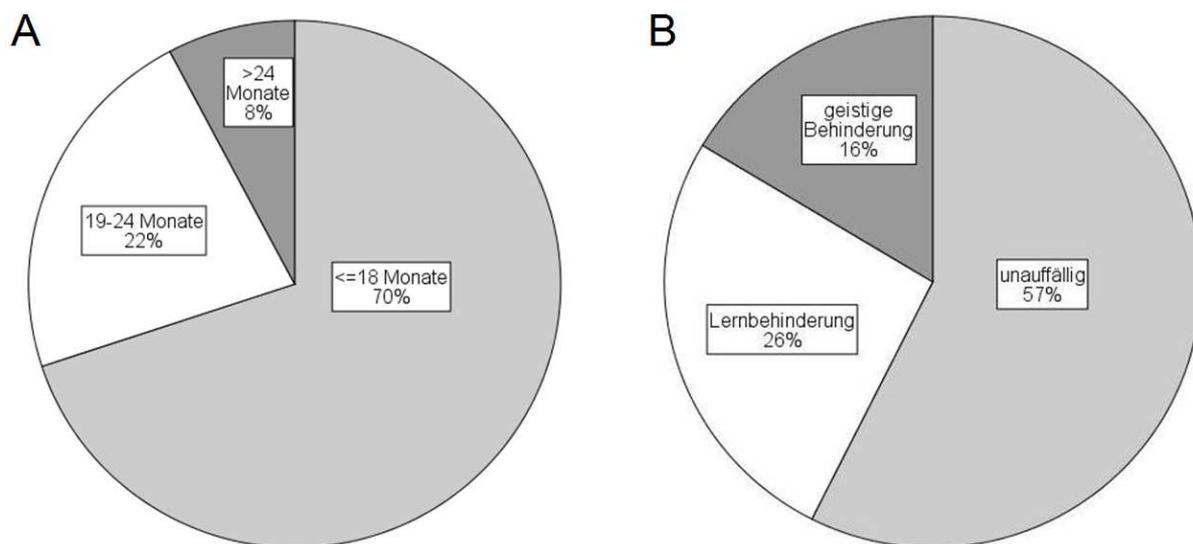


Abbildung 8: Entwicklung der DMD-Patienten (A) Laufalter (N=193) (B) kognitive Entwicklung (N=195)

5.3 Genetik

5.3.1 Häufigkeiten der Mutationstypen

Die im Dystrophin-Gen auftretenden genetischen Defekte sind sehr vielfältig. In der Patientenkohorte lagen bei gut zwei Drittel (68%) große intragenetische Deletionen von einem oder mehreren Exons vor, gefolgt von Punktmutationen in 15%, Duplikationen in 12% und Insertionen, Mikrodeletionen und intronische Punktmutationen in 5% der Fälle (*Abbildung 9, Tabelle 5*).

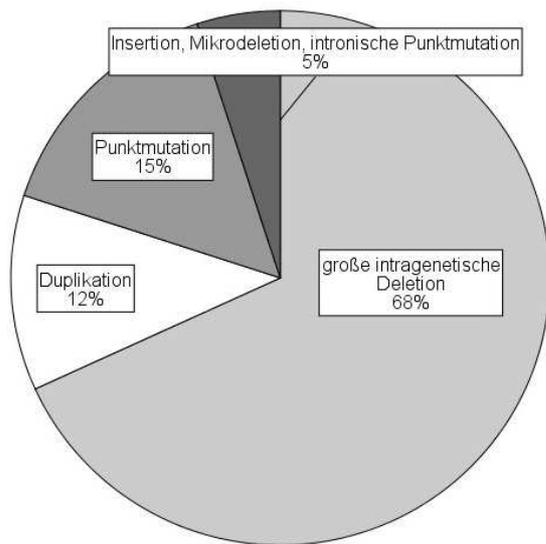


Abbildung 9: Häufigkeiten der Mutationstypen

Tabelle 5: Häufigkeit verschiedener Mutationsarten in der Patientenkohorte

Mutationsarten	Pat.
Deletion	149
Duplikation	26
Punktmutation	33
weitere	11
Gesamt	219

5.3.2 Verteilung der Mutationen im Dystrophin-Gen

Bei der Analyse der Verteilung der Mutationen über die Länge der DNA fällt auf, dass die Verteilung nicht gleichmäßig ist, sondern die Mutationen sich auf bestimmte Regionen konzentrieren. Mehr als die Hälfte aller Mutationen waren im zentralen Teil des Gens lokalisiert (Exon 45-55; *Abbildung 10A*). Bei Mutationen an dieser Stelle des Gens ist die Expression der Isoformen Dp427, Dp260 und Dp140 gestört, während Dp116 und Dp71 korrekt exprimiert werden können. Lediglich 10% der Mutationen lagen im distalen Teil des Gens (Exon 63-79) und verhindern somit die Expression aller Isoformen des Dystrophins.

Um zu überprüfen, ob der Mutationstyp (Deletion, Duplikation, Punktmutation) einen Einfluss auf den Ort der Mutation hat, wurde die Verteilung nach den Mutationstypen aufgeschlüsselt analysiert (*Abbildung 10B, C, D*). Obwohl die Fallzahlen für Duplikation und Punktmutationen recht gering sind, lassen sich dennoch verschiedene Tendenzen erkennen. Es fiel auf, dass sich vor allem die Verteilung der Deletionen und Duplikationen deutlich unterscheidet. Bei Deletionen, die den zahlenmäßig größten Anteil ausmachen (N=149), war in 71% der Fälle der zentrale Teil des Gens betroffen. Bei Duplikationen hingegen war bevorzugt der proximale Genabschnitt betroffen (Exon 1-29; 50% der Fälle, N=26), der zentrale Bereich dagegen mit nur 15% eher selten. Bei Punktmutationen (N=33) ließ sich kein klarer Trend ausmachen. Die proximalen und distalen Abschnitte des Dystrophin-Gens waren mit jeweils 36% gleich häufig betroffen, die mittleren Genabschnitte seltener.

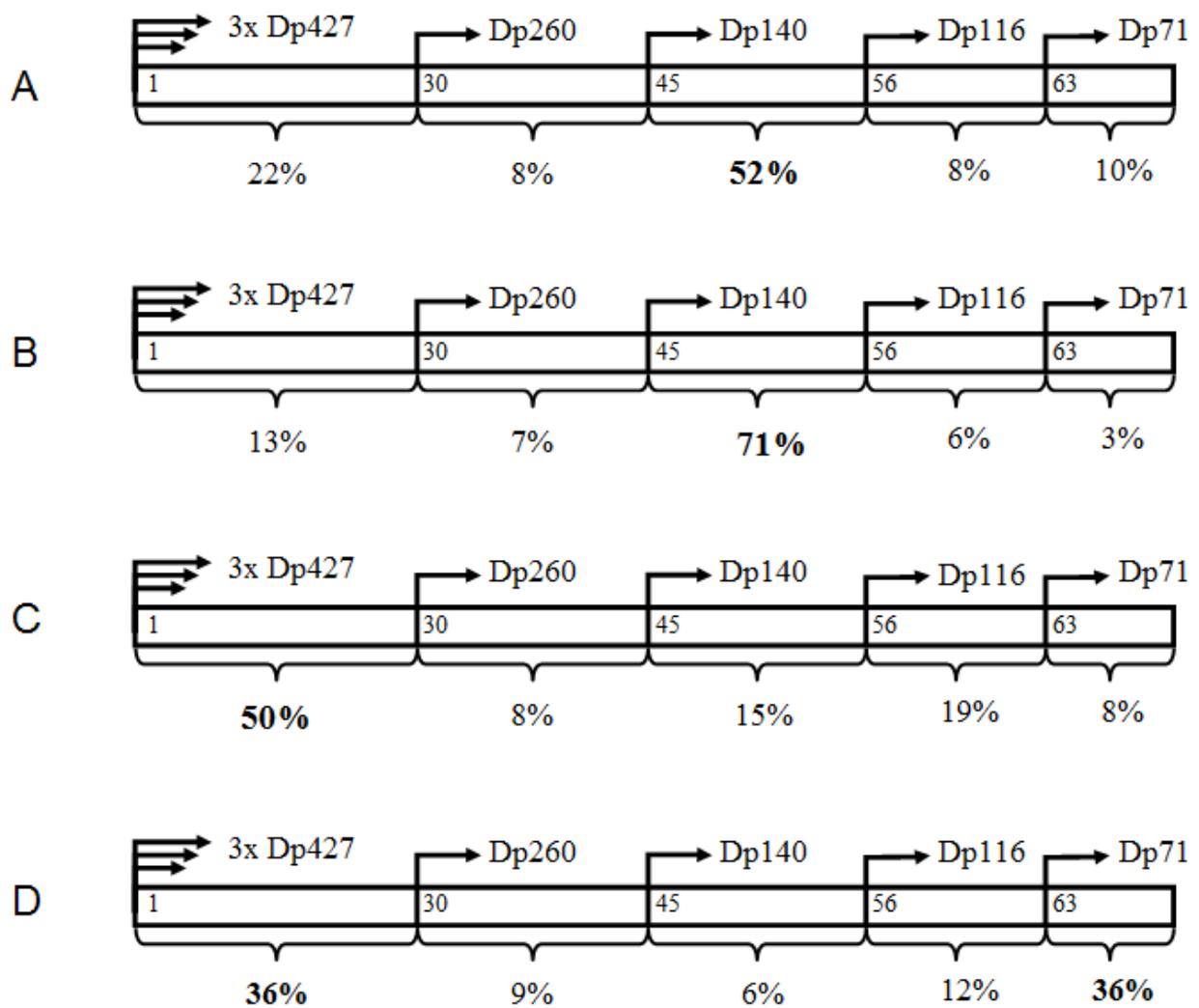


Abbildung 10: Verteilung der Mutationen innerhalb des Dystrophin-Gens; Pfeile zeigen die Lokalisation der Promotoren an, Protein-Isoformen sind bezeichnet als Dp427, Dp260, Dp140, Dp116 und Dp71 (A) Alle Typen von Mutation (B) Alle Deletionen (C) Alle Duplikationen (D) Alle Punktmutationen

5.3.3 Verteilung der Deletions-Hotspots und Deletions-Bruchpunkte

Einen Überblick über das Deletionsprofil in der Patientenkohorte gibt *Abbildung 11A* und *B*. Die Betrachtung der Deletionshäufigkeit einzelner Exone weist auf einen wichtigen Deletions-Hotspot innerhalb der Exons 45-53 im zentralen Teil des Gens hin (*Abbildung 11A*). Der 5' Bruchpunkt (*deletion breakpoint*; Anfang der Deletion) dieser Deletionen lag meist in Intron 44 oder 45, während die 3' Bruchpunkte (Ende der Deletion) innerhalb der Introns 49-50 konzentriert waren (*Abbildung 11B*). Diese Befunde korrelieren gut mit Daten aus der Leiden Database (White and den Dunnen, 2006).

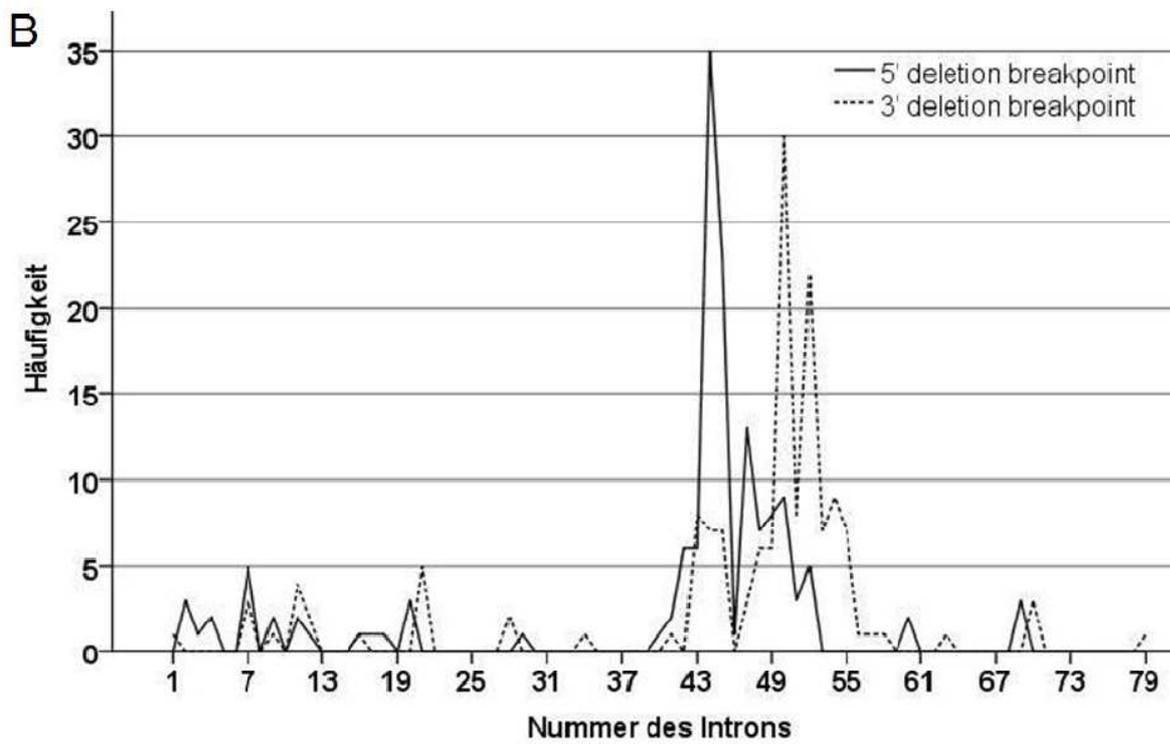
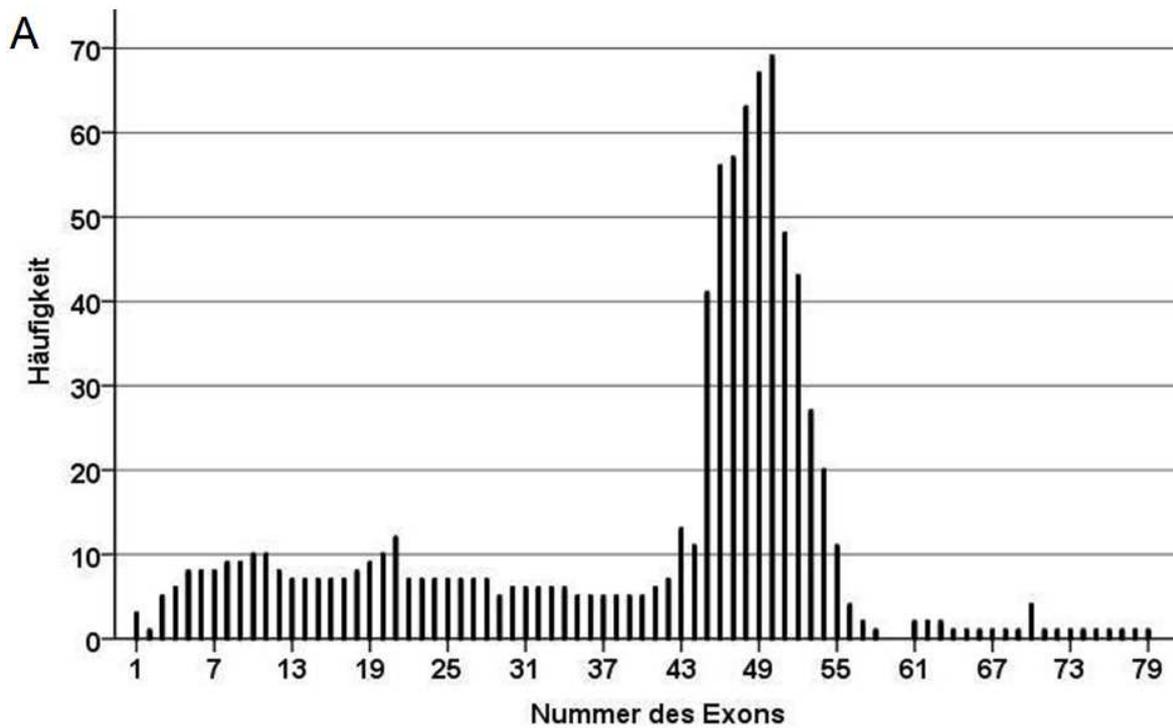


Abbildung 11: Deletionen im Dystrophin-Gen (A) Deletionshäufigkeit einzelner Exone in der Patientenkohorte (B) Position der "deletion breakpoints" (5' und 3' Ende)

5.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

5.4.1 Wachstum nach Genotyp

Aufgrund der großen Vielzahl an verschiedenen Mutationen im Dystrophin-Gen wurden die Patienten anhand ihrer Genotypen in 5 Gruppierungen zusammengefasst, je nachdem welche Isoformen des Dystrophin durch die Mutation in ihrer Expression betroffen sind (vgl. 4.3.2). Alle Parameter wurden dann nach Gruppen aufgeschlüsselt analysiert. Die Patientenzahlen pro Parameter und Gruppe sind in *Tabelle 6* aufgeführt. Bei Betrachtung der anthropometrischen Daten in Relation zu den betroffenen Isoformen des Dystrophinproteins fielen Unterschiede zwischen Patienten mit proximalen und distalen Mutationen auf (*Abbildung 12*). Patienten mit distalen Mutationen, die die Expression aller Proteinisoformen betrifft, waren am häufigsten von Kleinwuchs betroffen. 95% dieser Patienten lagen mit ihrer Körpergröße unterhalb der 50. Perzentile und 57% waren kleinwüchsig (<P3). Diese Anteile waren bei proximalen Mutationen, die nur Dp427 betreffen, deutlich geringer; 77% der Patienten waren <P50 und lediglich 17% <P3. Bei Mutationen im zentralen Genabschnitt (Gruppe 3) waren die Anteile jeweils 81% <P50 und 30% <P3. Es scheint also, dass je distaler die Mutation ist, desto stärker sind die Patienten von der Wachstumsinderung betroffen. Beim Kopfumfang verhielt es sich ähnlich: Patienten mit distalen Mutationen waren ebenfalls stärker in ihrem Wachstum gemindert. Patienten mit Beteiligung aller Isoformen hatten zu 76% einen OFC <P50 und zeigten außerdem eine hohe Rate an Mikrozephalien von 9,5%. Auf den BMI scheint der Genotyp wenig Einfluss zu nehmen, da die Perzentilen bei distalen und proximalen Mutationen in etwa gleich verteilt blieben.

Tabelle 6: Patientenzahl für anthropometrische Daten und psychomotorische Entwicklung für Patientengruppierungen anhand des Genotypen

Parameter	Anzahl Patienten pro Untergruppe (Genotyp)					
	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 5	Gesamt
Größe	49	18	112	18	21	218
BMI	49	18	112	18	21	218
OFC	49	18	113	18	21	219
Motorische Entwicklung	38	14	85	14	17	168
Kognitive Entwicklung	36	14	87	11	18	166

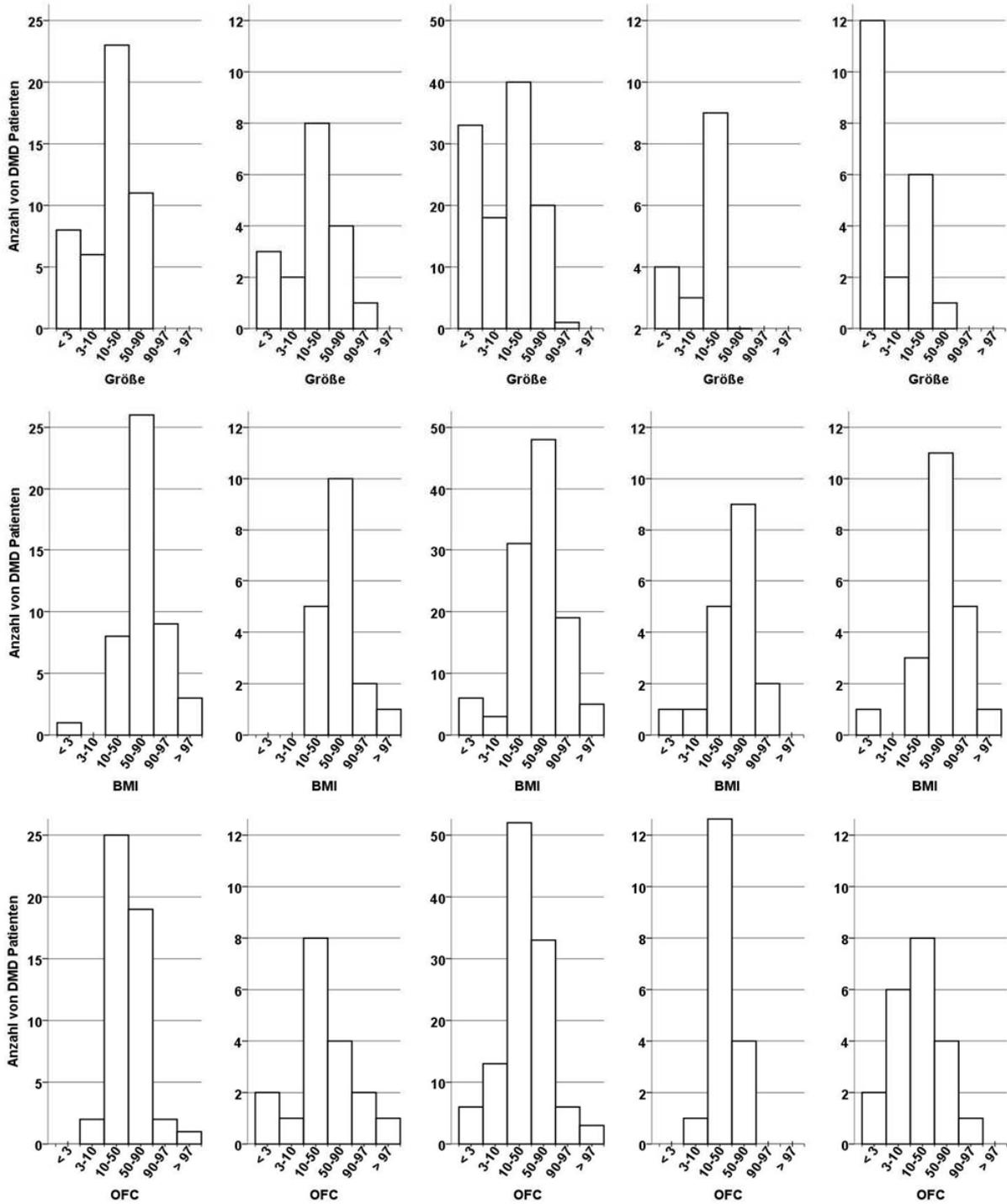
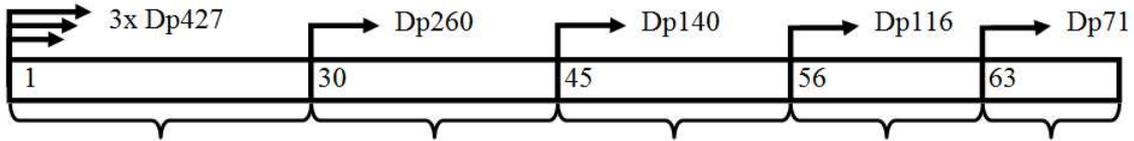


Abbildung 12: Größe, BMI und OFC in Perzentilen aufgeteilt nach Patientengruppierung anhand des Genotyps

5.4.2 Motorische Entwicklung nach Genotyp

Auch hinsichtlich der motorischen Entwicklung konnte eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet werden. Der Anteil der Patienten, die eine motorische Entwicklungsverzögerung zeigen, steigt, je distaler die Mutation gelegen ist (*Abbildung 13A*). Bei Mutationen im proximalen Teil des Gens, die ausschließlich die Isoform Dp427 betreffen, war die motorische Entwicklung bei einem Großteil der Patienten normal. Insgesamt hatten 83% der Patienten mit proximalen Mutationen bis zu einem Alter von 18 Monaten Laufen gelernt. Bei einem Fehlen der Isoform Dp140 sank dieser Anteil auf 75%. Bei distalen Mutationen mit Fehlen aller Isoformen liefen lediglich noch 12% der Kinder mit 18 Monaten. 47% dieser Kinder waren in ihrer motorischen Entwicklung stark verzögert, hatten also mit 24 Monaten noch nicht Laufen gelernt.

5.4.3 Kognitive Entwicklung nach Genotyp

In der kognitiven Entwicklung lässt sich eine ähnliche Beobachtung machen (*Abbildung 13B*). Einen wichtigen Einfluss auf die kognitive Entwicklung scheint die Isoform Dp140 zu haben. Bei Patienten, bei denen die Expression dieser Isoform intakt ist, war eine kognitive Beeinträchtigung selten. Ein Verlust von Dp140 war hingegen in 40% der Patienten mit Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten (Lernbehinderung oder geistige Behinderung) assoziiert. Dieser Anteil lag lediglich bei 17% in Patienten, denen nur Dp427 fehlt und bei 7% in Patienten mit fehlenden Dp427 und Dp260. In der Untergruppe mit Verlust aller Isoformen präsentierte sich die überwiegende Mehrzahl der Patienten mit Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten. 15 von 18 Patienten wiesen eine geistige Behinderung auf, 2 Patienten eine Lernbehinderung und lediglich ein Patient war kognitiv unauffällig entwickelt.

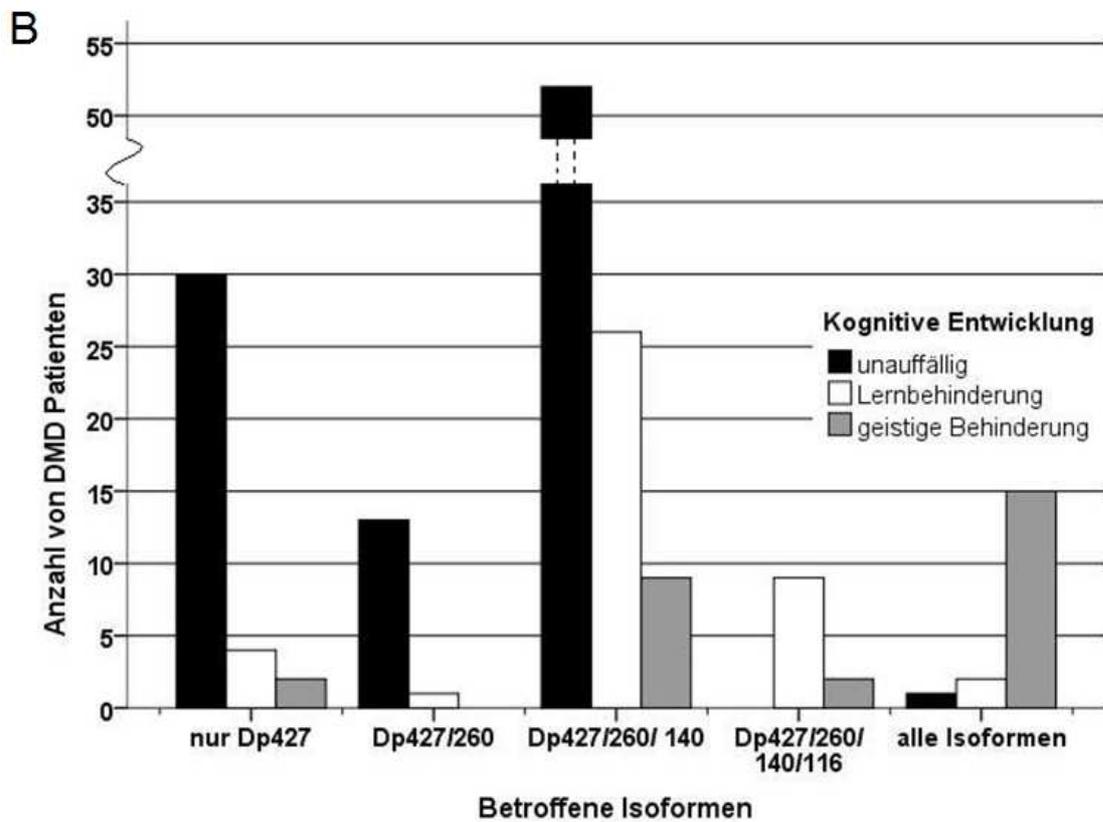
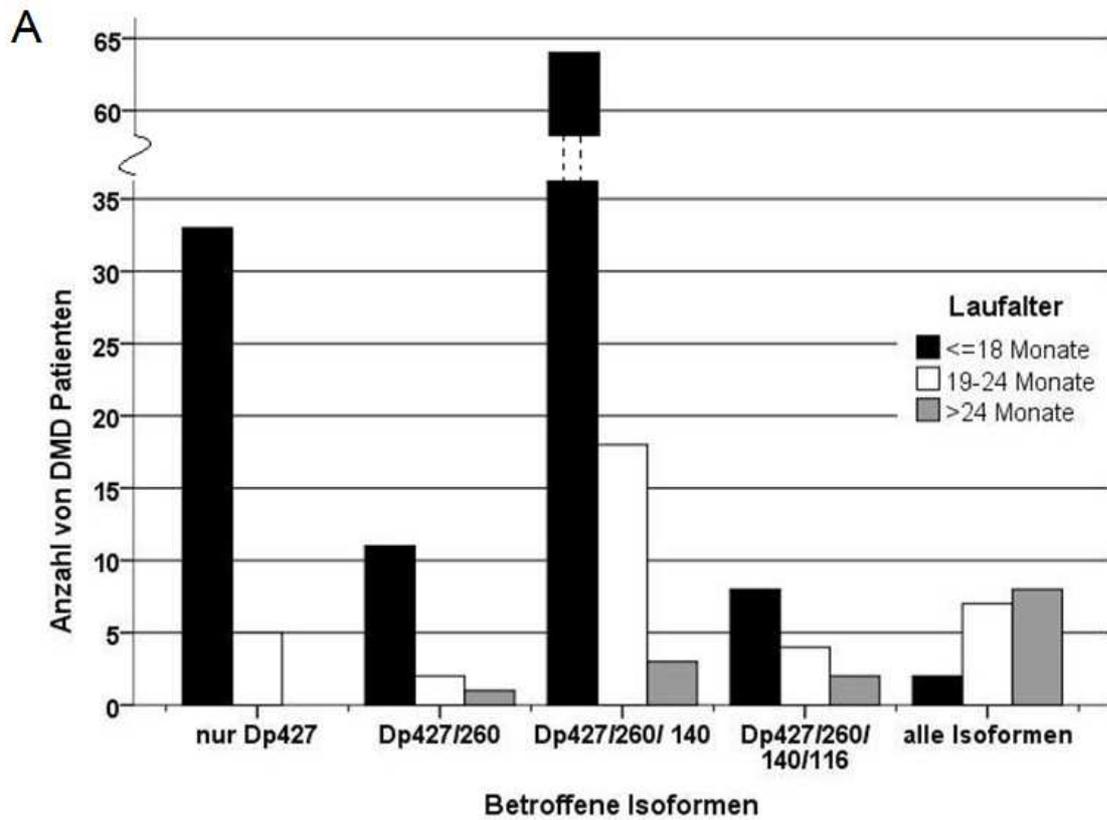


Abbildung 13: Psychomotorische Entwicklung nach Genotyp (A) motorische Entwicklung mit Laufalter in Monaten (B) kognitive Entwicklung

6 Diskussion

6.1 Studiendesign und Limitationen der retrospektiven Vorgehensweise

Die vorliegende Studie nutzt Daten von drei verschiedenen Universitätskliniken mit Spezialsprechstunden für neuromuskuläre Erkrankungen in Deutschland, was eine relativ große und heterogene Patientenkohorte ergibt. Die Daten wurden allerdings retrospektiv aus den Patientenakten entnommen und nicht anhand eines streng standardisierten Versuchsprotokolls gewonnen, was eine Limitation der Studie darstellt. Anthropometrische Daten wurden von unterschiedlichen Personen aufgenommen, die zwar alle zum Kreis des medizinischen Fachpersonals zählen, jedoch in ihrer individuellen Vorgehensweise eventuell leichte Unterschiede aufweisen. Information über Steroidtherapie wurde ebenfalls aus den Akten entnommen; die Vollständigkeit und Richtigkeit dieser Angaben konnten nicht überprüft werden. Gleiches gilt für die Daten zur motorischen und kognitiven Entwicklung.

Die vorliegende Arbeit stellt eine der größten Untersuchungen zu Wachstum und Entwicklung von Patienten mit DMD dar und korreliert die erhobenen Daten mit dem Genotyp. Im Wachstum und in der psychomotorischen Entwicklung konnten deutliche Unterschiede zwischen DMD Patienten und der alters- und geschlechtsangeglichenen Kontrollpopulation festgestellt werden. Innerhalb der Patientenkohorte existiert eine weite Spanne an verschiedenen Phänotypen, die zu einem gewissen Grad durch den Genotyp vorausgesagt werden können. Im Folgenden wird auf wichtige Ergebnisse näher eingegangen.

6.2 Anthropometrische Daten von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne

6.2.1 Kleinwuchs

Eine Mutation im Dystrophin-Gen hat einen Einfluss auf das Wachstum von DMD Patienten. Ein Kleinwuchs von etwa einer SD unter dem Bevölkerungsdurchschnitt, der bereits früh in der Entwicklung einsetzt, ist für DMD Patienten vielfach in der Literatur beschrieben (Eiholzer *et al.*, 1988, McDonald *et al.*, 1995, Nagel *et al.*, 1999, Rapaport *et al.*, 1991, West *et al.*, 2013, Willig *et al.*, 1993). Dieser Kleinwuchs mit oben beschriebenen Charakteristika findet sich auch in der Patientenkohorte der vorliegenden Studie. Während die anthropometrischen Maße bei Geburt noch im Rahmen der Norm waren, wiesen beinahe ein Drittel der Patienten bei Follow-up einen Kleinwuchs auf. Dieser war bereits bei den 2-5-jährigen Kindern in ähnlichem Maße ausgeprägt wie bei den älteren Patienten.

Die Ätiologie des Kleinwuchses bei DMD ist unklar. Unspezifische Mechanismen wie niedriger Knochenumsatz aufgrund der progressiven Muskelschwäche, Wachstumshormonmangel sowie chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen der DMD sind als Gründe in Betracht gezogen worden, wurden aber für unwahrscheinlich befunden (Kissel *et al.* , 1991, Nagel *et al.*, 1999). Auch eine genetische Ursache des Kleinwuchses kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass eine Beteiligung des Homöobox-Gens *SHOX* (*short stature homeobox gene*) auf Chromosom Xp22 beim Menschen mit Minderwuchs assoziiert ist (z.B. im Rahmen einer Monosomie X beim Turner Syndrom) (Rao *et al.* , 1997). Da das *SHOX* dem Dystrophin-Lokus benachbart ist, wurde eine Mitbeteiligung dieses Gens bei molekularen Defekten im Bereich der Xp21-Region im Rahmen der Dystrophie als Grund für den Kleinwuchs postuliert (Nagel *et al.*, 1999). In der Tat gibt es eine Fallstudie über einen kleinwüchsigen BMD-Patienten, bei dem neben einer Deletion im Dystrophin-Gen auch eine Mutation im benachbarten *SHOX*-Gen nachgewiesen werden konnte (Messina *et al.* , 2008). Hierbei handelt es sich jedoch bisher um einen Einzelfall und eine mögliche kausale Beziehung zwischen *SHOX*-Mutationen und Kleinwuchs bei DMD ist noch nicht an einer größeren Patientenkohorte überprüft worden. Es ist allerdings auch möglich, dass ein dystrophin-spezifischer Mechanismus für den Kleinwuchs verantwortlich ist. Zu dieser These passt auch der Befund der vorliegenden Studie, dass es bei distalen Mutationen zu einer Zunahme des Anteils an kleinwüchsigen Patienten kommt (vgl. 6.5.1). Über welche Mechanismen Dystrophin einen Einfluss auf das Wachstum ausübt, ist allerdings nicht geklärt.

6.2.2 Ernährungsstatus

DMD Patienten sind im Verlauf ihrer Erkrankung sowohl durch Über- als auch durch Untergewicht gefährdet, da sich durch den progressiven Muskelschwund und die zunehmende Inaktivität die Körperzusammensetzung und der Energiebedarf der Patienten verändern. Bei jüngeren Patienten wird eher eine Tendenz zum Übergewicht beobachtet, während schweres Untergewicht mit BMI unterhalb der 10. Perzentile besonders bei älteren Patienten ein Problem darstellt (Davidson and Truby, 2009, McDonald *et al.*, 1995, Willig *et al.*, 1993). Dies deckt sich mit den Befunden der vorliegenden Studie, die ebenfalls eine Rechtsverschiebung des BMI vor allem bei jüngeren Patienten, dagegen ein hohe Inzidenz von schwerem Untergewicht bei älteren Patienten zeigten (14% der Patienten BMI <P3). Bei älteren Patienten im Alter von 8-17 Jahren war allerdings auch ein hoher Anteil an schwerem Übergewicht zu verzeichnen (14% der Patienten BMI >P97). Diese Tendenz besonders der älteren DMD-Patienten zu beiden Extremen der Gewichtsverteilung wurde in einer kürzlich publizierten Studie mit großer Fallzahl bestätigt (West *et al.*, 2013).

Da sich die Körperzusammensetzung durch die Erkrankung sehr verändert, stellt sich allerdings die Frage, inwiefern überhaupt die BMI-Referenzwerte der Normalbevölkerung bei Kindern mit DMD aussagekräftig sind.

Der variable zeitliche Verlauf der Erkrankung stellt besondere Anforderungen an die Planung einer ausgewogenen Ernährung. Bei jungen Patienten sollte die Entstehung von schwerem Übergewicht verhindert werden, was die bereits reduzierte Beweglichkeit der Jungen noch weiter einschränken könnte. Auch Untergewicht kann bereits früh in der Entwicklung auftreten (West *et al.*, 2013) und muss rechtzeitig behandelt werden, da es mit vielen Problemen wie Dekubitus und reduzierter Immunfunktion verbunden ist. Ein leichtes Übergewicht in jungen Jahren soll sogar als protektiver Faktor gegen die Entwicklung eines späteren Untergewichts wirken (Martigne *et al.*, 2011). Eventuelle Nahrungsergänzung von Vitaminen und Spurenelementen wie beispielsweise Calcium und Vitamin D zur Osteoporoseprophylaxe ist besonders seit Einführung der Steroidtherapie wichtig geworden (Davidson and Truby, 2009).

6.2.3 Kopfumfang und Hirnfunktion

In der vorliegenden Studie konnten eine Linksverschiebung des OFC sowie ein leicht erhöhter Anteil an mikrozephalen Patienten festgestellt werden (5% statt der zu statistisch zu erwartenden 3%). Die wenigen existierenden Studien zum Kopfumfang bei DMD-Patienten fanden dagegen eher eine Tendenz zur Makrozephalie, ohne hier einen Zusammenhang zwischen Kopfumfang und intellektueller Funktion nachweisen zu können (Appleton *et al.*, 1991, Schmidt *et al.*, 1985). Die Stichprobengröße dieser Studien ist mit 36 bzw. 64 Patienten allerdings eher klein, und in einer Studie waren auch die Kopfumfänge der Patientenväter größer als normal (Schmidt *et al.*, 1985). In der Patientenkohorte der vorliegenden Studie war die Inzidenz von Makrozephalie im Rahmen der Norm.

Bildgebende Daten von makro- oder mikrozephalen DMD Patienten konnten im Rahmen der Studie leider nicht retrospektiv gewonnen werden, sodass über eventuelle Hirnanomalien bei diesen Kindern nichts bekannt ist. Ein Zusammenhang mit intellektueller Funktion konnte ebenfalls aufgrund der geringen Zahl mikrozephaler Kinder nicht untersucht werden. Stärkere strukturelle Hirnanomalien scheinen bei DMD nicht zu bestehen ((Rae *et al.*, 1998), Übersichtsarbeit zur Hirnstruktur bei DMD siehe (Anderson *et al.*, 2002)). Einige CT-Studien beschreiben jedoch eine leichte kortikale Atrophie bei einem Teil der Patienten, besonders bei den älteren Kindern (Septien *et al.*, 1991, Yoshioka *et al.*, 1980). Sensitivere MRI-Untersuchungen konnten eben-

falls eine Verminderung der grauen Substanz im Gehirn nachweisen (Lv *et al.*, 2011). Es scheint aber, dass funktionelle Untersuchungen sensitiver als strukturelle die durch Dystrophinmangel ausgelösten Veränderungen im Gehirn anzeigen können. Verfahren der funktionellen Bildgebung detektierten eine Verminderung der lokalen synchronen Neuronenaktivität (Lv *et al.*, 2011), Veränderungen im Glucosemetabolismus (Lee *et al.*, 2002) sowie Anomalien in der Konzentration anderer Hirnmetabolite (Rae *et al.*, 1998). Studien an Synapsen und Rezeptoren wurden am Mausmodell für DMD (*mdx*-Maus) durchgeführt. Es wurden Alterationen im inhibitorischen GABAergen sowie im exzitatorischen glutamatergen System gefunden (Daoud *et al.*, 2009, Knuesel *et al.*, 1999). Im Hippocampus ist das Zusammenspiel dieser Systeme in Vorgänge der synaptischen Plastizität wie Langzeitpotenzierung und Gedächtnis impliziert, die in der dystrophin-defizienten *mdx*-Maus in der Tat abnorm sind (Perronnet and Vaillend, 2010, Vaillend *et al.*, 2004) und auf eine Beteiligung des DGC an komplexen Hirnfunktionen hindeuten.

In den beobachteten Veränderungen von Aufbau und Funktion des ZNS bei DMD-Patienten liegt wahrscheinlich der Schlüssel zur Erklärung ihrer kognitiven Defizite und Verhaltensauffälligkeiten. Das Verständnis der genauen Rolle des DGC in der synaptischen Organisation und Funktion ist jedoch unvollständig, und ein Zusammenhang zwischen strukturellen und funktionellen Hirnanomalien und intellektueller Funktion muss noch klarer etabliert werden.

6.2.4 Einfluss der Steroide auf das Wachstum

Eine Verstärkung der Tendenz zum Übergewicht und zum Kleinwuchs durch eine Steroidtherapie ist bekannt (Moxley *et al.*, 2010) und konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Kinder mit Steroidtherapie zeigten, verglichen mit älteren steroidfreien Patienten, einen höheren Anteil an Kleinwuchs (45% im Vergleich zu 24%). Der Anteil an Übergewicht war in beiden Gruppen ähnlich hoch; schweres Untergewicht trat dagegen bei Steroidpatienten deutlich seltener auf. Da zum Zeitpunkt des Follow-up nur 29 von 263 Patienten eine Steroidtherapie erhielten, ist die Aussagekraft der Ergebnisse aber als eingeschränkt zu werten. Die geringe Zahl an Patienten unter Steroidtherapie ist zum einen der retrospektiven Natur der Studie zuzuschreiben, in der Patientendaten für den Zeitraum 1975 bis 2011 erhoben wurden. Auch wenn erste Studien über eine positive Wirkung der Steroidtherapie auf den Krankheitsverlauf der DMD bereits in den siebziger Jahren erschienen (Drachman *et al.*, 1974), wurden erst Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre die Effizienz dieser Therapie zur symptomatischen Behandlung der DMD in systematischen großen Studien bewiesen (unter anderem (Fenichel *et al.*, 1991,

Mendell *et al.* , 1989); für systematische Übersicht über diese und andere Studien siehe (Manzur *et al.*, 2008)). Heutzutage gehört eine Steroidtherapie auch an den drei an dieser Studie teilnehmenden Universitätskinderkliniken Berlin, Dresden und Essen zur Standardbehandlung von ambulatorischen DMD-Patienten. Zum anderen hat sicherlich die Altersstruktur des Patientenkollektivs mit einem eher niedrigen Altersdurchschnitt von 7 Jahren und 1,5 Monaten und immerhin 104 von 263 Patienten, die jünger als 6 Jahren waren, dazu beigetragen, dass ein vergleichsweise geringer Anteil an Patienten Steroidtherapie erhielt.

6.3 Psychomotorische Entwicklung von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne

6.3.1 Motorische Entwicklung

In der vorliegenden Studie wurde die grobmotorische Entwicklung der Patienten anhand eines wichtigen Meilensteins, den ersten freien Schritten, untersucht. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation* WHO) ermittelte in einer gesunden repräsentativen Population ein mittleres Laufalter von 12,0 Monaten (2006). Das mittlere Laufalter in der Patientenkohorte liegt bei 18,3 Monaten und ist damit deutlich verzögert (99. Perzentile in der WHO-Studie bei 17,6 Monaten). Dieser Befund steht in Einklang mit Untersuchungsergebnissen anderer Studien, die eine Verzögerung der grobmotorischen Fähigkeiten bei DMD in ähnlichem Maßstab zeigen (Bushby *et al.* , 1999, Parsons *et al.*, 2004). Teilweise wurden Meilensteine der grobmotorischen Entwicklung, wie zum Beispiel schnelles Rennen oder vom Boden Aufstehen, überhaupt nicht erreicht (Pane *et al.*, 2013b). Feinmotorische Meilensteine wurden im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht, sollen aber insgesamt weniger stark beeinträchtigt sein als die grobmotorische Fähigkeiten (Connolly *et al.*, 2013). Die lokomotorische Entwicklung zeigt eine Verschlechterung der Leistung mit zunehmendem Alter (Pane *et al.*, 2013b, Parsons *et al.*, 2004). Dies ist aber angesichts der muskulären Symptomatik der Erkrankung wenig überraschend. Die Abnahme der motorischen Fähigkeiten mit zunehmendem Alter betrifft die Grobmotorik in stärkerem Maße als die Feinmotorik, was allerdings auch mit der unterschiedlichen Sensitivität der verwendeten Tests bei verschiedenen Altersgruppen zusammenhängen könnte (Connolly *et al.*, 2013).

6.3.2 Kognitive Entwicklung

Eine Verzögerung der frühkindlichen Entwicklung im Rahmen der DMD, die bei betroffenen Kindern oftmals noch vor der muskulären Symptomatik auffällt, ist vielfach in der Literatur beschrieben (Essex and Roper, 2001, Smith *et al.*, 1989). Systematische Untersuchungen mit großen Fallzahlen der frühen Entwicklungsphasen bei DMD-Patienten sind allerdings selten, weil sie mit erhöhten methodischen Schwierigkeiten verbunden sind und außerdem eine frühe Diagnose der Erkrankung voraussetzen (Connolly *et al.*, 2013, Pane *et al.*, 2013b). Die *Griffiths Scale of Mental Development* und der *Bayley III Scales of Infant Development* haben sich als Testverfahren speziell für jüngere Kinder zur Untersuchung der frühen Entwicklungsphasen etabliert. Mittels dieser Verfahren wurde ein Entwicklungsquotient für DMD Patienten ermittelt, der im Durchschnitt etwa eine Standardabweichung unter dem von gesunden Vergleichspopulationen liegt (Connolly *et al.*, 2013, Pane *et al.*, 2013b, Parsons *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 1989). Dies steht im Einklang mit den Daten für ältere Kinder, bei denen ebenfalls eine Abweichung des durchschnittlichen IQ um eine Standardabweichung nach unten festgestellt wurde und etwa ein Drittel der Patienten eine mentale Retardierung aufweist (Cotton *et al.*, 2001, Hinton *et al.*, 2000). Die kognitive Funktion zeigt keine Korrelation mit dem Alter, ist also in ihrem Verlauf nicht progredient (Connolly *et al.*, 2013, Pane *et al.*, 2013b). Auch in den Unterkategorien der oben genannten Tests, die soziale Fähigkeiten evaluieren, wurden Defizite der DMD-Patienten gegenüber gesunden Altersgenossen deutlich (Connolly *et al.*, 2013, Pane *et al.*, 2013b). Diese Ergebnisse wurden insgesamt in der vorliegenden Studie bestätigt, bei der über ein Drittel der Patienten eine Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten aufwies (26% Lernbehinderung, 16% geistige Behinderung). In der Studie wurden allerdings nicht die oben genannten Testverfahren benutzt, sondern *Kaufman Assessment Battery for Children* und *Wechsler Intelligence Scale for Children*. Eine getrennte Betrachtung der Unterkategorien wurde nicht vorgenommen, sondern lediglich das Gesamtergebnis beurteilt.

Einschränkungen der kognitiven und sozialen Fähigkeiten treten früh in der Entwicklung der Patienten auf und sind mithilfe spezieller Testverfahren bereits bei sehr jungen Patienten messbar. Eine rechtzeitige Diagnose eventueller Defizite ist wichtig, da dies therapeutische Implikationen hat und betroffene Patienten in ihrer weiteren Entwicklung von einer frühen Intervention profitieren könnten. Individuell bestehen allerdings große Unterschiede in der kognitiven Entwicklung, und es existiert ein weites phänotypisches Spektrum.

6.3.3 Spezifisches kognitives Profil

Mitbeteiligung kognitiver Fähigkeiten ist ein Merkmal vieler neuromuskulärer Erkrankungen (Übersichtsarbeit zur kognitiven Funktion bei neuromuskulären Erkrankungen siehe (D'Angelo and Bresolin, 2006)). Die nicht progressive mentale Retardierung, die etwa ein Drittel der Patientenkohorte der vorliegenden Studie zeigt, ist vielfach in der Literatur beschrieben (unter anderem (Cotton *et al.*, 2001)). Ein Zusammenhang zwischen dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung und der Schwere der muskulären Symptomatik besteht nicht (Hinton *et al.*, 2000). In Intelligenztests zeigen alle DMD Patienten ein spezifisches kognitives Profil, was unabhängig von ihrer Gesamtintelligenz erkennbar ist. Defizite bestehen vor allem in den Bereichen des verbalen Arbeitsgedächtnisses und des Hörverständnis, während die Handlungsintelligenz weniger betroffen ist (Cotton *et al.*, 2001, Hinton *et al.*, 2000). Dieses kognitive Profil kann bei anderen neuromuskulären Erkrankungen wie beispielsweise der spinalen Muskelatrophie nicht nachgewiesen werden und scheint somit spezifisch für einen Verlust des Dystrophins zu sein (Billard *et al.*, 1992). Da im Rahmen dieser retrospektiven Untersuchung keine Daten aus den Unterkategorien der standardisierten Intelligenztestungen für eine größere Zahl von Patienten erhoben wurde, kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage zum kognitiven Profil der Patientenkohorte gemacht werden.

Die von DMD-Patienten gezeigten kognitiven Schwächen sind von einigen Autoren (Hinton *et al.*, 2001) Defiziten im phonologischen Prozessieren von Informationen (*phonological loop*) zugeordnet worden, was nach einem Modell von Baddeley und Hitch (Baddeley and Hitch, 1974) wichtig für das verbale Arbeitsgedächtnis und den Spracherwerb ist (Übersichtsarbeit zu Arbeitsgedächtnis siehe (Repovs and Baddeley, 2006)). Die Sprachentwicklung verläuft bei DMD-Patienten in der Tat verzögert (Cyrulnik *et al.*, 2007). Generell weist die regional unterschiedliche Verteilung der Dystrophin-Isoformen im Gehirn (Lidov *et al.*, 1993, Lidov *et al.*, 1990) auf eine Beteiligung des Dystrophins an spezifischen zerebralen Funktionen hin. Bei Abwesenheit des Dystrophin können somit auch spezifische Defizite entstehen, die unabhängig sind vom IQ der Patienten und das charakteristische kognitive Profil aller DMD-Patienten bedingen.

6.3.4 Neuropsychiatrische Komorbiditäten

Eine Häufung neuropsychiatrischer Komorbiditäten bei Patienten mit DMD wie ADHS (Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom), Krankheiten des autistischen Spektrums sowie Zwangsstörungen ist beschrieben (Hendriksen and Vles, 2008), konnte in der vorliegenden Studie aber leider nicht

retrospektiv untersucht werden. Bei Kindern mit chronischen Erkrankungen, besonders neurologischen und motorischen Erkrankungen, ist eine erhöhte Inzidenz von Verhaltensauffälligkeiten bekannt (Hysing *et al.*, 2009, Lavigne and Faier-Routman, 1992). DMD-Patienten zeigen vermehrt Probleme des Sozialverhaltens (Hinton *et al.*, 2006). Defizite der DMD-Patienten im Bereich der sozialen Fähigkeiten sind bereits bei Testungen der frühkindlichen Entwicklung auffällig (Connolly *et al.*, 2013, Pane *et al.*, 2013b). Da bei Kindern mit DMD spezifische Verhaltensauffälligkeiten vorliegen, wird vermutet, dass zumindest ein Teil der mit DMD assoziierten psychiatrischen Probleme klinische Zeichen der ZNS-Beteiligung sind und nicht nur als reaktives Verhalten bei chronischer Erkrankung gesehen werden können (Hinton *et al.*, 2006). Dies muss besonders bei der Planung von Interventionen berücksichtigt werden.

6.3.5 Verzögerungen in der Diagnostik und klinische Frühzeichen

Die Möglichkeiten der Diagnostik der DMD haben sich in den letzten Jahrzehnten enorm verbessert. Eine möglichst frühe Diagnose der Erkrankung ist wichtig, um rechtzeitige adäquate Therapie und Förderung der Kinder einzuleiten sowie bei den Eltern eine genetische Beratung hinsichtlich der weiteren Familienplanung durchzuführen (O'Brien *et al.*, 1983). Trotz der verbesserten diagnostischen Möglichkeiten hat sich aber der Zeitpunkt der Diagnose in den letzten Jahrzehnten kaum verändert und liegt weiterhin zwischen 4 und 5 Jahren (Bushby *et al.*, 1999, Ciafaloni *et al.*, 2009, Crisp *et al.*, 1982, Mohamed *et al.*, 2000). Durchschnittlich vergehen 2,5 Jahre zwischen dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome und der definitiven Diagnose der Erkrankung (Ciafaloni *et al.*, 2009). Die Verdachtsdiagnose DMD wird vor allem bei den charakteristischen muskulären Symptomen in Erwägung gezogen. Globale Entwicklungsverzögerung als weiteres häufig auftretendes Frühsymptom wird auch von medizinisch geschultem Fachpersonal häufig nicht mit DMD in Verbindung gebracht. Die muskulären Symptome können zudem dadurch maskiert werden und so die Diagnose noch erschwert sein (Mohamed *et al.*, 2000). Es wird daher schon lange überlegt, Kinder mit Entwicklungsverzögerung mit einem einfachen CK-Test deutschlandweit flächendeckend im Rahmen eines Screenings auf DMD zu untersuchen (Crisp *et al.*, 1982). Mithilfe der Prävalenzen in der Bevölkerung wurde errechnet, dass bei motorischer Entwicklungsverzögerung etwa 300 Kinder für ein positives Ergebnis untersucht werden müssten (Lundy *et al.*, 2007), bei Sprachverzögerung 228 Kinder (Dorling and Salt, 2001). Zur besseren Identifizierung der zu untersuchenden Kinder wurde ein klinischer Kriterienkatalog für Kinder im Alter von 18 Monaten bis 4 Jahren erarbeitet, der unter anderem das Laufalter und die Entwicklung (auch Sprachentwicklung) einbezieht (Mohamed *et al.*, 2000).

Wendet man diesen Kriterienkatalog auf die Patientenkohorte der vorliegenden Studie an, werden allerdings einige Schwächen offenbar. 70% der Patienten dieser Studie laufen mit 18 Monaten, wären also durch dieses Kriterium nicht auffällig geworden. 57% der Patienten zeigen eine normale kognitive Funktion, und 45% sind sowohl in der motorischen als auch in der kognitiven Entwicklung unauffällig. Weitere Kriterien des klinischen Katalogs wie auffälliges Gangbild, Bein- und Hüftschmerzen oder Unfähigkeit zu Rennen und Springen sind unspezifisch und teilweise keine Frühsymptome der DMD. Ein substantieller Teil der Patientenkohorte wäre also durch die vorgeschlagenen klinischen Kriterien nicht auffällig geworden und damit nicht früh diagnostiziert worden. Aufgrund des Fehlens von charakteristischen gut zu erfassenden Frühsymptomen bei DMD ist die Detektionsrate rein nach klinischen Kriterien bei jungen Kindern zwangsweise niedrig. Die Einführung eines allgemeinen Neugeborenen-Screenings wird daher teilweise als der einzige Weg zur frühen Diagnose angesehen (Parsons *et al.*, 2004); hier fehlt allerdings noch ein therapeutischer Ansatz.

6.4 Genetik

6.4.1 Verteilung der Mutationstypen

Es ist eine Vielzahl an Mutationen im Dystrophin-Gen bekannt, die in die drei großen Kategorien Deletion, Duplikation und Punktmutation fallen. In der Patientenkohorte der vorliegenden Studie weisen 68% der Patienten große intragenetische Deletionen auf, gefolgt von Punktmutationen in 15% der Fälle und Duplikationen in 12% der Fälle. Die restlichen 5% machen Insertionen, Mikrodeletionen und intronische Punktmutationen aus. Diese Verteilung stimmt relativ gut mit den Daten aus der größten Datenbank über Mutationen im Dystrophin-Gen, der *Leiden Duchenne Muscular Dystrophy Database*, überein. Hier entfällt mit 72% der größte Anteil ebenfalls auf intragenetische Deletionen. Punktmutationen und kleine Insertionen oder Deletionen machen zusammen 20% und Duplikationen 7% der Mutationen im Dystrophin-Gen aus (Aartsma-Rus *et al.*, 2006).

Mithilfe moderner Methoden der molekularen Diagnostik wie Gensequenzierung lässt sich heute bei fast allen DMD Patienten die zugrundeliegende Genmutation finden. Früher waren diese Methoden teuer und schlecht verfügbar, sodass mit einfachen Multiplex-PCR Nachweiskits vor allem große intragenetische Deletionen innerhalb der Hotspots erkannt wurden und andere Mutationsarten wie Punktmutationen und Duplikationen oft unentdeckt blieben (vgl. 2.5.1). Da die vorliegende Studie Daten aus den Jahren 1975 bis 2011 einschließt, kann es sein, dass leicht zu de-

tektierende Mutationen etwas überrepräsentiert sind und der Anteil an Deletionen falsch hoch liegt. Mit besserer Verfügbarkeit der molekularen Diagnostik wird dieser Bias jedoch kleiner und es wird eine akkurate Abbildung der Mutationsvariabilität im Dystrophin-Gen möglich.

6.4.2 Lokalisation der Mutationen auf dem Dystrophin-Gen

Trotz der oben beschriebenen Heterogenität bezüglich Größe und Lokalisation der Mutationen im Dystrophin-Gen zeigt sich, dass die Verteilung der Mutationen über das Gen nicht zufällig ist. Die Mehrzahl der Mutationen in der Patientenkohorte (52%) ist im zentralen Genabschnitt lokalisiert. Dies betrifft besonders die Deletionen, die zu 71% im zentralen Genabschnitt liegen. Die selteneren Duplikationen liegen hingegen eher in den proximalen Genabschnitten (50% der Fälle). Punktmutationen scheinen relativ gleichmäßig verteilt zu sein. Die Fallzahlen der vorliegenden Studie für Duplikationen und Punktmutationen sind gering, was die Aussagekraft dieser Ergebnisse limitiert. Die Tendenz, dass Deletionen zentral, Duplikationen proximal und Punktmutationen gleichmäßig verteilt sind, findet sich allerdings auch in Studien mit größeren Fallzahlen wieder (Aartsma-Rus *et al.*, 2006).

Um dem möglichen Vorliegen von Mutations-Hotspots im Dystrophin-Gen nachzugehen, wurde eine Analyse der Deletionshäufigkeit einzelner Exons durchgeführt. Dabei fiel auf, dass der Bereich von Exon 45-53 im zentralen Teil des Gens besonders häufig von Deletionen betroffen ist. Dieser Bereich ist in der Literatur auch als *major hotspot* bezeichnet und einer von zwei bekannten Mutations-Hotspots im Dystrophin-Gen. Der zweite sogenannte *minor hotspot* umfasst die Exons 2-20 und ist deutlich weniger häufig von Mutationen betroffen als die Region des *major hotspot* (Den Dunnen *et al.*, 1989b, Koenig *et al.*, 1987). Die bevorzugt zentral auftretenden Deletionen lassen sich also eher dem *major hotspot*, die proximal auftretenden Duplikationen dem *minor hotspot* zuordnen. In der vorliegenden Studie konnte nur der *major hotspot* durch Analyse der Deletionshäufigkeit der Exons klar nachgewiesen werden. Um die Duplikationshäufigkeit der Exons zu untersuchen und damit höchstwahrscheinlich auch den *minor hotspot* sicher nachweisen zu können, war in der vorliegenden Studie leider die Fallzahl an Duplikationen zu gering.

6.4.3 Deletionsbruchpunkte im Dystrophin-Gen

Analysen der Deletionsbruchpunkte (*deletion breakpoints*) der Patientenkohorte zeigen einen gerichteten Effekt bei der Verteilung der Bruchpunkte: die meisten Deletionen haben ihren 5' Bruchpunkt (Anfang der Deletion) in Intron 44 und ihren 3' Bruchpunkt (Ende der Deletion) in

den Introns 49-52. Dieser Befund stimmt mit Daten aus der Literatur überein (White and den Dunnen, 2006). Der Grund dafür, dass gerade diese Regionen für Deletionen prädisponiert sind, ist noch unklar. Die Deletionsbruchpunkte der riesigen Introns 44 und 7, dem wichtigsten Bruchpunkt des *minor hotspots*, sind relativ gleichmäßig verteilt, was zunächst gegen eine dominante Rolle einzelner Sequenzelemente in der DNA bei der Entstehung der Bruchpunkte spricht (Blonden *et al.* , 1991, McNaughton *et al.* , 1998). Intron 7 und Intron 44 repräsentieren zwei Hauptorte meiotischer Rekombination im Dystrophin-Gen (Oudet *et al.* , 1992). Daher haben einige Autoren in der Annahme eines gemeinsamen zugrundeliegenden Mechanismus von Rekombinationsereignissen und Genmutationen einen Zusammenhang zwischen für die Vorgänge der DNA-Rekombination wichtigen Strukturelementen und Deletionsbruchpunkten vorgeschlagen (McNaughton *et al.*, 1998, Nobile *et al.* , 2002). Bei der Sequenzierung und anschließenden Stabilitätsanalyse von einer Vielzahl an *deletion breakpoints* des *major hotspots* konnte jedoch keine direkte Assoziation der Bruchpunkte mit bei der Rekombination beteiligten Sequenz- und Strukturelementen der DNA gefunden werden (Sironi *et al.* , 2003). In derselben Studie wurde allerdings ein Clustering von Deletionsbruchpunkten in Introns 47 und 48 beobachtet, was weitere Studien bestätigen (Sironi *et al.* , 2006, Toffolatti *et al.* , 2002). Dies wurde von den Autoren auf in diesen Regionen bevorzugt entstehende DANN-Doppelstrangbrüche und nachfolgende nicht-homologe Rekombination der Bruchstellen zurückgeführt, ein wichtiger Mechanismus bei der Rekombination von DNA und damit verbunden der Entstehung von Deletionen, Duplikationen und Insertionen (Übersichtsarbeit zur nicht-homologen Rekombination als Mechanismus bei der Entstehung von Genmutationen siehe (Lieber *et al.* , 2003)). Insgesamt scheinen in verschiedenen Introns des Dystrophin-Gens unterschiedliche Mechanismen zur Entstehung der Genmutationen beizutragen. Wahrscheinlich wird sich letztlich die Ursache der Mutationshotspots nur durch eine genomweite Betrachtungsweise klären lassen, die den höheren strukturellen Aufbau des Dystrophin-Gens mit einbezieht (Sironi *et al.*, 2003).

6.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

6.5.1 Anthropometrische Daten

Bei der Analyse des Wachstums von DMD Patienten in Relation zu ihrem Genotyp zeigt sich in der vorliegenden Studie bei zentralen und distalen Mutationen für Größe und Kopfumfang eine verstärkte Tendenz zum Kleinwuchs bzw. zu vermindertem Kopfumfang. Besonders der Verlust der Isoform Dp71 ist im Patientenkollektiv mit Kleinwuchs und Mikrozephalie assoziiert. Für den BMI konnte keine Korrelation zum Genotyp nachgewiesen werden. Es finden sich in der

Literatur bislang keine Untersuchungen, die das Wachstum bei verschiedenen Genotypen charakterisieren. Kleinwuchs als klinisches Merkmal von DMD ist vielfach beschrieben (Eiholzer *et al.*, 1988, McDonald *et al.*, 1995, Nagel *et al.*, 1999, Rapaport *et al.*, 1991, West *et al.*, 2013, Willig *et al.*, 1993). Keine der oben genannten Studien zieht jedoch den Genotypen in Betracht.

Die Ätiologie des Kleinwuchses bei DMD konnte bislang nicht geklärt werden; es existieren verschiedene Hypothesen zu seiner Entstehung (vgl. 6.2.1). Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass eine Korrelation zum Genotyp besteht, deutet auf einen dystrophin-spezifischen Mechanismus als Ursache des verminderten Wachstums hin. Da der Anteil an kleinwüchsigen Patienten steigt, je distaler die Mutation lokalisiert ist, scheint nicht der Verlust einer spezifischen Isoform den Kleinwuchs auszulösen. Vielmehr wird die Tendenz zum Kleinwuchs durch den kumulativen Verlust von Isoformen verstärkt. Da distale, vorwiegend im Gehirn exprimierte Isoformen einen großen Einfluss ausüben, könnte unter anderem ein zentraler Mechanismus eine Rolle spielen. Insgesamt ist allerdings noch unklar, wie die Isoformen des Dystrophin das Wachstum beeinflussen.

6.5.2 Psychomotorische Entwicklung

Für die frühe psychomotorische Entwicklung im Kleinkindalter existieren vor allem aufgrund von methodischen Schwierigkeiten nur sehr wenige Daten (vgl. 6.3.2). In einer Studie mit Kindern unter 4 Jahren konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen genetischem Befund und der lokomotorischen und kognitiven Entwicklung bereits in diesem Alter nachgewiesen werden kann (Pane *et al.*, 2013b). Kinder mit Mutationen *upstream* von Exon 44, welche die Expression der Isoformen Dp140 und Dp71 intakt lassen, hatten in der erwähnten Studie den höchsten mittleren Entwicklungsquotienten und schnitten auch in den vier der fünf Untergruppen des Tests (Persönlich-Sozial, Hören und Sprechen, Auge und Hand sowie Leistungen) jeweils am besten ab. Davon ausgenommen war die Untergruppe der motorischen Fähigkeiten, bei der kein signifikanter Unterschied gesehen wurde. Die niedrigsten Testergebnisse hatten Kinder mit Mutationen *downstream* von Exon 63, bei denen alle Isoformen in ihrer Expression gestört sind (Gruppe 5 unseres Patientenkollektivs). Eine weitere Studie der frühkindlichen Entwicklung konnte ein Fehlen von Dp140 mit niedrigeren kognitiven und sprachlichen Testergebnissen korrelieren, sahen aber ebenfalls keinen Einfluss auf die motorische Entwicklung (Connolly *et al.*, 2013).

Diese Befunde stehen im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung, bei der auch in der motorischen Entwicklung der Anteil an entwicklungsverzögerten Patienten stieg, je distaler die Mutation gelegen war. Bei proximalen Mutationen sind 83% der Kinder normal entwickelt, das heißt sie haben bis zum Alter von 18 Monaten laufen gelernt. Ist Dp140 mitbetroffen, so sinkt dieser Anteil auf 75%, und bei Fehlen aller Isoformen sind lediglich noch 12% der Kinder motorisch normal entwickelt. Aus dieser Untergruppe können 47% sogar mit 24 Monaten noch nicht laufen. Wodurch diese deutliche Diskrepanz zu den Ergebnissen vorheriger Studien zustande kommt, ist nicht klar. In der vorliegenden Studie wurde nur ein Meilenstein der grobmotorischen Entwicklung untersucht, was lediglich eine eingeschränkte Beurteilung der Entwicklung erlaubt und so eventuell zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hat. In den oben genannten Studien wurden auch feinmotorische Untersuchungen in den lokomotorischen DQ einbezogen. Die Feinmotorik soll insgesamt geringer betroffen sein als die Grobmotorik (Connolly *et al.*, 2013). Es könnte daher sein, dass lediglich für grobmotorische Fähigkeiten eine Korrelation besteht, sodass bei Berücksichtigung der grob- und feinmotorischen Fähigkeiten Unterschiede der Genotyp-Gruppen keine Signifikanz mehr erreichen. In der Tat schnitten in beiden Studien Patienten mit Dp140-Beteiligung im Bereich der Lokomotorik etwas schlechter ab als Patienten mit proximalen Mutationen, ohne dass dieser Unterschied statistische Signifikanz erreichte. Patienten mit Beteiligung aller Isoformen wurden lediglich in einer der Studien untersucht (Pane *et al.*, 2013b); hier wurde ebenfalls ein deutlich schlechteres Testergebnis für diese Untergruppe beschrieben (DQ von 71 gegenüber 81 bei proximalen Mutation in der Untergruppe der lokomotorischen Fähigkeiten). Zur Klärung dieses Zusammenhangs wäre es hilfreich, Grob- und Feinmotorik getrennt auf Korrelation mit dem Genotyp zu untersuchen.

6.5.3 Kognitiver Phänotyp

Während der muskuläre Phänotyp und Verlauf der Erkrankung nicht vom Genotyp abhängt, (Desguerre *et al.*, 2009), wurde eine Einschränkung der intellektuellen Funktion bei DMD Patienten mit dem Verlust der Isoformen Dp140 und besonders Dp71 in Verbindung gebracht (Felisari *et al.*, 2000, Moizard *et al.*, 1998, Moizard *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie wurde dieser Zusammenhang zwischen distalen Mutationen und psychomotorischer Entwicklungsverzögerung bestätigt. Ein Verlust von Dp140 geht in 40% der Patienten mit Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten einher. Bei Patienten mit proximalen Mutationen, bei denen die Expression von Dp140 erhalten bleibt, ist der Anteil weniger als halb so groß (17% bzw. 7% der Patienten kognitiv eingeschränkt). Zusätzlicher Verlust von Dp71 bedingt fast immer kogni-

tive Einschränkungen; nur ein Patient von 18 mit Verlust aller Isoformen ist kognitiv unauffällig entwickelt.

Mentale Retardierung kommt, wie auch an der Patientenkohorte dieser Studie gezeigt wird, auch bei Patienten mit proximalen Mutationen vor. Einen stärkeren Einfluss auf den IQ scheinen aber die Isoformen Dp140 und Dp71 auszuüben. Daher ist die Expression und Funktion dieser Isoformen Gegenstand intensiver Forschung. Sowohl Dp140 als auch Dp71 werden im fetalen Hirngewebe exprimiert (Ceccarini *et al.*, 1997, Morris *et al.*, 1995), spielen also eine Rolle bei der Entwicklung und Reifung des Gehirns. Im erwachsenen Gehirn ist Dp140 nur in geringen Mengen nachweisbar (Morris *et al.*, 1995). Dp71 konnte jedoch in verschiedenen Zelltypen und Strukturen des erwachsenen Gehirns nachgewiesen werden (Sarig *et al.*, 1999, Tadayoni *et al.*, 2012). Dem Protein wird eine wichtige Rolle in der Regulation der Organisation und Funktion glutamaterger Synapsen zugesprochen, was auf eine Beteiligung des Dystrophins bei Vorgängen wie neuronaler und synaptischer Plastizität hindeutet (Daoud *et al.*, 2009). Es ist daher nachvollziehbar, dass die Entwicklung von komplexen Fähigkeiten wie Sprache, Koordination und höheren Denkleistungen bei Abwesenheit dieser Isoformen gestört ist. Allerdings müssen die Mechanismen, durch die ein Verlust von Dp140 und Dp71 die Hirnentwicklung verändert und die Schwere der kognitiven Behinderung von DMD-Patienten beeinflusst, noch aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Studie konnten leider auf Grund der retrospektiven Vorgehensweise keine bildgebenden Untersuchungen des Gehirns der Patienten durchgeführt werden. Insgesamt existieren einige solcher Studien für DMD-Patienten. In MRT-Studien wurden keine groben strukturellen Anomalien im Gehirn gefunden (Rae *et al.*, 1998). Mit sensitiveren Analysetechniken konnten allerdings subtile Veränderungen der grauen Substanz sowie ein verändertes neuronales Verhalten detektiert werden (Lv *et al.*, 2011). Metabolische Veränderungen des Glukosemetabolismus und anderer Hirnmetabolite wurden ebenfalls berichtet (Lee *et al.*, 2002, Rae *et al.*, 1998, Tracey *et al.*, 1995). Alle oben genannten Studien berichten auch über kognitive Einschränkungen der DMD-Patienten gegenüber normalen Kontrollen, konnten allerdings keine klare Korrelation zu den funktionellen Hirnveränderungen etablieren. Keine der bildgebenden Studien hat den Genotyp betrachtet. Da bei Verlust von Dp140 und insbesondere Dp71 die kognitive Beeinträchtigung schwerer ist, wäre es durchaus möglich, das Korrelat der kognitiven Beeinträchtigung als Anomalien in der Bildgebung wiederzufinden. Ein Zusammenhang zwischen der Schwere klinischer Symptomatik einschließlich der Kognition, Genotyp und zentraler Bildgebung muss noch gefunden werden.

6.5.4 Spezifisches Kognitives Profil und Genotyp

Unterschiede zwischen Patienten mit distalen und proximalen Mutationen betreffen nicht nur die Schwere der kognitiven Beeinträchtigung, sondern auch das spezifische kognitive Profil (vgl. Kapitel 2.3.4), wie kürzlich beschrieben wurde (D'Angelo *et al.*, 2011). In dieser Studie waren Patienten mit Beteiligung von Dp140 in ihren visuell-räumlichen Fähigkeiten und bei komplexer Sprachverarbeitung stärker eingeschränkt als Patienten mit proximalen Mutationen. Wie auch in der vorliegenden Patientenkohorte wurde aber auch hier eine große individuelle Variabilität beschrieben, und der Genotyp als keineswegs deterministisch identifiziert. Insgesamt unterliegt die Expression von Dystrophin im Gehirn einem komplexen Muster, und die Funktion der Isoformen ist nicht geklärt. Bei einem Verlust der Expression können daher auch keiner einzelnen Isoform spezifische Defizite zugeordnet werden. Es wird daher angenommen, dass das kognitive Profil von DMD Patienten ein Produkt des kumulativen Verlusts funktionaler Isoformen des Dystrophin ist (Taylor *et al.*, 2010, Waite *et al.*, 2012).

6.6 Ausblick

In den letzten Jahrzehnten ist es zu einem enormen Wissenszuwachs über DMD gekommen. Dennoch ist vieles über den Pathomechanismus der Erkrankung unklar. Ziel der zukünftigen Forschung muss sein, die Funktion des Dystrophin-Proteins in Muskel und ZNS besser zu verstehen. Nur so wird geklärt werden können, warum DMD mit Kleinwuchs sowie strukturellen und funktionellen Gehirnanomalien assoziiert sind und wie das spezifische kognitive Profil der Patienten entsteht. Ein besseres Verständnis der Rolle des Dystrophin könnte außerdem dabei helfen, eine kausale Therapie für die Erkrankung zu finden und somit bei früher Diagnose eine unbeeinträchtigte Entwicklung der betroffenen Kinder zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

Cardiovascular health supervision for individuals affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2005;116:1569-73.

WHO Motor Development Study: windows of achievement for six gross motor development milestones. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;450:86-95.

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle & nerve*. 2006;34:135-44.

Abbs S, Tuffery-Giraud S, Bakker E, Ferlini A, Sejersen T, Mueller CR. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2010;20:422-7.

Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics*. 1993;3:283-91.

Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125:4-13.

Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *The American journal of pathology*. 1999;154:1017-22.

Angelini C, Peterle E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*. 2012;31:9-15.

Appleton RE, Bushby K, Gardner-Medwin D, Welch J, Kelly PJ. Head circumference and intellectual performance of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental medicine and child neurology*. 1991;33:884-90.

Bach JR, Alba AS, Saporito LR. Intermittent positive pressure ventilation via the mouth as an alternative to tracheostomy for 257 ventilator users. *Chest*. 1993;103:174-82.

Baddeley AD, Hitch GJ. Working Memory. In: Bower GA, editor. *The Psychology of Learning and Motivation*. New York: Academic Press; 1974.

Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *The Biochemical journal*. 1990;272:557-60.

Batchelor CL, Winder SJ. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends in cell biology*. 2006;16:198-205.

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human genetics*. 1990;86:45-8.

Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic acids research*. 1992;20:1725-31.

- Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2006;16:249-55.
- Billard C, Gillet P, Signoret JL, Uicaut E, Bertrand P, Fardeau M, et al. Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1992;2:371-8.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*. 2002;82:291-329.
- Blonden LA, Grootsholten PM, den Dunnen JT, Bakker E, Abbs S, Bobrow M, et al. 242 breakpoints in the 200-kb deletion-prone P20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics*. 1991;10:631-9.
- Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, et al. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & nerve*. 2000;23:1344-7.
- Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Florence J, et al. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology*. 1989;39:475-81.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet neurology*. 2010;9:77-93.
- Bushby KM, Hill A, Steele JG. Failure of early diagnosis in symptomatic Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. 1999;353:557-8.
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature genetics*. 1993;4:77-81.
- Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC. A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain research Developmental brain research*. 1997;103:77-82.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*. 1988;16:11141-56.
- Cheuk DK, Wong V, Wraige E, Baxter P, Cole A. Surgery for scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;2:CD005375.
- Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *The Journal of pediatrics*. 2009;155:380-5.
- Connolly AM, Florence JM, Craddock MM, Malkus EC, Schierbecker JR, Siener CA, et al. Motor and cognitive assessment of infants and young boys with Duchenne Muscular Dystrophy: results from the Muscular Dystrophy Association DMD Clinical Research Network. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2013;23:529-39.

- Cotton S, Voudouris NJ, Greenwood KM. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Developmental medicine and child neurology*. 2001;43:497-501.
- Cotton SM, Voudouris NJ, Greenwood KM. Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Developmental medicine and child neurology*. 2005;47:257-65.
- Crisp DE, Ziter FA, Bray PF. Diagnostic delay in Duchenne's muscular dystrophy. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1982;247:478-80.
- Cyrulnik SE, Fee RJ, Batchelder A, Kiefel J, Goldstein E, Hinton VJ. Cognitive and adaptive deficits in young children with Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*. 2008;14:853-61.
- Cyrulnik SE, Fee RJ, De Vivo DC, Goldstein E, Hinton VJ. Delayed developmental language milestones in children with Duchenne's muscular dystrophy. *The Journal of pediatrics*. 2007;150:474-8.
- D'Angelo MG, Bresolin N. Cognitive impairment in neuromuscular disorders. *Muscle & nerve*. 2006;34:16-33.
- D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human molecular genetics*. 1995;4:837-42.
- D'Angelo MG, Lorusso ML, Civati F, Comi GP, Magri F, Del Bo R, et al. Neurocognitive Profiles in Duchenne Muscular Dystrophy and Gene Mutation Site. *Pediatric Neurology*. 2011;45:292-9.
- Daoud F, Candelario-Martinez A, Billard JM, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, et al. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PloS one*. 2009;4:e6574.
- Davidson ZE, Truby H. A review of nutrition in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 2009;22:383-93.
- den Dunnen JT, Bakker E, van Ommen GJ, Pearson PL. The DMD gene analysed by field inversion gel electrophoresis. *British medical bulletin*. 1989a;45:644-58.
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *American journal of human genetics*. 1989b;45:835-47.
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, Walker AP, Monaco AP, Butler R, et al. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Human molecular genetics*. 1992;1:19-28.
- Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, et al. Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PloS one*. 2009;4:e4347.

- Dorling J, Salt A. Evidence based case report: Assessing developmental delay. *BMJ*. 2001;323:148-9.
- Drachman DB, Toyka KV, Myer E. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. 1974;2:1409-12.
- Duboc D, Meune C, Pierre B, Wahbi K, Eymard B, Toutain A, et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *American heart journal*. 2007;154:596-602.
- Eagle M. Report on the muscular dystrophy campaign workshop: exercise in neuromuscular diseases Newcastle, January 2002. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002;12:975-83.
- Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002;12:926-9.
- Eiholzer U, Boltshauser E, Frey D, Molinari L, Zachmann M. Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *European journal of pediatrics*. 1988;147:602-5.
- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1991;1:19-29.
- England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature*. 1990;343:180-2.
- Essex C, Roper H. Lesson of the week: late diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy presenting as global developmental delay. *BMJ*. 2001;323:37-8.
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*. 1989;338:509-11.
- Felisari G, Martinelli Boneschi F, Bardoni A, Sironi M, Comi GP, Robotti M, et al. Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neurology*. 2000;55:559-64.
- Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT, 3rd, Griggs RC, et al. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 1991;41:1874-7.
- Finder JD, Birnkrant D, Carl J, Farber HJ, Gozal D, Iannaccone ST, et al. Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170:456-65.
- Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *American journal of human genetics*. 2003;72:931-9.
- Giglio V, Pasceri V, Messano L, Mangiola F, Pasquini L, Dello Russo A, et al. Ultrasound tissue characterization detects preclinical myocardial structural changes in children affected by Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:309-16.

- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human molecular genetics*. 1992;1:505-10.
- Grimm T, Kress W, Meng G, Muller CR. Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*. 2012;31:179-83.
- Gualandi F, Trabanelli C, Rimessi P, Calzolari E, Toffolatti L, Patarnello T, et al. Multiple exon skipping and RNA circularisation contribute to the severe phenotypic expression of exon 5 dystrophin deletion. *Journal of medical genetics*. 2003;40:e100.
- Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, Fritschy JM. The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain. *Neuroscience*. 2004;129:403-13.
- Hendriksen JG, Vles JS. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *Journal of child neurology*. 2008;23:477-81.
- Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y. Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology*. 2000;54:2127-32.
- Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y. Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: the neuropsychological profile of duchenne muscular dystrophy. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*. 2001;7:45-54.
- Hinton VJ, Nereo NE, Fee RJ, Cyrulnik SE. Social behavior problems in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2006;27:470-6.
- Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919-28.
- Hysing M, Elgen I, Gillberg C, Lundervold AJ. Emotional and behavioural problems in subgroups of children with chronic illness: results from a large-scale population study. *Child: care, health and development*. 2009;35:527-33.
- Inkley SR, Oldenburg FC, Vignos PJ, Jr. Pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy related to stage of disease. *The American journal of medicine*. 1974;56:297-306.
- Jansen M, van Alfen N, Geurts AC, de Groot IJ. Assisted Bicycle Training Delays Functional Deterioration in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy: The Randomized Controlled Trial "No Use Is Disuse". *Neurorehabilitation and neural repair*. 2013.
- Kissel JT, Burrow KL, Rammohan KW, Mendell JR. Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone-treated and untreated Duchenne muscular dystrophy. CIDD Study Group. *Neurology*. 1991;41:667-72.
- Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig RA, Bornhauser B, Schaub MC, Fritschy JM. Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *The European journal of neuroscience*. 1999;11:4457-62.

- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American journal of human genetics*. 1989;45:498-506.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-17.
- Konieczny P, Swiderski K, Chamberlain JS. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle & nerve*. 2013;47:649-63.
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, et al. Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilk*. 2001;149:807-18.
- Lavigne JV, Faier-Routman J. Psychological adjustment to pediatric physical disorders: a meta-analytic review. *Journal of pediatric psychology*. 1992;17:133-57.
- Lee JS, Pfund Z, Juhasz C, Behen ME, Muzik O, Chugani DC, et al. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. *Muscle & nerve*. 2002;26:506-12.
- Lidov HG, Byers TJ, Kunkel LM. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience*. 1993;54:167-87.
- Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature*. 1990;348:725-8.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human molecular genetics*. 1995;4:329-35.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4:712-20.
- Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Strong P, et al. Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *The Journal of cell biology*. 2000;148:985-96.
- Lundy CT, Doherty GM, Hicks EM. Should creatine kinase be checked in all boys presenting with speech delay? *Archives of disease in childhood*. 2007;92:647-9.
- Lv SY, Zou QH, Cui JL, Zhao N, Hu J, Long XY, et al. Decreased gray matter concentration and local synchronization of spontaneous activity in the motor cortex in Duchenne muscular dystrophy. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2011;32:2196-200.
- Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G, et al. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *Journal of neurology*. 2011;258:1610-23.
- Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2008:CD003725.
- Markert CD, Ambrosio F, Call JA, Grange RW. Exercise and Duchenne muscular dystrophy: toward evidence-based exercise prescription. *Muscle & nerve*. 2011;43:464-78.

- Martigne L, Salleron J, Mayer M, Cuisset JM, Carpentier A, Neve V, et al. Natural evolution of weight status in Duchenne muscular dystrophy: a retrospective audit. *The British journal of nutrition*. 2011;105:1486-91.
- Mazzone E, Vasco G, Sormani MP, Torrente Y, Berardinelli A, Messina S, et al. Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. *Neurology*. 2011;77:250-6.
- McDonald CM, Abresch RT, Carter GT, Fowler WM, Jr., Johnson ER, Kilmer DD, et al. Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. 1995;74:S70-92.
- McNaughton JC, Cockburn DJ, Hughes G, Jones WA, Laing NG, Ray PN, et al. Is gene deletion in eukaryotes sequence-dependent? A study of nine deletion junctions and nineteen other deletion breakpoints in intron 7 of the human dystrophin gene. *Gene*. 1998;222:41-51.
- Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, et al. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *The New England journal of medicine*. 1989;320:1592-7.
- Messina MF, Aguenouz M, Arrigo T, Rodolico C, Valenzise M, Musumeci O, et al. Novel SHOX gene mutation in a short boy with Becker muscular dystrophy: double trouble in two adjacent genes. *Hormone research*. 2008;69:124-8.
- Mohamed K, Appleton R, Nicolaides P. Delayed diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2000;4:219-23.
- Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *American journal of medical genetics*. 1998;80:32-41.
- Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, et al. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *European journal of human genetics : EJHG*. 2000;8:552-6.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Human genetics*. 1987;75:221-7.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988;2:90-5.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. 1986;323:646-50.
- Morris GE, Simmons C, Nguyen TM. Apo-dystrophins (Dp140 and Dp71) and dystrophin splicing isoforms in developing brain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;215:361-7.
- Moxley RT, 3rd, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, et al. Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards

- Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2005;64:13-20.
- Moxley RT, 3rd, Pandya S, Ciafaloni E, Fox DJ, Campbell K. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *Journal of child neurology*. 2010;25:1116-29.
- Muntoni F. Is a muscle biopsy in Duchenne dystrophy really necessary? *Neurology*. 2001;57:574-5.
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet neurology*. 2003;2:731-40.
- Nagel BH, Mortier W, Elmlinger M, Wollmann HA, Schmitt K, Ranke MB. Short stature in Duchenne muscular dystrophy: a study of 34 patients. *Acta Paediatr*. 1999;88:62-5.
- Nicholson LV, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta neuropathologica*. 1990;80:239-50.
- Nigro G, Comi LI, Politano L, Bain RJ. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *International journal of cardiology*. 1990;26:271-7.
- Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, et al. Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Human genetics*. 2002;110:418-21.
- Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, et al. Duchenne Muscular-Dystrophy Gene-Product Is Not Identical in Muscle and Brain. *Nature*. 1989;337:76-8.
- O'Brien T, Sibert JR, Harper PS. Implications of diagnostic delay in Duchenne muscular dystrophy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287:1106-7.
- Ogata H, Ishikawa Y, Minami R. Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of cardiology*. 2009;53:72-8.
- Okinaka S, Kumagai H, Ebashi S, Sugita H, Momoi H, Toyokura Y, et al. Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. *Archives of neurology*. 1961;4:520-5.
- Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Human molecular genetics*. 1992;1:599-603.
- Pane M, Messina S, Bruno C, D'Amico A, Villanova M, Brancalioni B, et al. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2013a;23:313-5.
- Pane M, Scalise R, Berardinelli A, D'Angelo G, Ricotti V, Alfieri P, et al. Early neurodevelopmental assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2013b;23:451-5.
- Parsons EP, Clarke AJ, Bradley DM. Developmental progress in Duchenne muscular dystrophy: lessons for earlier detection. *Eur J Paediatr Neuro*. 2004;8:145-53.
- Passamano L, Taglia A, Palladino A, Viggiano E, D'Ambrosio P, Scutifero M, et al. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835

patients. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases.* 2012;31:121-5.

Perronnet C, Vaillend C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2010;2010:849426.

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90:3710-4.

Pilgram GS, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Molecular neurobiology.* 2010;41:1-21.

Rae C, Scott RB, Thompson CH, Dixon RM, Dumughn I, Kemp GJ, et al. Brain biochemistry in Duchenne muscular dystrophy: a 1H magnetic resonance and neuropsychological study. *Journal of the neurological sciences.* 1998;160:148-57.

Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature genetics.* 1997;16:54-63.

Rapaport D, Colletto GM, Vainzof M, Duaik MC, Zatz M. Short stature in Duchenne muscular dystrophy. *Growth regulation.* 1991;1:11-5.

Rapisarda R, Muntoni F, Gobbi P, Dubowitz V. Duchenne muscular dystrophy presenting with failure to thrive. *Archives of disease in childhood.* 1995;72:437-8.

Repovs G, Baddeley A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience.* 2006;139:5-21.

Rhodes J, Margossian R, Darras BT, Colan SD, Jenkins KJ, Geva T, et al. Safety and efficacy of carvedilol therapy for patients with dilated cardiomyopathy secondary to muscular dystrophy. *Pediatric cardiology.* 2008;29:343-51.

Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics.* 1993;16:536-8.

Rodino-Klapac LR, Mendell JR, Sahenk Z. Update on the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Current neurology and neuroscience reports.* 2013;13:332.

Rose KJ, Burns J, Wheeler DM, North KN. Interventions for increasing ankle range of motion in patients with neuromuscular disease. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2010:CD006973.

Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, et al. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human molecular genetics.* 1999;8:1-10.

Schmidt B, Watters GV, Rosenblatt B, Silver K. Increased head circumference in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology.* 1985;17:620-1.

- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research*. 2002;30:e57.
- Schwartz M, Duno M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genetic testing*. 2004;8:361-7.
- Scott OM, Hyde SA, Goddard C, Dubowitz V. Quantitation of muscle function in children: a prospective study in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & nerve*. 1982;5:291-301.
- Septien L, Gras P, Borsotti JP, Giroud M, Nivelon JL, Dumas R. [Mental development in Duchenne muscular dystrophy. Correlation of data of the brain scanner]. *Pediatrie*. 1991;46:817-9.
- Sironi M, Pozzoli U, Cagliani R, Giorda R, Comi GP, Bardoni A, et al. Relevance of sequence and structure elements for deletion events in the dystrophin gene major hot-spot. *Human genetics*. 2003;112:272-88.
- Sironi M, Pozzoli U, Comi GP, Riva S, Bordoni A, Bresolin N, et al. A region in the dystrophin gene major hot spot harbors a cluster of deletion breakpoints and generates double-strand breaks in yeast. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20:1910-2.
- Skalsky AJ, McDonald CM. Prevention and management of limb contractures in neuromuscular diseases. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2012;23:675-87.
- Smith RA, Sibert JR, Wallace SJ, Harper PS. Early diagnosis and secondary prevention of Duchenne muscular dystrophy. *Archives of disease in childhood*. 1989;64:787-90.
- Soudon P, Steens M, Toussaint M. A comparison of invasive versus noninvasive full-time mechanical ventilation in Duchenne muscular dystrophy. *Chronic respiratory disease*. 2008;5:87-93.
- Stolzenberg H, Kahl H, Bergmann KE. [Body measurements of children and adolescents in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2007;50:659-69.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular neurobiology*. 2012;45:43-60.
- Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, et al. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS one*. 2010;5:e8803.
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, Danieli GA, Gualandi F, Muntoni F, et al. Investigating the mechanism of chromosomal deletion: characterization of 39 deletion breakpoints in introns 47 and 48 of the human dystrophin gene. *Genomics*. 2002;80:523-30.
- Tracey I, Scott RB, Thompson CH, Dunn JF, Barnes PR, Styles P, et al. Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. *Lancet*. 1995;345:1260-4.

- Vaillend C, Billard JM, Laroche S. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiology of disease*. 2004;17:10-20.
- Voigt M, Fusch C, Olbertz D, Hartmann K, Rochow N, Renken C, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtsh Frauenheilk*. 2006;66:956-70.
- Waite A, Brown SC, Blake DJ. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in neurosciences*. 2012;35:487-96.
- West NA, Yang ML, Weitzenkamp DA, Andrews J, Meaney FJ, Oleszek J, et al. Patterns of growth in ambulatory males with duchenne muscular dystrophy. *The Journal of pediatrics*. 2013;163:1759-63 e1.
- White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, et al. Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *American journal of human genetics*. 2002;71:365-74.
- White SJ, den Dunnen JT. Copy number variation in the genome; the human DMD gene as an example. *Cytogenetic and genome research*. 2006;115:240-6.
- Willig TN, Carlier L, Legrand M, Riviere H, Navarro J. Nutritional assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental medicine and child neurology*. 1993;35:1074-82.
- Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J, Burghes AH. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production. *American journal of human genetics*. 1995;56:158-66.
- Yoshioka M, Okuno T, Honda Y, Nakano Y. Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. *Archives of disease in childhood*. 1980;55:589-94.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elisabeth Sarrazin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wachstum und psychomotorische Entwicklung von Kindern mit Duchenne Muskeldystrophie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

17.06.2014

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elisabeth Sarrazin hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Sarrazin, von der Hagen, Schara, von Au, Kaindl. Anthropometrische Daten von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne. Postervortrag bei der 38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, April 2012, Münster.

Beitrag im Einzelnen: Gewinnung und Auswertung der Daten, Erstellung des Posters und Postervortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie

Publikation 2: Sarrazin E, von der Hagen, Schara, von Au, Kaindl. Growth and psychomotor development of patients with Duchenne Muscular Dystrophy. European Journal of Paediatric Neurology 2014 Jan; 18(1):38-44

Beitrag im Einzelnen: Gewinnung und Auswertung der Daten, Schreiben der Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meiner betreuenden Professorin Angela Kaindl danken. Sie hat meine Arbeit mit jeder erdenklichen Unterstützung begleitet. Mit ihrer strukturierten und klaren Denkweise hat sie mir geholfen, auch in schwierigen Phasen den Fokus und die Motivation zu behalten. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft ist sehr ansteckend, und die gemeinsame Publikation der Arbeitsergebnisse wäre ohne sie nicht möglich gewesen. Ebenfalls Dank aussprechen möchte ich Katja von Au, Ulrike Schara und Maja von der Hagen, die mir Zugang zu den Daten der neuropädiatrischen Ambulanzen gewährt haben und mir ebenfalls bei der Publikation mit ihrer Erfahrung und ihrem Wissen zur Seite gestanden haben.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich mein ganzes Leben unterstützt und an mich geglaubt haben. Diese Gewissheit hat mir geholfen, allen Herausforderungen zu begegnen.