
Orsaken till tibial muskel- dystrofi klarlagd

- mutationer i den gigantiska muskelgenen titin

PETER HACKMAN, ANNA VIHOLA, HENNA HARAVUORI, JAAKKO SARPARANTA OCH BJARNE UDD

*Tibial muskeldystrofi (TMD) räknas till det s.k. finländska sjukdoms-
arvet och är i Finland relativt vanlig för att vara en ärftlig muskel-
sjukdom. Symtomen börjar i medelåldern och leder till en fortskri-
dande muskelsvaghet i fötter och vrister. Personer som i övrigt är fris-
ka men som i vuxen ålder utan känd orsak har fått en dorsalextensi-
onssvaghet i bägge vrister, kan med goda skäl misstänkas ha TMD.
Svagheten kan enkelt testas med att pröva förmågan att gå på hälar-
na. Om hälgången inte lyckas, om senreflexerna i benen är normala
och i synnerhet om samma svaghet i fötterna förekommer hos släkt-
ningar är diagnosen fullt möjlig. Hereditära muskelsjukdomar för-
knippas ofta med svår invaliditet och olycklig prognos; TMD är an-
norlunda i detta avseende.*

*Sjukdomen har sannolikt förekommit i den finländska befolkningen
under alla sekler men den upptäcktes först för lite över tio år sedan.
Ett kliniskt forskningsarbete beträffande varierande symtom på mus-
kelsjukdom hos ett flertal personer i området Jakobstad-Larsmo-Kar-
leby påvisade TMD som en särskild entitet med en egen fenotyp (Udd
et al. 1991, Udd 1992, Udd et al. 1993). Ungefär samtidigt hade kolle-
ger vid Kuopio universitetssjukhus sett patienter med en likadan sjuk-
domsbild (Partanen et al. 1994). TMD fick som ny entitet också inter-
nationellt erkännande (Griggs 1994).*

DEN KLINISKA SJUKDOMSBILDEN

Patienternas symtom debuterar efter 35 års ålder med svårighet att lyfta fotbladen och tårna; i en del fall kan symtomen göra sig gällande först långt senare i 60–70-års åldern. Svagheten i tibialis anterior-muskeln ökar efterhand och gången blir något avvikande, med ett klafsande tillslag av fotbladet mot underlaget. Efter ca 10–15 års sjukdomstid brukar också de långa tåextensorerna på smalbenet försvagas, varvid lindrig droppfot liknande den vid peroneuspares kan uppträda. Hos många patienter utvecklas inga andra problem, medan andra i högre ålder också får en

måttlig proximal svaghet i benmuskulerna, mest tydlig i lårets flexorer och i höftens gluteus minimus. Hos 10 procent av fallen ses avvikande fenotyp med svaghet och atrofi framför allt i lårmuskler och övre extremiteter eller assymetrisk affektion.

Den beskrivna sjukdomsutvecklingen medför att patienterna rätt väl behåller sin arbets- och funktionsförmåga. Några patienter i tungt fysiskt arbete har förtidspensionerats, men även de patienter som drabbats av en mycket utpräglad sjukdomsbild har kunnat bevara förmågan att gå livet ut, dvs. i en del kända fall över 85 års ålder. Kardiomyopati har inte

diagnostiserats hos TMD-patienter, inte heller någon svaghet, smärta eller kramper i ansiktet, och TMD förekommer ungefär lika mycket och med samma svårhetsgrad hos män och kvinnor.

I början var klassificeringen av sjukdomen komplicerad på grund av den fenotypiska variationen i den ursprungliga familjen, en stor Larsmo-släkt. I denna släkt fanns en del patienter med en betydligt allvarligare limb-girdle typ av muskeldystrofi (LGMD).

NEUROMUSKULÄRA UNDERSÖKNINGSFYND

Vanligen ser man atrofi i tibialis anterior-muskeln; tibians framkant blir synligt prominent (fig. 1). Sensibiliteten är normal liksom senreflexerna.

Kreatinkinasaktiviteten i serum (s-CK) är vanligen lätt förhöjd men kan stiga till maximalt 3–4 ggr det övre normalvärdet. I elektroneuromyografi (ENMG) visar sig det tydligaste fyndet i tibialis anterior i form av minskat antal polyfasiska motoriska enheter med mycket låga amplituder och fibrillationspotentialer. Nervledningshastigheterna är helt normala, fyndet i korta tåextensorer är ålders normalt, och jättepentialer, som vid kronisk neurogen sjukdom, förekommer inte.

Med hjälp av datortomografi eller magnetresonansundersökning (MRI) av musklerna



FIGUR 1. Bild av nedre delen av benen hos en TMD-patient, som uppvisar atrofi i tibialis anterior med tydligt prominent framkant av tibian.

FÖRFATTARNA

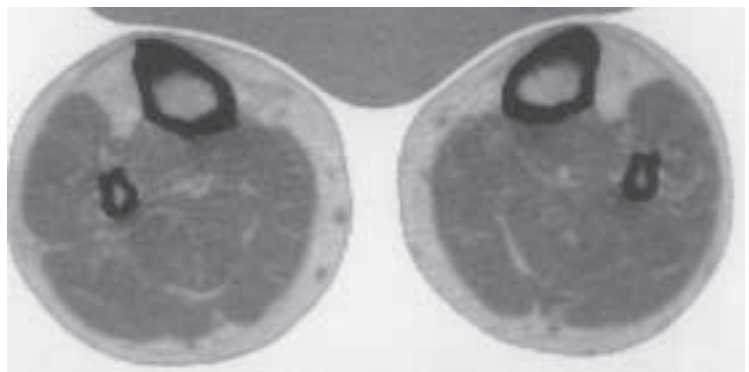
PhD Peter Hackman är forskare vid Folkhälsans genetiska institut

FM Anna Vihola är cellbiolog och doktorand vid neuromuskulära enheten vid Vasa centralsjukhus

ML Henna Haravuori är doktorand vid Folkhälsoinstitutet

Fil.stud. Jaakko Sarparanta är forskarstuderande vid Folkhälsans genetiska institut

Docent Bjarne Udd är gruppleddare för den neuromuskulära forskningsgruppen och överläkare vid Vasa centralsjukhus neurologiska enhet



FIGUR 2. Datortomografi som visar tvärsnitt av vadmuskler hos en TMD-patient, som uppvisar omfattande fettdegenerativ skada i tibialis anterior på bägge sidor.

får man en mycket klar bild av den selektiva muskeldystrofin. Dessa metoder ger bilder som utvisar en höggradig och selektiv fettdegenerativ förändring i framför allt tibialis anterior och ibland i närliggande långa tåextensorer (fig 2). Fläckvis kan skadeförändringar förekomma i mediala gastrocnemius, hamstringsmuskler och gluteus minimus, även vid avsaknad av kliniska symtom från dessa förändringar.

Muskelbiopsin ger mycket varierande fynd helt beroende på var provbiten tas. Muskelbiopsier från berörda muskler påvisar myopatisk-dystrofiska förändringar av varierande svårhetsgrad. Förändringarna utvecklas gradvis till ett slutskede med förlust av myofibrer och infiltration av fett- och bindvävnad. Om muskeln inte är helt "utbränd" ser man, i många fall även s.k. rimmed vacuoles vid sidan av dystrofi-förändringar. Dessa innehåller elektronmikroskopiskt sett degenererat avfallsmaterial från destruktionsprocessen i den berörda muskelfibern.

EPIDEMIOLOGI

Sedan TMD blivit mer känd i Finland, har ett ökande antal patientfall konstaterats, i detta nu över 300 i hela landet. Av dessa har mer än 200 genomgått grundliga undersökningar och fått sin diagnos, medan de övriga är undersökta nära släktingar med klara symtom. Prevalensen är således över 6/100 000. Den faktiska förekomsten är sannolikt mycket större eftersom nya fall hela tiden dyker upp. Sjukdomen kan visa sig vara den vanligaste muskeldystrofin i Finland. Fallen finns numera i så gott som hela landet, men om man ser till födelseorten för den äldsta kända patientgenerationen i de berörda familjerna, framträder ett ojämnt mönster i den geografiska distributionen. Än så länge tycks patienternas släktrötter vara koncentrerade till mellersta Österbotten samt området Savolax-Karelen. Hur denna tudelade modell skall förklaras är inte någon enkel fråga då klara genealogiska band mellan familjerna i västra och östra Finland saknas från tidigt 1600-tal framåt i tiden. Utomlands är sjukdomen känd hos finländska emigrantättlingar i Sverige, den europeiska kontinenten och Nordamerika. Desutom finns några TMD-familjer beskrivna utomlands som inte har anknytning till Finland, bl.a. i Lille i Frankrike, i USA och i Belgien. USA-familjen har en likartad men inte helt kongruent sjukdomsbild (Markesbery 1974).

GENETISKA FORSKNINGSFYND

Ärftligheten i de berörda familjerna följer ett autosomt dominant nedärvningsmönster. Sporadiska fall utan känd manifestation hos släktingar förekommer, men då sjukdomen ibland kan vara mycket lindrig kan den passera obemärkt, såvida inte grundliga undersökningar bekräftat motsatsen.

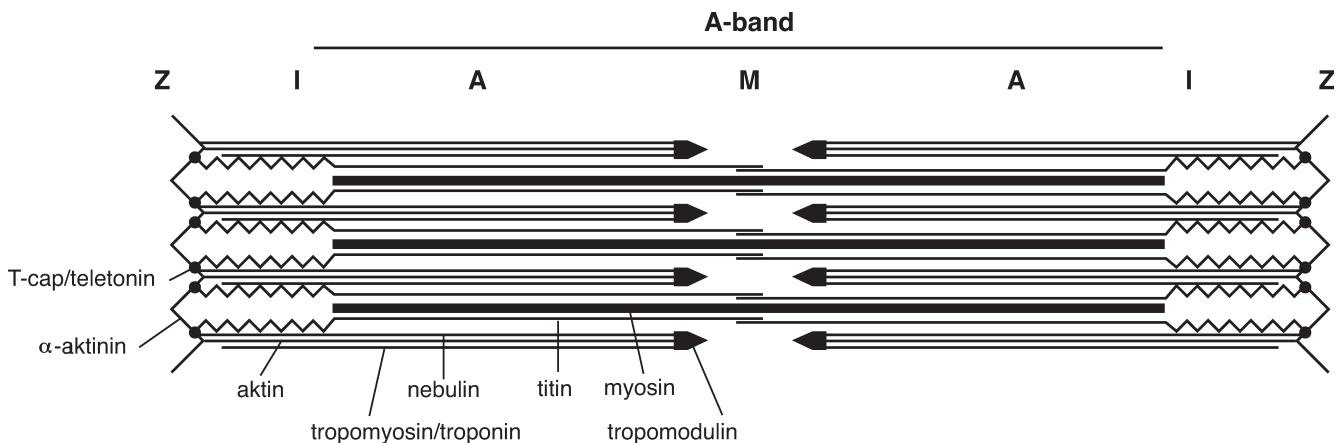
Molekylärgenetisk forskning i orsaken till TMD har tidigare bedrivits vid Folkhälsoinstitutet, och år 1997 gjordes det avgörande genombrottet med entydig koppling till ett 43 cM-område på kromosom 2q (Haravuori et al., 1998). Kopplingsområdet kunde senare minskas ned till 1 cM (Haravuori et al. 2001). Alla finländska familjer uppvisar en gemensam haplotypkärna för markörer kring 2q-lokuset (Haravuori et al. 1998). I den ursprungligen undersökta stora slakten från Larsmo-Jakobstad, förekom parallellt också en annan mycket svårt invalidiserande LGMD-typ av muskeldystrofi. Den visade sig vara en sjukdomsmanifestation hos homozygoter för denna haplotyp, dvs. de som bär på en dubbel uppsättning av den genmutation som förorsakar TMD (Haravuori et al. 1998)).

Även de orelaterade utländska familjerna i Frankrike, USA och Belgien uppvisar koppling till samma 2q-lokus, men de följer inte den finländska haplotypen. Kandidatgenerna inom det kopplade området på kromosom 2q har därefter analyserats, speciellt den stora titingenen.

DEN GIGANTISKA MUSKELGENEN TITIN

Den primära kandidatgenen för TMD, titin (*TTN*), kodar för det största mänskliga proteinet. Detta muskelprotein sträcker sig från Z-disken till M-bandet i sarkomeren som utgör grundenheten för muskelfibrerna.

Titin är en central och viktig komponent i muskelfibrerna, som har många kända och fortfarande okända funktioner. Det fungerar som muskelfibrernas fjäder och återger dem sin vanliga längd efter sammandragning. Titinet styr muskelfibrernas uppbyggnad och andra muskelproteiners lokalisering i muskellcellerna i de tidiga utvecklingsfaserna. Det håller även muskelfibrernas olika proteinmolekyler på plats när muskeln är i arbete (fig 3). Titin har troligen även signalfunktioner i cellen (Centner et al. 2001). *TTN* har med andra ord många egenskaper som gör den till en funktionellt intressant kandidatgen för TMD (Labeit et al., 1995, Labeit et al., 1997).



FIGUR 3. Sarkomerens struktur i muskelfibern, schematiskt med titin och andra viktiga proteiner indikerade.

TTN genen kodar för upp till 38 138 aminosyror och har flera alternativa isoformer i olika muskler (bl.a skelett- och hjärtmuskel) orsakade av alternativ splitsning (Bang et al. 2001) Detta kan vara relevant för den selektiva anatomiska begränsningen av myopatier till olika muskler. Titinmutationer har redan visat sig förorsaka human kardiomyopati (Gerull et al. 2002), och har rapporterats orsaka dystrofi i mus (Garvey et al. 2002).

Titin binder ett stort antal andra muskelproteiner, bland andra det muskelspecifika proteaset calpain3 (CAPN3); det har penerats stabilisera CAPN3 och hindra dess autodegeneration (Sorimachi 2001). År 1999 påvisades att CAPN3 sekundärt är avsevärt reducerat vid homozygoti av TMD-kopplad haplotyp (Haravuori et al. 2000). Fyndet har stor betydelse eftersom primära defekter i *CAPN3*-genen har rapporterats orsaka svår muskeldystrofi (LGMD2A) (Richard et al. 1995), som liknar den vid TMD haplotyp-homozygoti.

MUTATIONER I TITIN-GENEN ORSAKAR TMD

Vår forskningsgrupp påvisade i slutet av år 2001 en mycket speciell mutation alldeles i titingenens slutända i den sista exonen (Hackman et al, 2002). Förändringen består i att 11 baspar i genen har bytts ut. Detta leder till att fyra av titinproteinets ca 38 000 aminosyror har ersatts av andra aminosyror. De utbytta

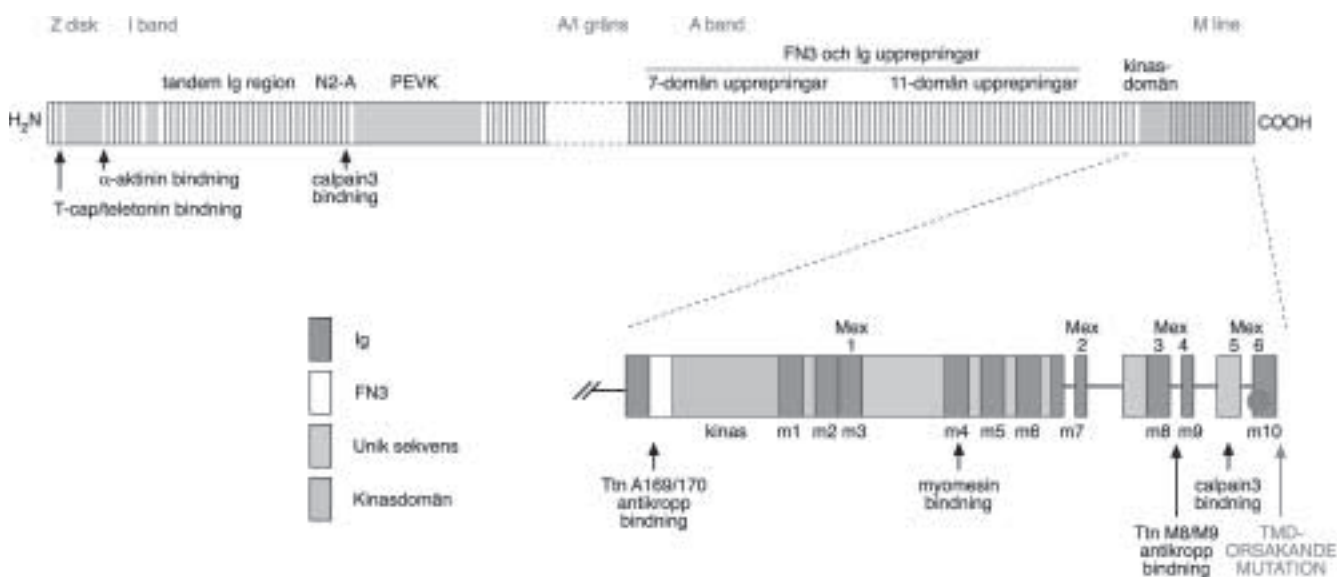
aminosyrorna orsakar en strukturell avvikelse i titinproteinets, vilket uppenbarligen stör samarbetet mellan titinet och de andra proteinerna i sarkomerens M-linje (fig 4). Mutationen förekom inte hos 217 finländska testade friska kontrollpersoner. Immunhistokemiska analyser av homozygot muskelbiopsi indikerade förlust av funktionella titinepitoper i området kring mutationen. Mutationen ligger i samma område som ett av titinets CAPN3-bindningsställen.

Hos den franska TMD-familjen har vi påvisat en annan mutation i samma exon av *TTN*-genen som har lett till att endast en aminosyra har bytts ut.

På grund av sin storlek är den finländska *TTN*-mutationen lätt att snabbt påvisa med så kallad single strand conformational polymorphism-analys (SSCP). Alla de hittills, närmare 100 SSCP-analyserade TMD-patienterna i Finland från 12 olika obesläktade familjer, är genetiskt homogena, dvs. bär på samma mutation. Haplotyplängden och befolkningshistoriska uppgifter förlägger det gemensamma ursprunget till medeltiden eller tidigare, geografiskt snarare till Ladogas stränder än till västra Finland.

KONKLUSIONER

TMD utgör ett väsentligt inslag i det finländska sjukdomspanoramats. Orsaken till tibial muskeldystrofi är nu klarlagd. Sjukdomen orsakas av mutationer i den sista exonen av



FIGUR 4. Schematisk bild av titinets multimodulstruktur på molekylär nivå. CAPN3 och andra proteinliganders och antikroppars bindningsställen indikerade. Den 3'/C-terminala modulära strukturen av titin förstörd, med fler detaljer utsatta. Mutationen som orsakar TMD, märkt med rött, ger upphov till strukturell avvikelser hos titinet i sarkomerens M-linje.

den gigantiska muskelgenen *TTN*. Detta är första gången mutationer i det sarkomera proteinet titin påvisats vara orsaken till en human muskeuloskeletal sjukdom. Mutationerna leder till funktionella brister i titinet och stör dess samverkan med andra proteiner. Detta stöds av att den upptäckta mutationen i de finländska homozygota TMD-patienterna även orsakar immunologisk förlust av titinpitoper i området och sekundär CAPN3-brist i homozygota TMD-patienter. Troligen påverkas dock även en rad andra proteiner förutom CAPN3, vilket i slutändan leder till TMD.

De nya forskningsrönen möjliggör en entydig och snabb diagnos baserad på DNA-analys. Detta kan göras direkt från blodprover av patienten.

Framöver kommer forskningen att koncentreras på att förstå vad som får muskelcellerna att dö i förtid och varför en del muskler drabbas så selektivt. Detta kommer att göras med bl.a. funktionella tester på proteinnivå t.ex. den s.k. jäst-två hybridmetoden (Legrain et al. 2000), och studier av den spontana titin-musmutanten *mdm* (Garvey et al 2002). Dessutom håller vi på att undersöka TMD-familjer från andra länder för att faställa om även de drabbats av mutationer i *TTN*-genen,

samt att klargöra effekten av de funna TMD-relaterade *TTN*-mutationerna på proteinnivå i muskelcellen. Denna insikt behövs för arbetshypoteser som syftar till terapeutiska möjligheter.

Med tillfredsställelse kan även noteras att Finska Läkaresällskapet stött de delprojekt i utforskningen av TMD som nu lett till att orsaken till sjukdomen klarlagts.

PETER HACKMAN, GENETISKA INSTITUTET VID FOLKHÄLSAN

ANNE VIHOLA, VASA CENTRALSJUKHUS, 65130 VASA

HENNA HARAVUORI, FOLKHÄLSOINSTITUTET, BIOMEDICUM

JAAKKO SARPARANTA, GENETISKA INSTITUTET VID FOLKHÄLSAN

BJARNE UDD, VASA CENTRALSJUKHUS, 65130 VASA
bjarne.udd@netikka.fi

REFERENSER

1. Bang M-L, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual 700-kDa Titin Isoform and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Linking System. *Circ Res* 2001, 89:1065-1072.
2. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang M-L, Tombitás K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S Identification of Muscle Specific Ring Finger Proteins as Potential Regulators of the Titin Kinase Domain. *J Mol Biol* 2001, 306:717-726
3. Garvey SM, Chandrika R, Lerner AP, Frankel WN, Cox GA The Muscular Dystrophy with Myositis (mdm) Mouse Mutation Disrupts a Skeletal Muscle-Specific Domain of Titin. *Genomics* 2002, 79:146-149
4. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitás K, Sasse-Klaassen S, Seidman JG, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L Mutations of *TTN*, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002, 30:201-204
5. Griggs R, Markesbery W. Distal myopathies. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. eds. *Myology* 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1994: 1246-1257.
6. Hackman, P, Vihola, A, Haravuori H., Marchand S., Sarpanta, J., de Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I., and Udd, B. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in *TTN*, the gene encoding the giant skeletal muscle protein titin. *Am J Hum Gen* 2002, 71,
7. Haravuori H, Mäkelä-Bengs P, Udd B, Pulkkinen L, Partanen J, Somer H and Peltonen L. Assignment of the tibial muscular dystrophy (TMD) locus to chromosome 2q31. *Am J Hum Gen* 1998; 62: 620-626.
8. Haravuori H, Vihola, A, Straub, V., Auranen, M, Richard, I, Marchand, S., Voit, T., Labeit, S., Somer, H., Peltonen, L., Beckmann, J.S. and Udd B. Secondary calpain deficiency in 2q-linked muscular dystrophy-titin is the candidate gene. *Neurology* 2001; 56:869-877
9. Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 1995;270:293-296.
10. Labeit S, Kolmerer B, Linke W. The giant protein titin - emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res* 1997;80:290-294.
11. Legrain P, and Luc Selig. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS letters* 2000: 480:32-36.
12. Markesbery WR, Griggs RC, Leach RP, Laphom LW: Late onset hereditary distal myopathy. *Neurology* 1974, 23:127-134.
13. Partanen J, Laulumaa V, Partanen K, Paljärvi L: Late onset foot-drop muscular dystrophy with rimmed vacuoles. *Journal of Neurological Sciences* 1994, 125:158-167
14. Richard I, Broux O, Allamand V, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81:27-40.
15. Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem (Tokyo)* 2001; 129:653-664
16. Udd B, Kääriäinen H, Somer H: Muscular dystrophy with separate phenotypes in a large family. *Muscle & Nerve* 14:1050-1058, 1991.
17. Udd B: Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: A homozygous manifestation of a dominant gene? *Journal of Medical Genetics* 1992, 29:383-390.
18. Udd B: Tibial muscular dystrophy. A distal myopathy with severe proximal muscular dystrophy in probable homozygotes. Thesis. University of Helsinki. ISBN 1992, 952-90-4211-6.
19. Udd B, Partanen J, Halonen P, et al.: Tibial muscular dystrophy - Late adult onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Archives of Neurology* 1993, 50: 604-608.