

DNA diagnostika Duchenneovy / Beckerovy muskulární dystrofie

Petra Hedvičáková
ÚBLG FN Motol
Odd. lékařské molekulární genetiky
MZO 00064203

9.9.2011
Konference EAMDA

Duchenneova muskulární dystrofie

- Neuromuskulární onemocnění
- Progresivní svalová slabost
- XR
(u myši, krysy, psů, krav, ovcí a koní se nejedná o X-vázanou dystrofii)
- Incidence 1/3500 živě narozených ♂
- Vysoká mutační frekvence $\cong 10^{-4}$ gamet na generaci
- 1/3 mutací de novo

Klinické příznaky

~ 2-3 roky svalová slabost
dolní končetiny- v proximální části
srdeční sval
někdy MR

Svalová pseudohypertrofie, kontraktury, skoliosa

Laboratorně ↑ CK v séru, EMG, mol. genetiky, svalová biopsie

96% posun čtecího rámce

30% de novo

10 – 20% nových mutací – gonadální mozaiky

Beckerova muskulární dystrofie

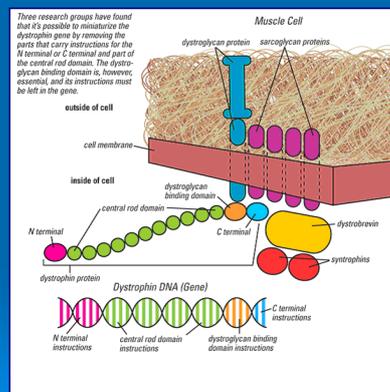
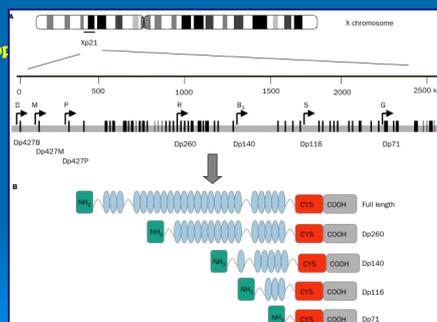
- 70% pacientů in frame
- 16% frame shift
- Bodové mutace (> 70 různých, C→T)
- Zřídka de novo
- Nástup > 7 let
- CK velmi vysoké (5000 - 20000)

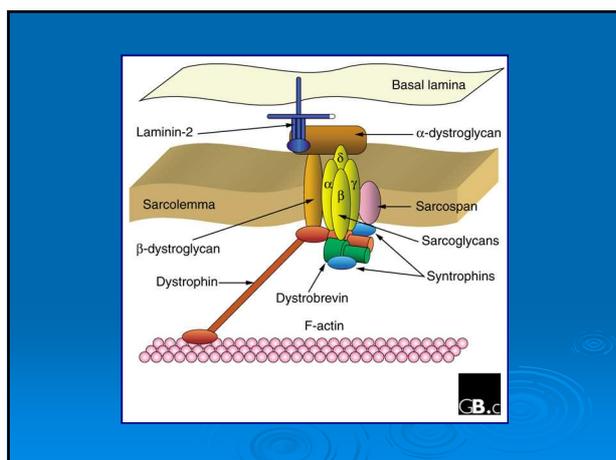
Organizace genu DMD

Xp21

gen: 2.5 milionu bp
mRNA: 14000bp
1+ 78 exonů
 $\cong 0.6\%$ genu
promotory:

B, B3 – mozek
M – sval
P – Purkyňovy
buňky
S – Schwannovy
buňky
R – retina
G – všeoobecný
promotor





Dystrofin

3 685 Aa 4 domény

- Amino-terminální (asociace s aktinem nebo aktin-like proteinem) exony 1-8
- Extended rod spectrin-like exony 9-63
- Cystein rich exony 64-67
- Carboxy-terminální exony 68-79

(asociují s velkým oligomerním komplexem glykoproteinů sarkolemy – DAPC dystrophin-associated protein complex)

Imunohistochemie – dystrofin na cytoplasmatické straně membrán svalových buněk a na postsynaptické membráně neuronů

Funkce - udržování stability svalové membrány?
dysregulace iontových kanálů
(kalcium ↑ → proteázy → degenerace)?

Lokalizace v sarkolemě svalových fibril

In situ dystrofin



Normální dystrofin
barvení kolem svalových vláken

Chybějící dystrofin: Duchenneova muskulární dystrofie

Vlevo: žádné barvení kolem svalových vláken
Vpravo: žádné barvení kolem většiny vláken

<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/dmdpath.htm>

Exony < 150 bp

Introny až 180 kb

cDNA 14 kb

Dystrofin 427 kD

Gen kompletně klonován 1987 (Koenig et al)

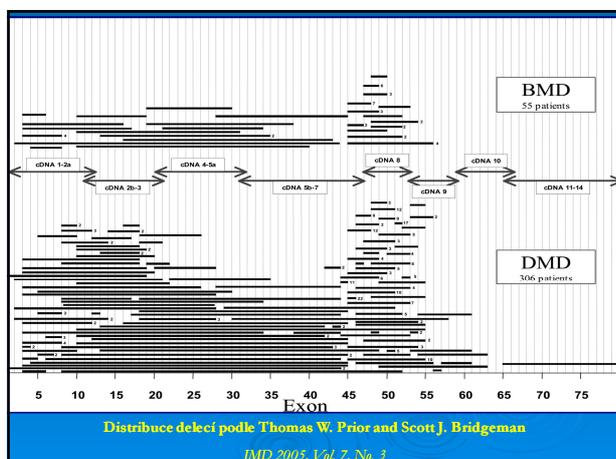
Mutace - 60-65% delece, i více než 137 kb

Hot spots

~ 5-6% duplikace

Mozaicismus v germinální linii – 7% riziko opakování

Nejvyšší hladiny dystrofinové mRNA – kosterní svalstvo a srdeční sval, hladké svaly asi 5-10% hladiny svalů kosterních



Diagnostika

1. Delece a duplikace

Multiplex PCR, Southern blot, MLPA

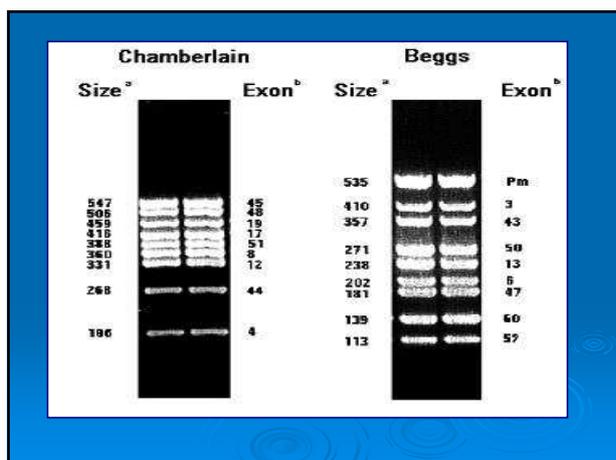
2. PTT

3. Sekvenace

4. Haplotypová analýza - segregace alel

intragenová rekombinace!! až 12%

Rizikový haplotyp – 14% riziko opakování



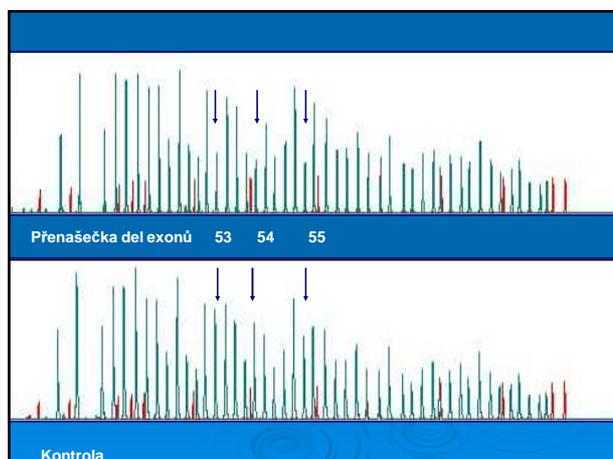
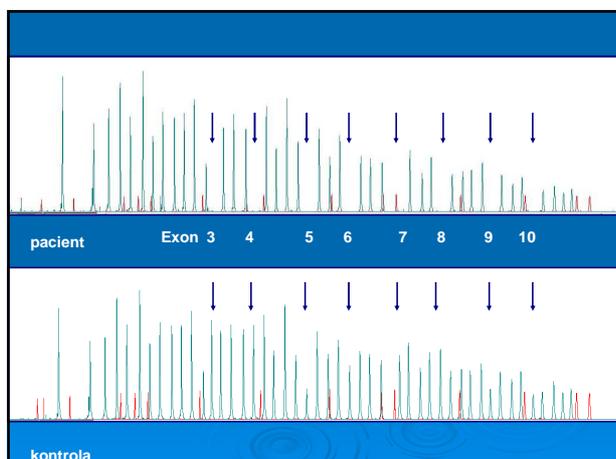
www.mlpa.com

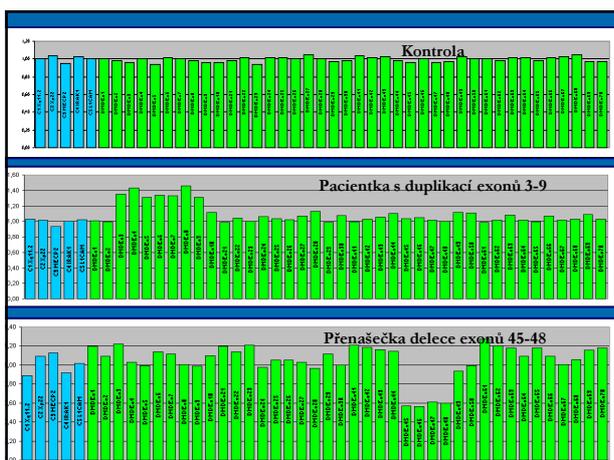
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Prvně popsáno:

Schouten JP, McElgunn CJ, Waajier R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):e57.

- 1. denaturace
- 2. hybridizace
- 3. ligace
- 4. amplifikace
- 5. elektroforéza





Bodové mutace

- většinou unikátní
- distribuce po celém genu, žádné hot oblasti
- většinou je důsledkem zkrácení proteinu

PTT – protein truncation test

- mRNA z biopsie svalu, screening kódující oblasti
- reverzní transkripce – několik překrývajících se fragmentů mRNA
- sekundární PCR – nested amplifikace cDNA s primerem, který umožňuje *in vitro* transkripci T7-RNA polymerázou (T7 promotorová sekvence, eukaryotickou iniciační sekvencí translace) → *in vitro* transkripce/translace
- při translaci inkorporace radioaktivně značené Ak
- eřo

V translačním kroku vznikají fragmenty peptidů, které indikují zkrácení proteinu

Dráha 2: pac. 1 exon 58–68 normální produkt 48kDa
 Dráha 3: pac. 1 exon 67–79 zkrácený produkt 30kDa
 Dráha 5: pac. 2 exon 58–68 zkrácený produkt 22kDa
 Dráha 6: pac. 2 exon 67–79 normální produkt 48 kDa

Sekvenováním zjiřeny mutace c.10431 + 1G>A a c.9405C>A

Foto Drs Steve Abbs a Zandra Hatton, Medical and Molecular Genetics, Guy's Hospital, London.

Human Molecular Genetics, 2nd edition, Strachan T, Read AP, New York: Wiley-Liss, 1999.

Pacient s bodovou mutací v exonu 58 c.8608C>T (p.Arg2870Stop)

The figure shows two chromatograms. The top one is labeled 'kontrola' and shows a clear peak for 'C' at position 8608. The bottom one is labeled 'pacient' and shows a peak for 'T' at the same position. Below the chromatograms, the DNA sequence is shown: G A G A C T G T A C G A T A T T T. In the patient's sequence, the 'C' is replaced by 'T', which is circled in red. An arrow points to this mutation.

Pacient s přestavbou v exonu 60

The figure shows a chromatogram with a gap in the sequence, indicating a deletion. Below it, two gel images are shown: 'Interní kontrola amplifikace Exon 60' and 'Exon 60 long'. The 'Exon 60 long' gel shows bands for lanes P, P, K, K. Below the gels, the DNA sequence is shown: G C A C A C A G A G C T T C G A G G A A A T T C C C C T T G A A A G A G A A C G. A 16-nucleotide deletion is indicated. Another sequence is shown: G C A C A C A G A G C T T C G A A A G A G A A C G T G, with an insertion of 'AG' indicated. The mutation is labeled as c.8938_8953del16insAG.

| DMD | Prenatální vyšetření | z toho pozitivní | Postnatální vyšetření | z toho pozitivní | z toho pozitivní do 19 let | |
|---------------|----------------------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|------------|
| 2010 | 11 | 4 | 88 | 24 | 13 | 27% |
| 2009 | 9 | 2 | 128 | 35 | 15 | 27% |
| 2008 | 4 | 2 | 99 | 30 | 13 | 30% |
| 2007 | 1 | 0 | 148 | 40 | 19 | 27% |
| 2006 | 3 | 2 | 130 | 33 | 13 | 25% |
| Průměr | 5,6 | 2 | 118,6 | 32,4 | 14,6 | 27% |

Poděkování

Dr. J.P. Schouten

Dr. A. Wallace

MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Mgr. Zuzana Mušová

Doc. MUDr. Taťána Maříková, CSc.

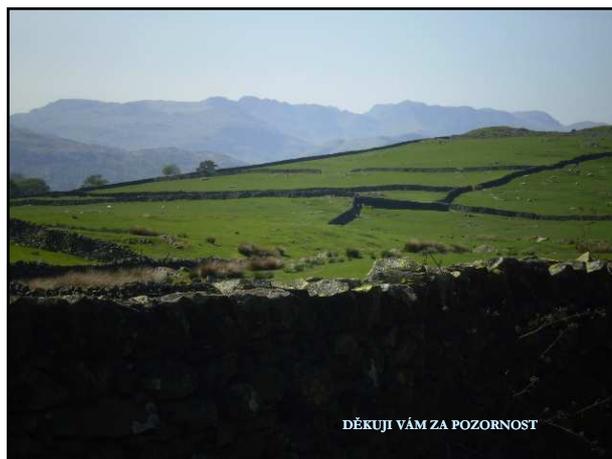
MUDr. Josef Kraus, CSc.

MUDr. Jana Haberlová

MUDr. Radim Mazanec, PhD.

Prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc.

MZO 00064203



DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST