

Molekularna genetika neuromuskularnih bolesti



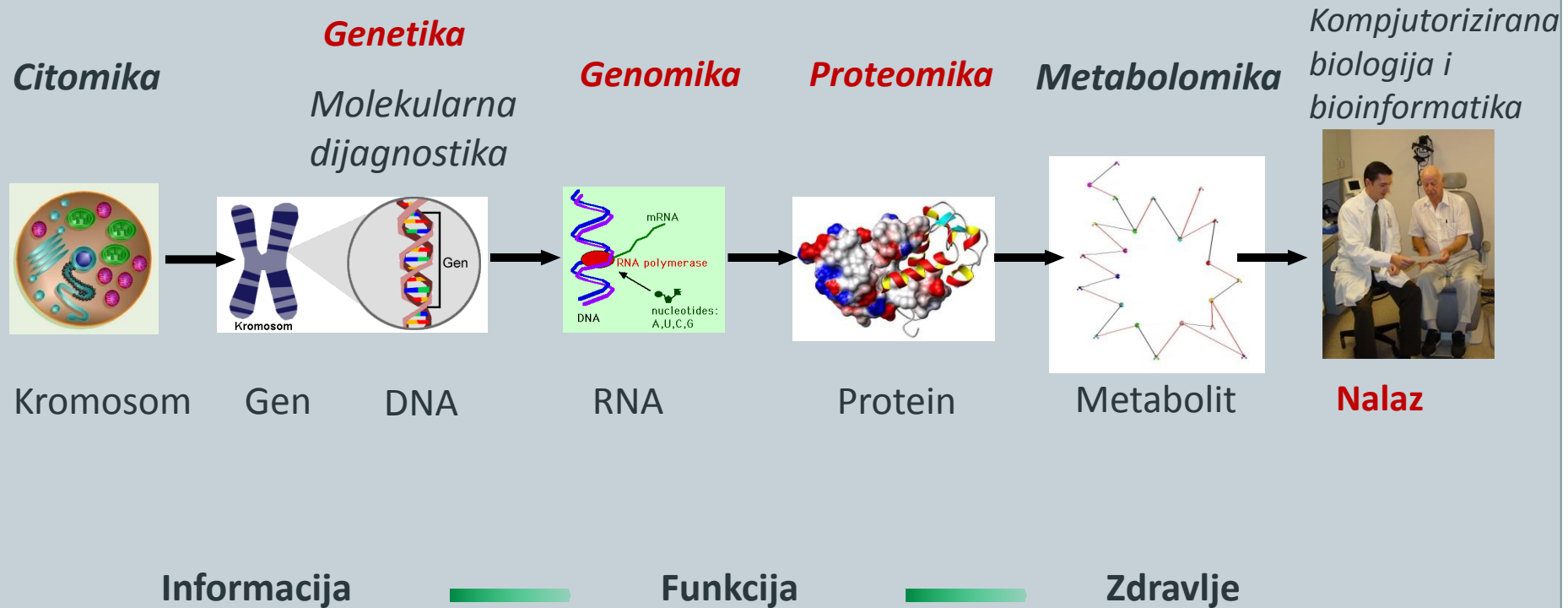
JADRANKA SERTIĆ

MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
KATEDRA ZA MEDICINSKU KEMIJU,
BIOKEMIJU I KLINIČKU KEMIJU

I

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
KLINIČKI ZAVOD ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU
KLINIČKA JEDINICA ZA MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU

Genom - nova epoha u laboratorijskoj dijagnostici i medicini



SVIJET "OMIKA"

Sekvenciranje gena

Proteinski mikropostroj

GENOMIKA

PROTEOMIKA

Transkriptomika

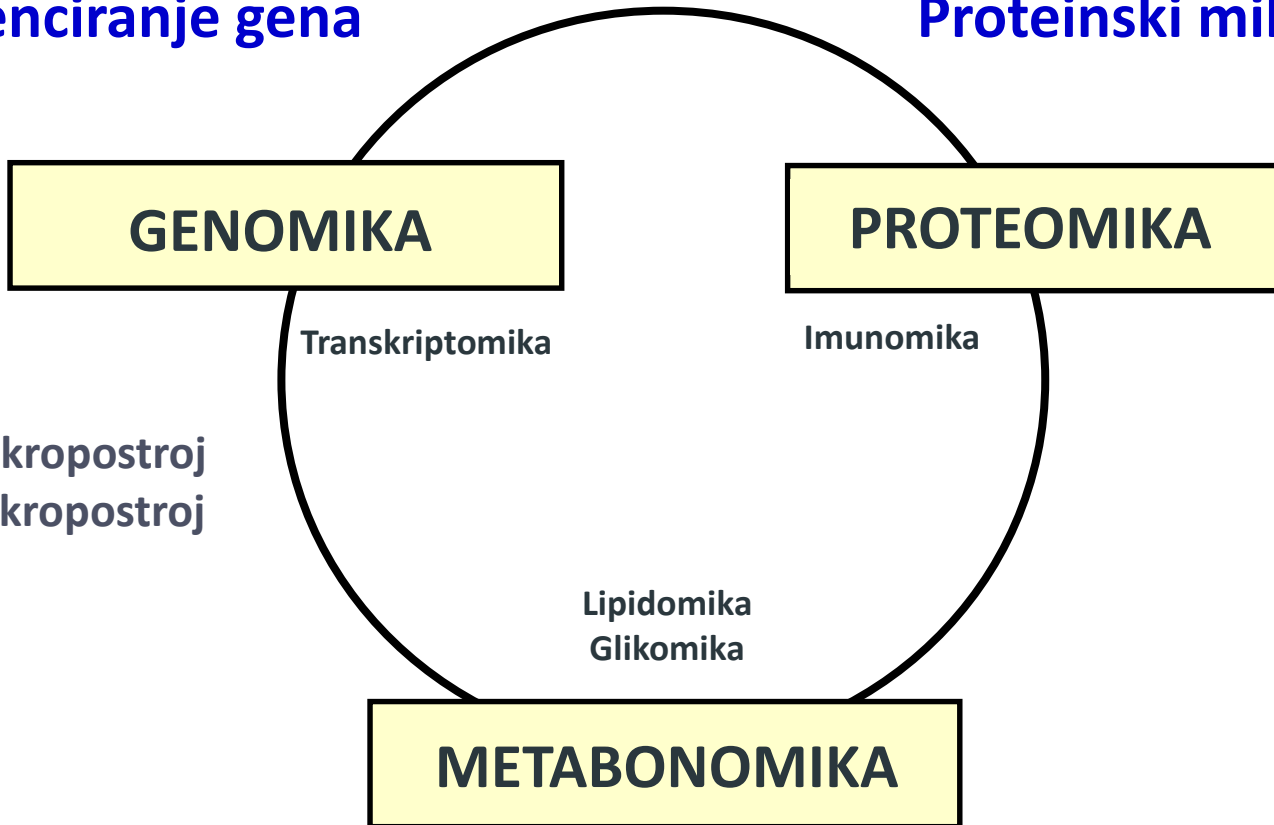
Imunomika

DNA-mikropostroj
RNA-mikropostroj

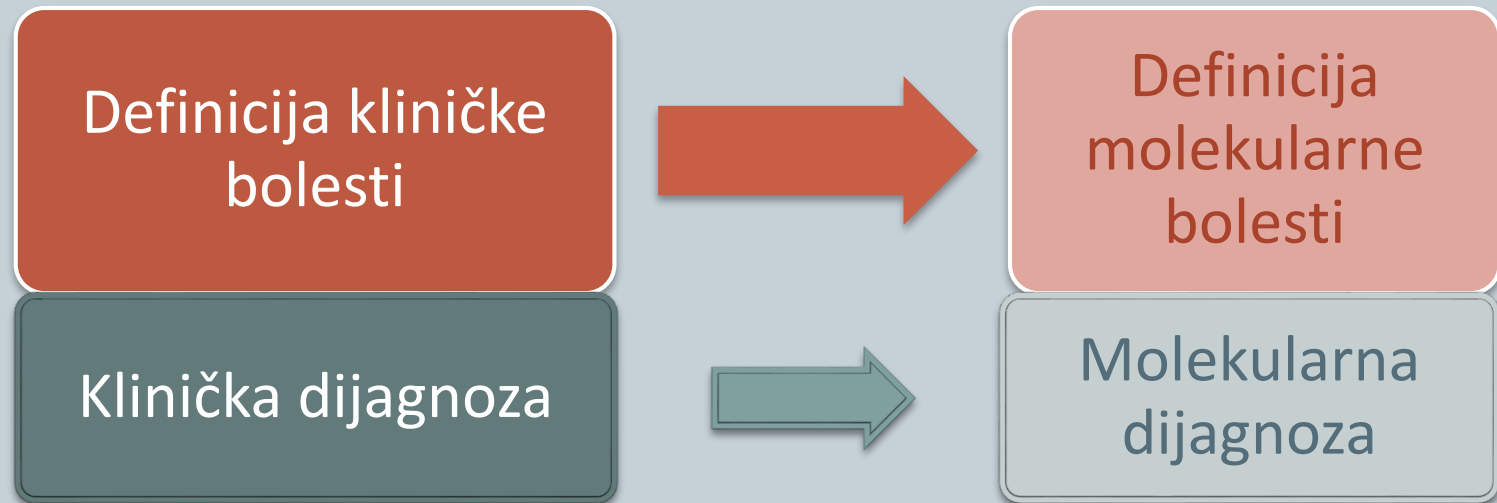
Lipidomika
Glikomika

METABONOMIKA

LC-MS/MS



Molekularna osnova bolesti



- Suradnja i harmonizacija unutar uključenih zemalja Europe
- Nasljedne bolesti
- Zakonodavni okviri, smjernice
- Licenciranje, certifikacija, akreditacija
- Sudjelovanje u vanjskoj kontroli kvalitete
- Provođenje vanjske kontrole kakvoće

Baza podataka o genetičkim laboratorijima i pretragama te kontrolama kvalitete u Europi i Hrvatskoj



www.eurogentest.org

EuroGentest - Genetic testing in Europe - Windows Internet Explorer

Address bar: http://www.eurogentest.org/web/qa/basic.xhtml?q=Croatia

Search bar: EuroGentest - Genetic testing in Europe

Navigation: Home, Contact us, Help, Search

Username: Password: Log on Save Register Forgotten Password?

EuroGentest Harmonizing genetic testing across Europe

Navigation: About Us, What Can We Offer?, Databases, Lab Quality, New Technologies, Public Health, Education, Ethics & Legal, Guidelines, Events, News

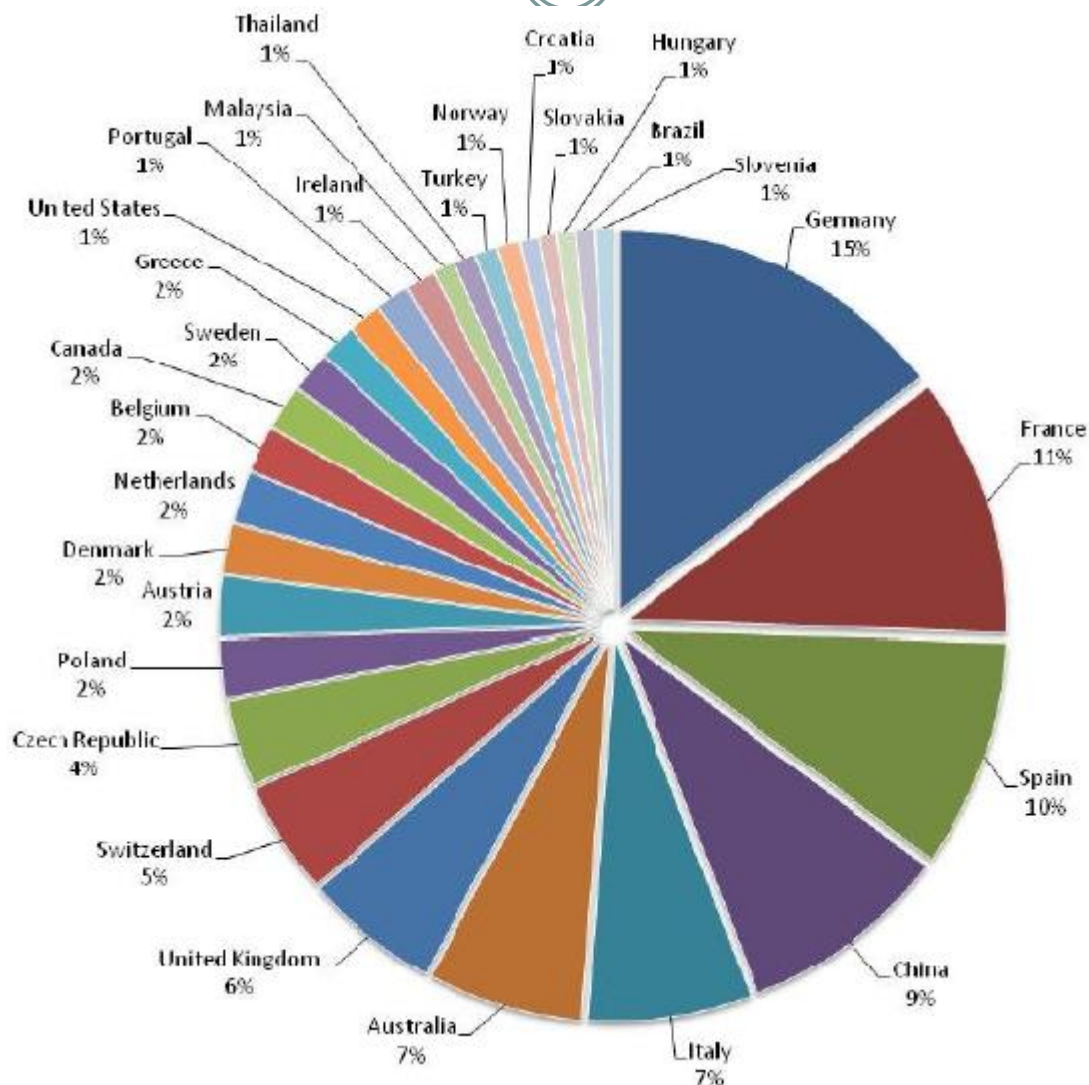
QAu ▲	Country	City	Laboratory	Institution
▲	CROATIA	ZAGREB	Laboratory for Molecular Diagnosis	Zagreb Clinical Hospital Center
	CROATIA	SPLIT	Laboratory for Human Genetics Split	Clinical Hospital Split, Pediatrics Clinic, Clinical Departement for Child Haematology, Oncology, Imunology and Medical Genetics

Programi vanjske procjene kvalitete DNA pretraga u organizaciji EMQN / smjernice

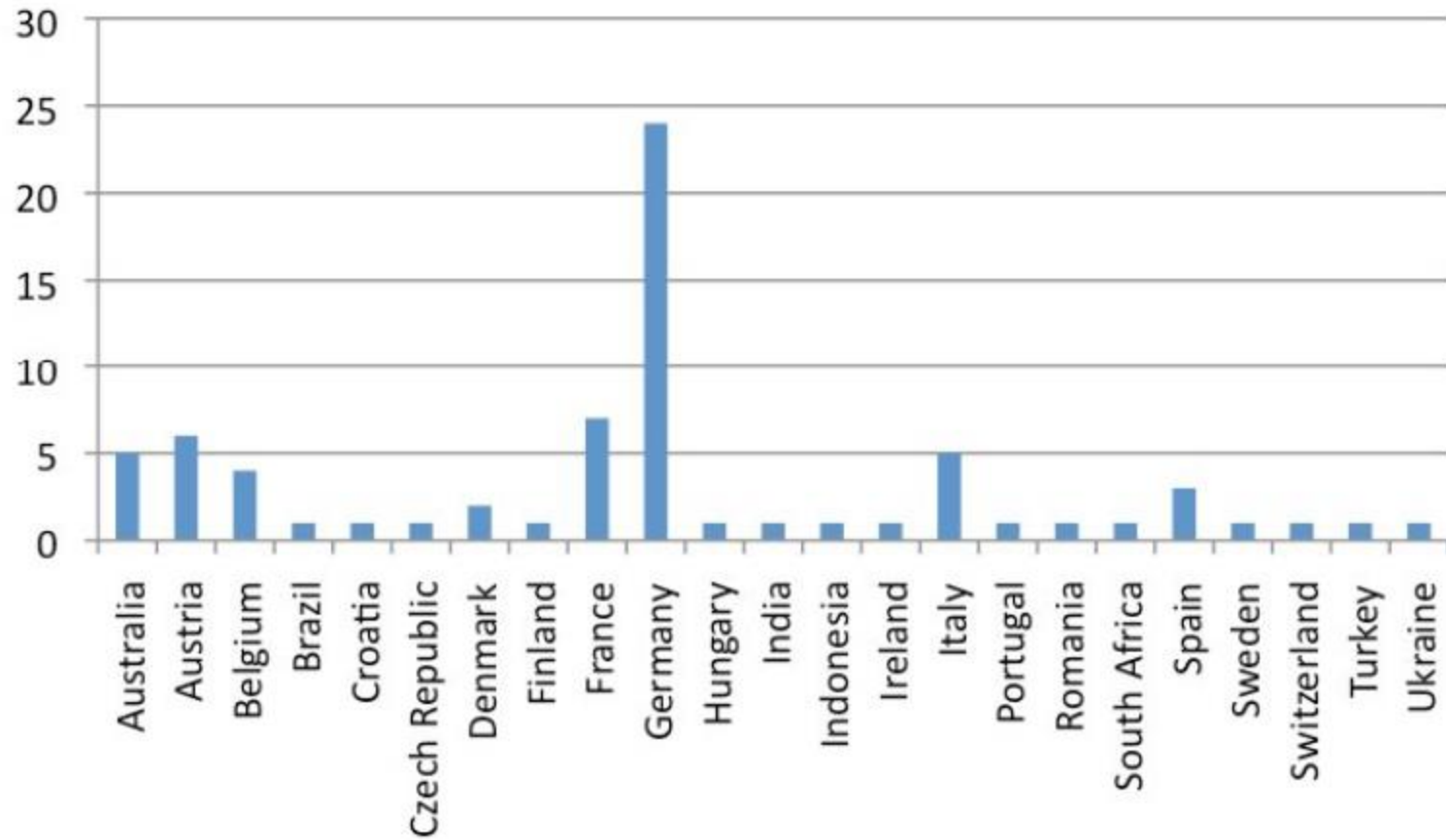


- Charcot Marie Tooth
- **Mišićna distrofija DMD/BMD**
- Bolest fragilnog X
- Friedreichova ataksija
- Sindrom Prader Willi/Angelman
- Spinocerebelarna ataksija
- **Spinalna mišićna atrofija**
- **Miotonična distrofija MD1/MD2**
- Huntingtonova bolest
- Wilsonova bolest

Sudjelovanje u EQA shemi po zemlji (2012.g.)



DMD - EMQN u 2012.g.



Certificate of Participation

11

This is to certify that:

Klinički bolnički centar Zagreb
Medical Intertrade d.o.o.
Dr. Franje Tuđmana 3
Sveta Nedelja
10431
Croatia

Participated in 2011 in the following European Molecular Genetics Quality Network external assessment schemes:


SCHEME	MEAN GENOTYPING SCORES	
	Laboratory	Scheme (all laboratories)
Y-Chromosome microdeletions	2.00	1.97
Charcot-Marie-Tooth disease	2.00	1.99
Myotonic Dystrophy	1.92	1.94
Duchenne and Becker Muscular Dystrophy	2.00	1.97
Fragile-X syndrome testing (FULL SCHEME)	2.00	1.95
Friedreich ataxia	2.00	1.99
Huntington disease	2.00	1.98
Hereditary Haemochromatosis	2.00	1.95
Spinocerebellar ataxia's	2.00	1.87
Spinal Muscular Atrophy	2.00	1.97
Wilson's disease	2.00	1.97

Poor performance criteria:
Score ≤ 1.60 genotyping

Key:
NRS - No reports sent to EMQN; WD - withdrew from scheme;
DNA sequencing quality only scheme (QUAL) not scored - all other schemes out of 2.00

Signed by:


Dr Rob Ellis
EMQN Co-ordinator

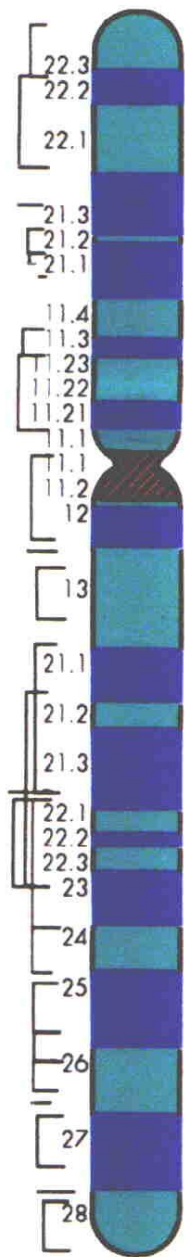

Dr Simon Patton
EMQN Executive Administrator

EMQN is a not for profit organisation which provides external quality assessment schemes for molecular genetic testing.
EMQN is co-ordinated from the National Genetics Reference Laboratory (Manchester), St Mary's Hospital, Manchester, UK.

155

Participated in 2011 in the following European Molecular Genetics Quality Network external assessment schemes:

SCHEME	MEAN GENOTYPING SCORES	
	Laboratory	Scheme (all laboratories)
Y-Chromosome microdeletions	2.00	1.97
Charcot-Marie-Tooth disease	2.00	1.99
Myotonic Dystrophy	1.92	1.94
Duchenne and Becker Muscular Dystrophy	2.00	1.97
Fragile-X syndrome testing (FULL SCHEME)	2.00	1.95
Friedreich ataxia	2.00	1.99
Huntington disease	2.00	1.98
Hereditary Haemochromatosis	2.00	1.95
Spinocerebellar ataxia's	2.00	1.87
Spinal Muscular Atrophy	2.00	1.97
Wilson's disease	2.00	1.97



DMD/BMD, MIM#310200

GENSKI DEFEKT

mutacije u genu za distrofin

defektabilni distrofin

poprečno prugaste, srčane i glatke mišiće

progresivne slabosti mišića

disfunkcije neurona

DMD 1 : 4000

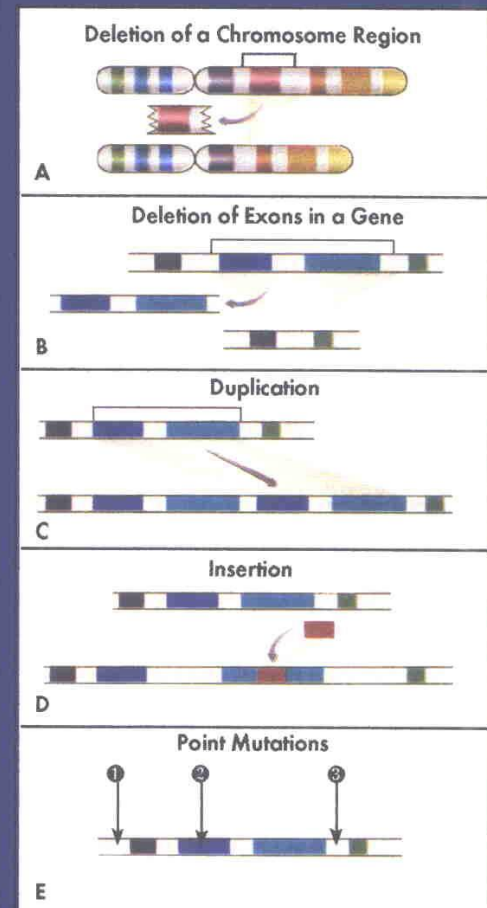
BMD 1 : 40000

Gen za distrofin

- ▶ Xp 21.2
- ▶ 23 Mb
- ▶ 79 eksona

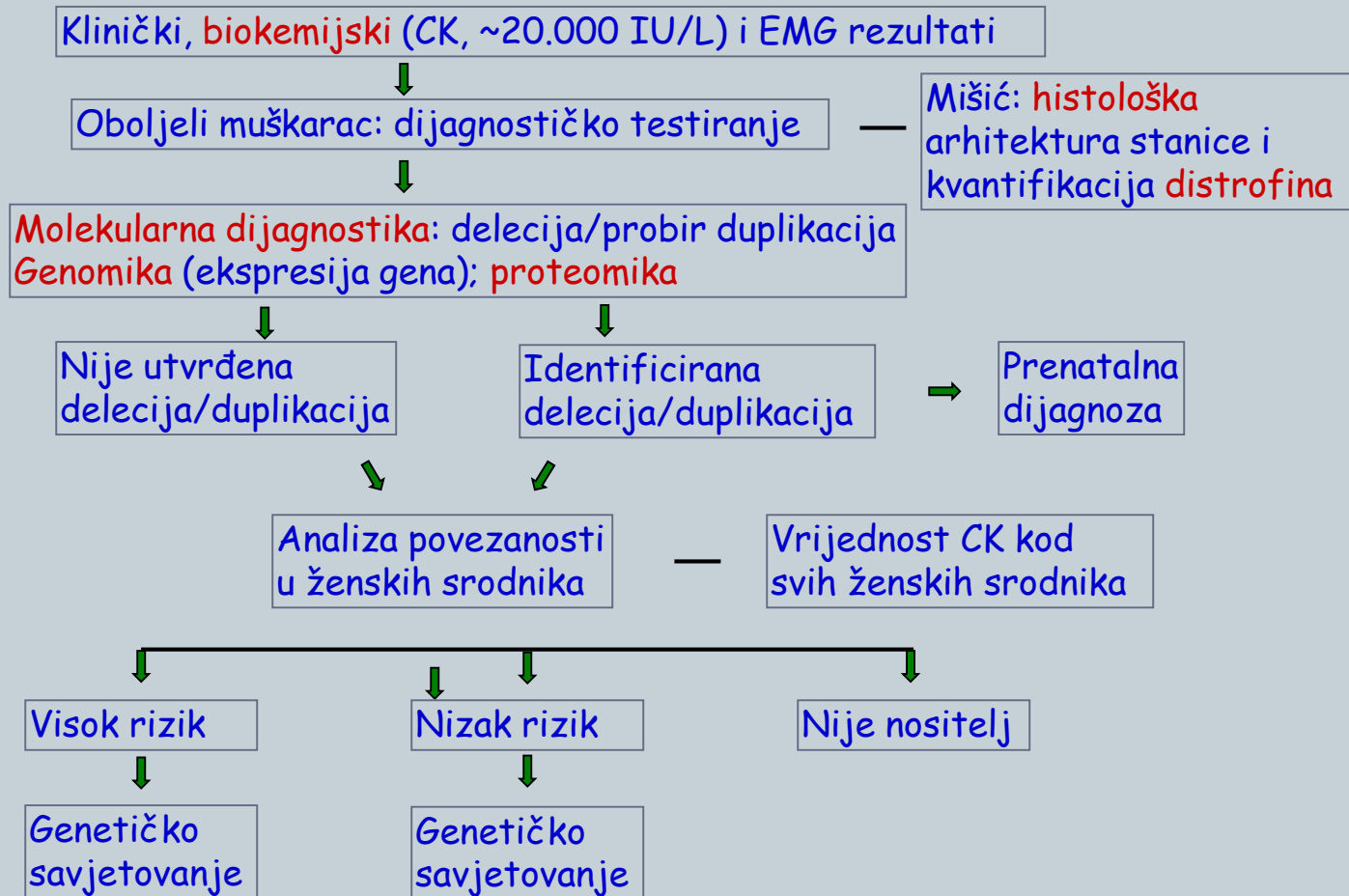
promjene u genu

- ▶▶ *delecija eksona*
(1-20, 45-53)
- ▶▶ *duplikacije*
- ▶▶ *točkaste mutacije*
- ▶▶ *ponavljajući dinukleotidi*

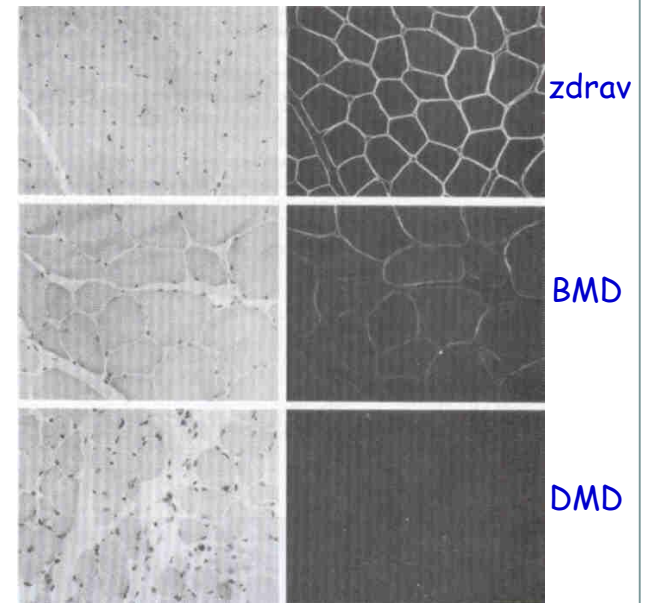
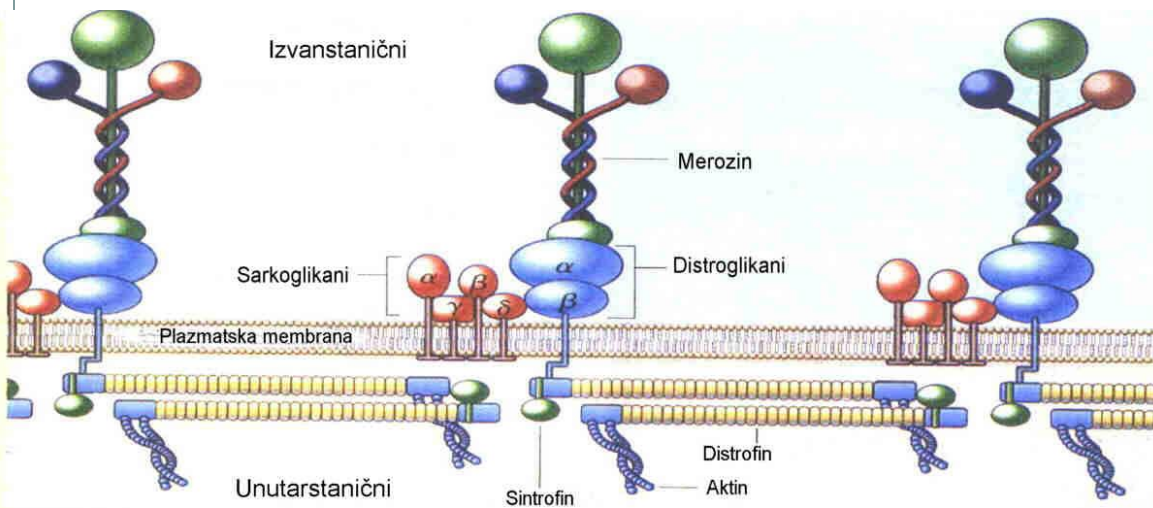


Korg B. 1995

Mišićna distrofija tipa Duchenne /smjernice



Dystrofin



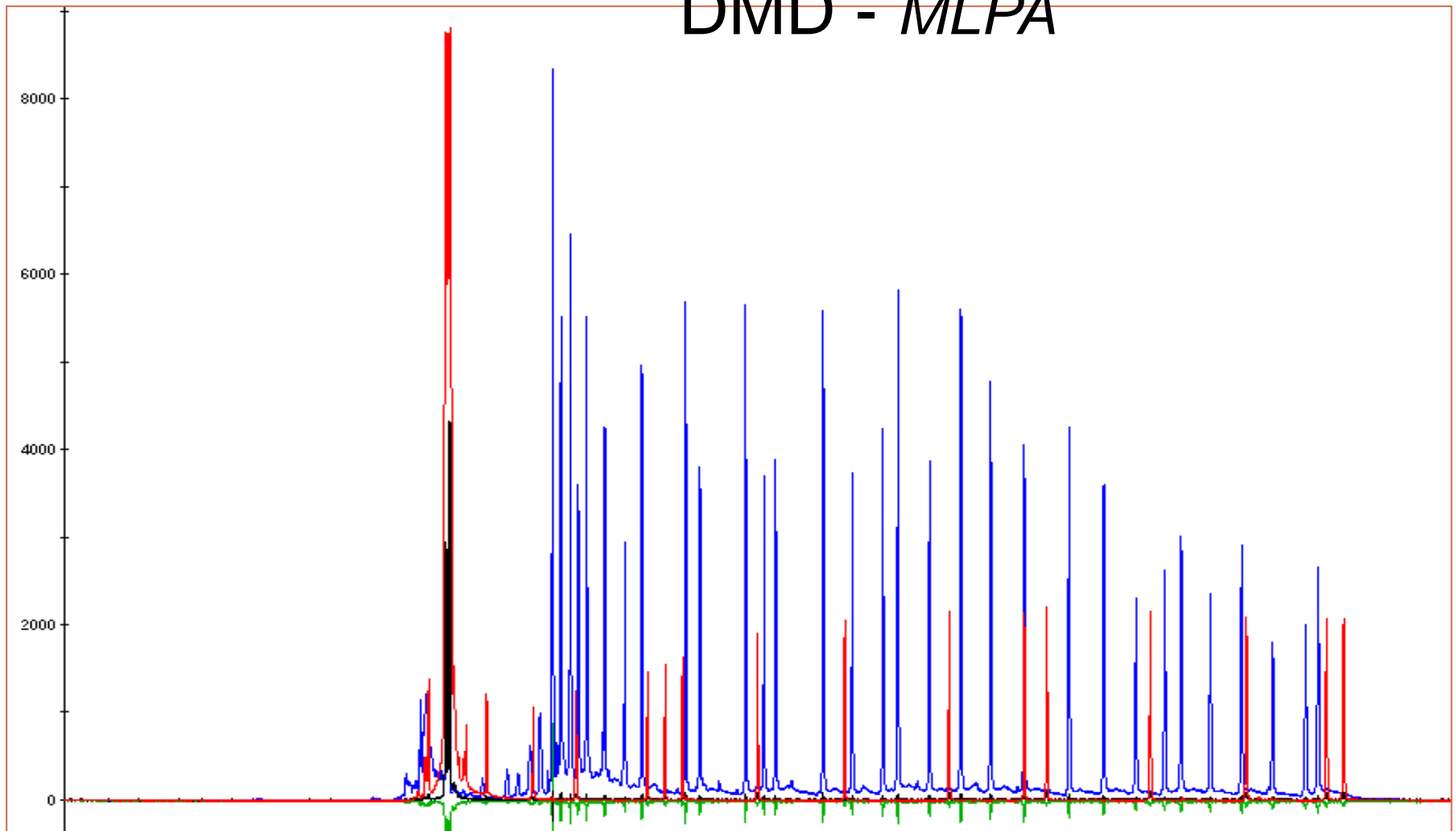
Arhitektura stanice



Analiza Western blot

Delecije eksona 4 -10, 21-30, 41-43 distrofin gena

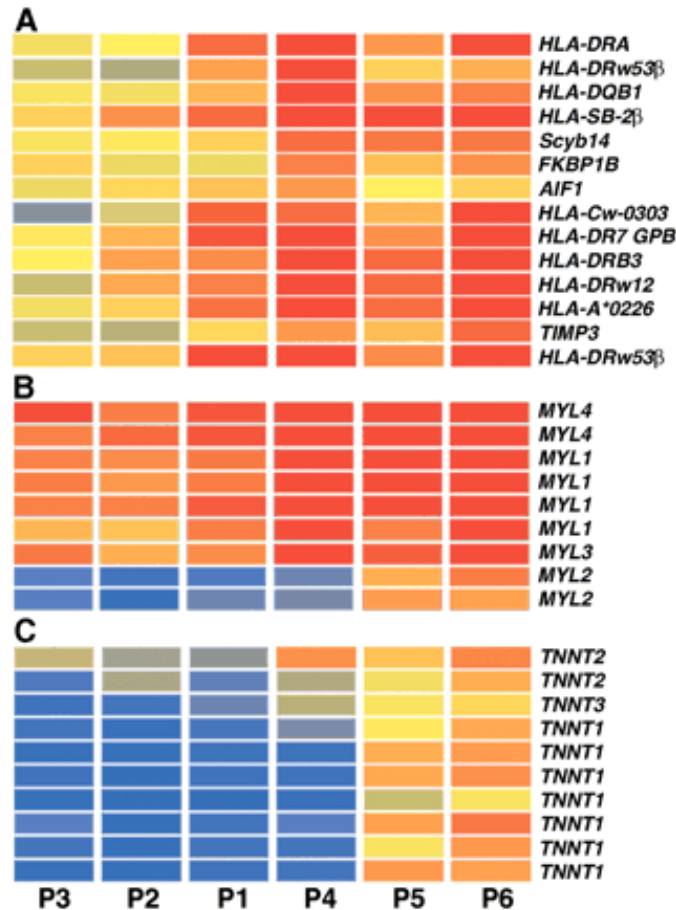
DMD - *MLPA*



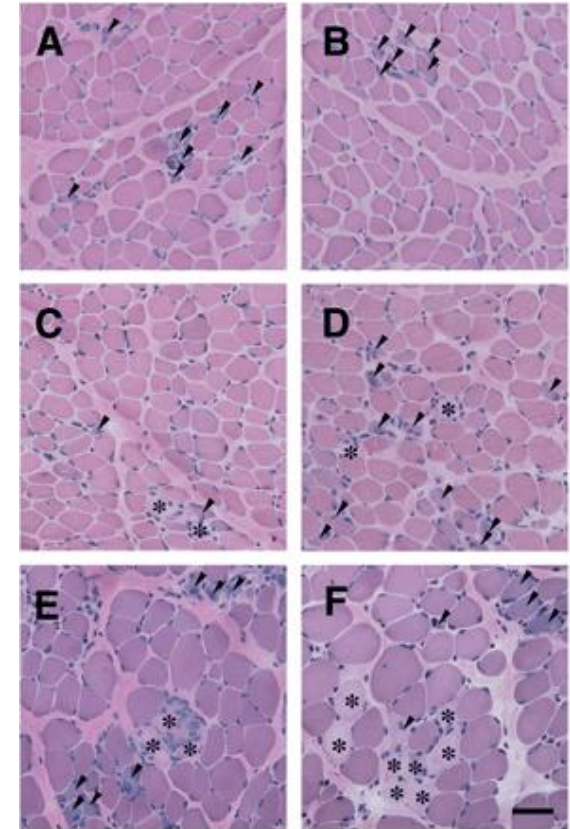
DMD: biokemijske pretrage, *microarray*-analiza i histološka analiza

CK (IU/L)

P1 18617
P2 20994
P3 24360
P4 19450
P5 14153
P6 21839

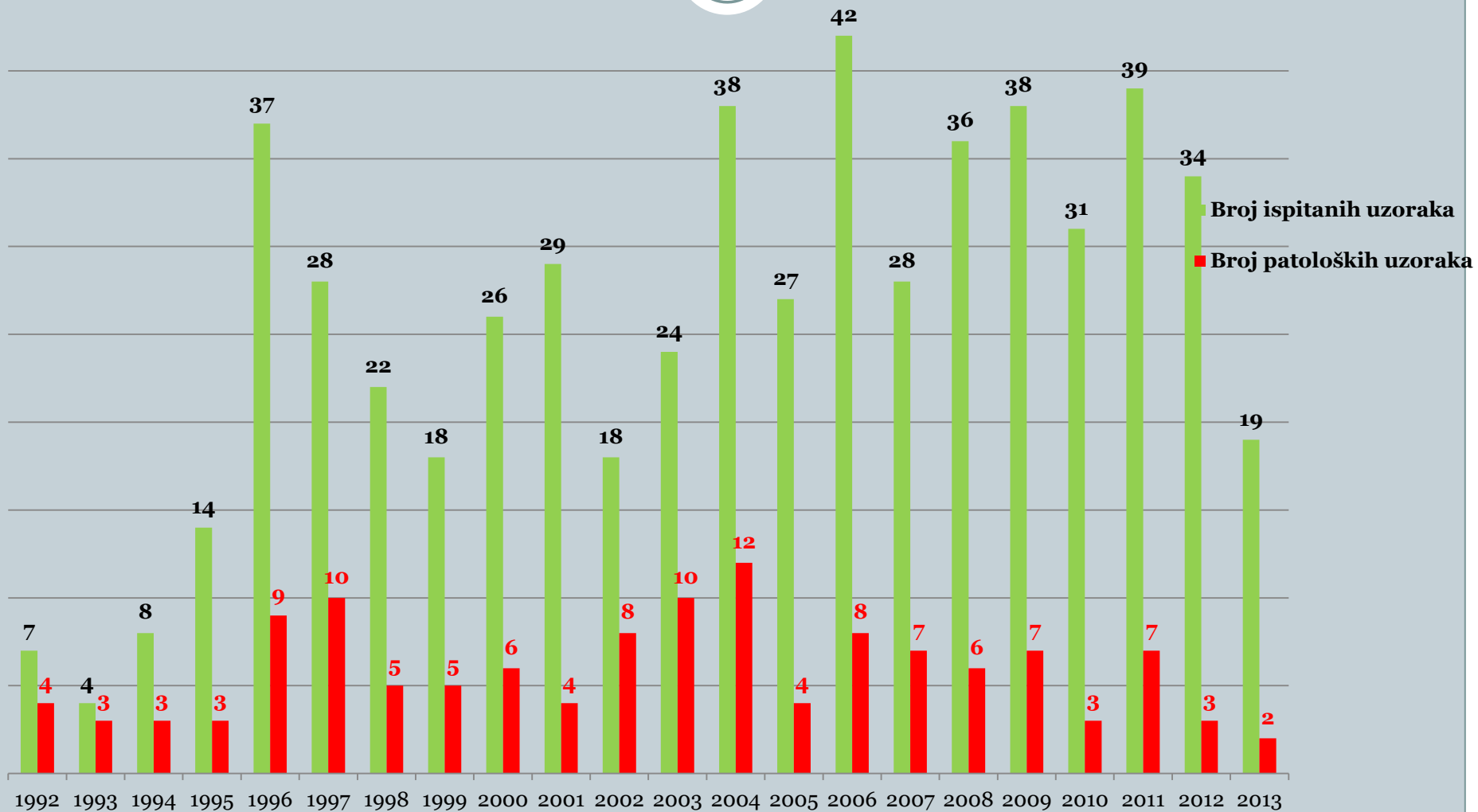


Diferencijalna ekspresija HLA-vezanih, MYL (laki lanac miozina) i TNNT (troponin T) skupina gena



Histološko bojenje skeletnog mišića DMD-bolesnika, s različitim stupnjem distrofnih promjena: nekroza (*) i regeneracija (↑)

Mišićna distrofija



DMD: strategija liječenja

Razina intervencije

Mutirani gen



Mutirana mRNA



Mutirani protein



Metabolička ili
druga biokemijska
disfunkcija



Klinički fenotip

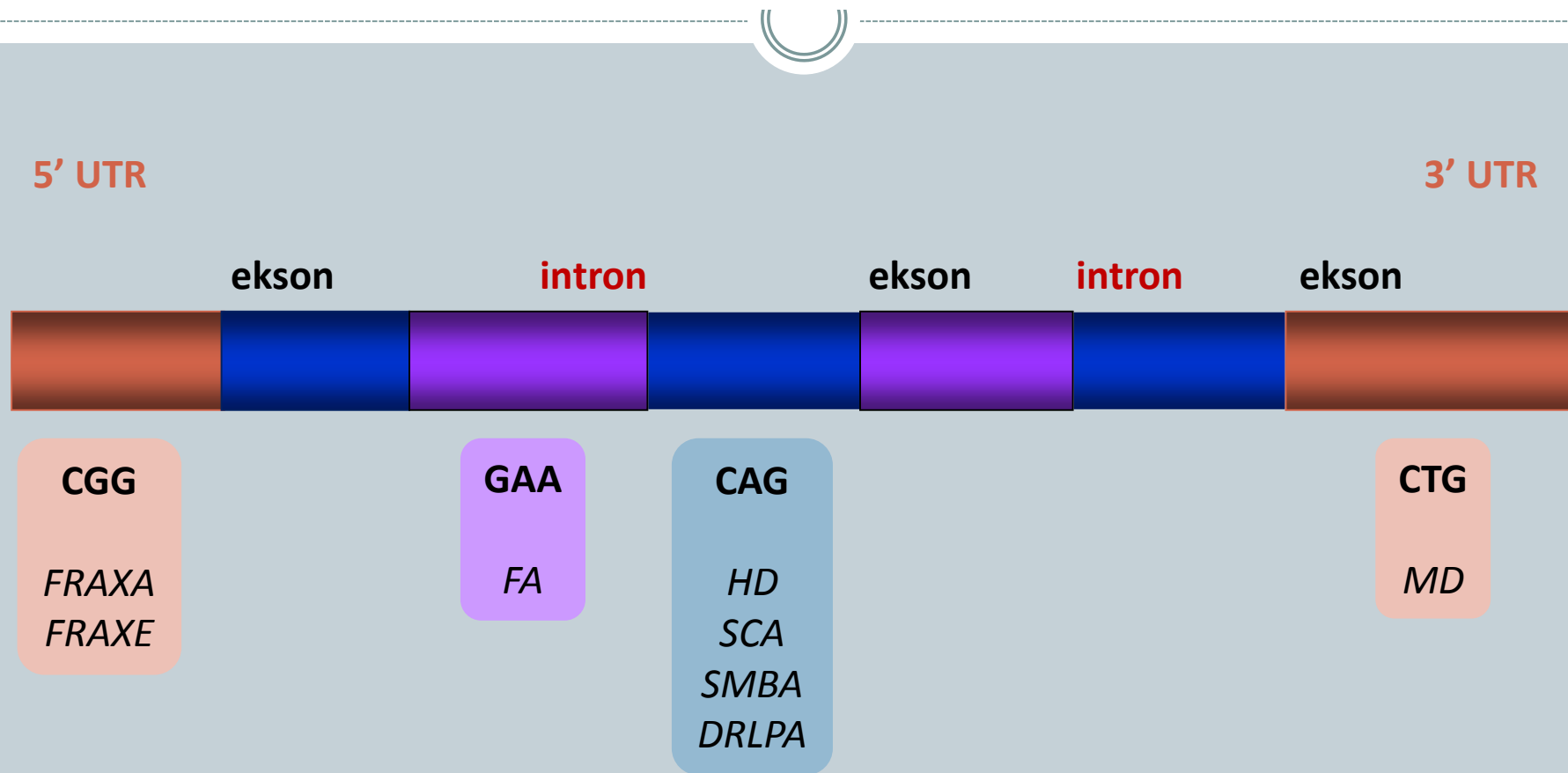


Obitelj

Strategija liječenja

- Trenutno ne postoji učinkovita terapija za mišićnu distrofiju tipa Duchenne (DMD); novije terapije su usmjerene na transformaciju DMD-fenotipa u BMD-fenotip promjenom mRNA distrofina od "out-of-frame" prema "in-frame".
- Isjecanje eksona 19 u DMD-bolesniku s delecijom eksona 20 dovodi do stvaranja "in-frame" mRNA distrofina i pozitivnog distrofina u stanicama skeletnih mišića.
- Novija istraživanja ukazuju da je moduliranje izrezivanja mRNA distrofina u skeletnim mišićima radi stvaranja "in-frame" transkripta koji kodira krnji, polufunkcionalni distrofin postupak koji može rezultirati liječenjem te bolesti.
- Opsežna analiza ekspresije gena pruža vrijedne informacije o mehanizmima degeneracije mišića, stupnju napredovanja ili prekida obnavljanja mišića, te razlikama na molekularnoj razini između bolesnika i između bolesti.
- cDNA *microarray* analiza otvara vrata za razvoj nove molekularne patologije u području miologije.
- Obnavljanje funkcije oštećenog skeletnog mišića ispituje se i sinkroniziranom vaskulogenezom, miogenezom i neurogenezom pomoću matičnih stanica

Poremećaji slijeda tripleta

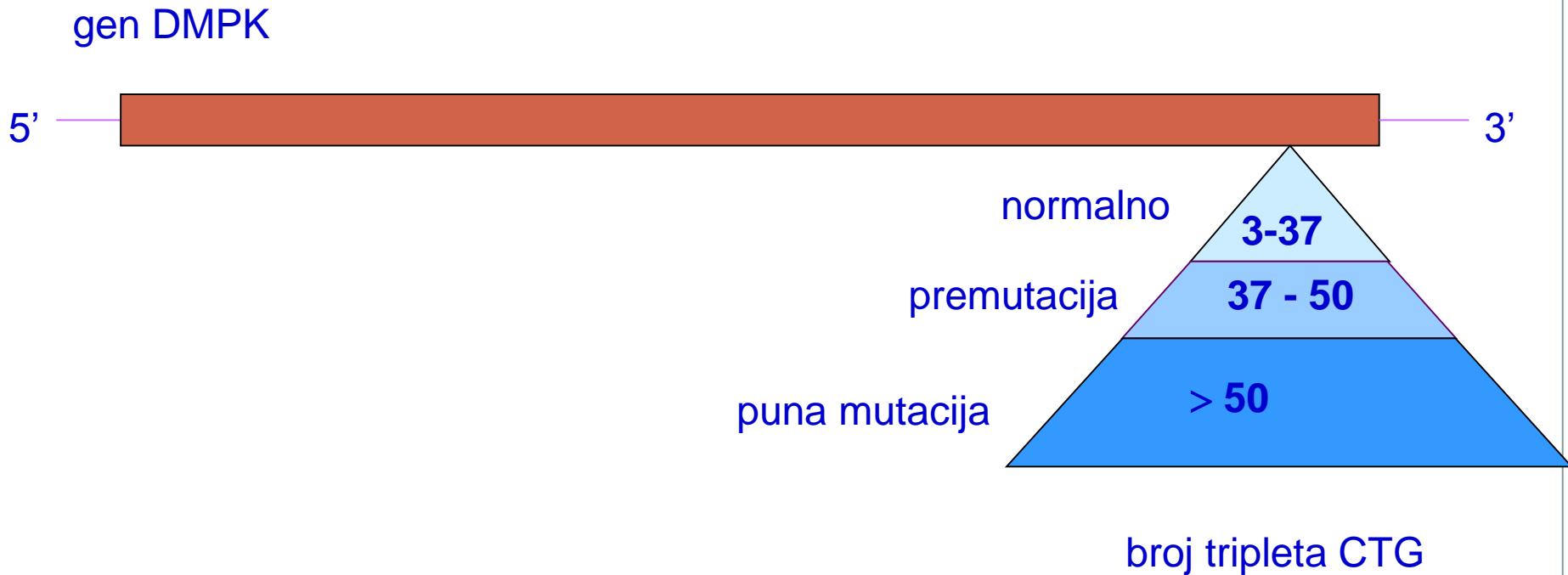


Miotonična distrofija tipa 1 (MD1)



- višesistemska progresivna neuromuskulatorna bolest
- varijabilna klinička slika:
 - najčešće uključuje miotoniju, progresivnu mišićnu distrofiju i kataraktu
- pojavnost: 3-15 na 100.000 u europskoj populaciji
- mutacija odgovorna za nastanak MD1 otkrivena 1992. godine
- produljenje slijeda tripleta CTG unutar 3' neprevodivog odsječka gena DMPK (engl. *Dystrophia Myotonica Protein Kinase Gene*)

Shematski prikaz mutacije odgovorne za nastanak MD1



Protein DMPK

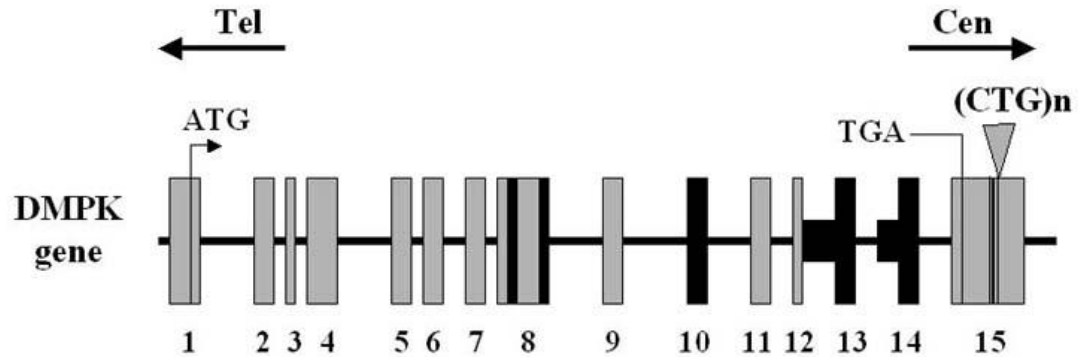


- produkt gena DMPK
- pripada skupini serin/treonin protein kinaza
- prepisivanjem i alternativnim izrezivanjem gena nastaje 7 izoformi ovog proteina (68 – 80 kDa)
- uglavnom citoplazmatski protein, prisutan u svim tkivima

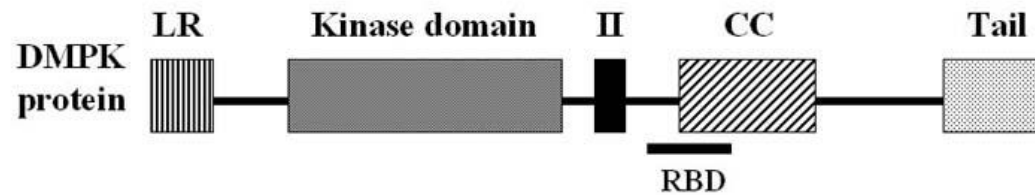
Produkt gena DMPK



A



B



Patogeneza RNA

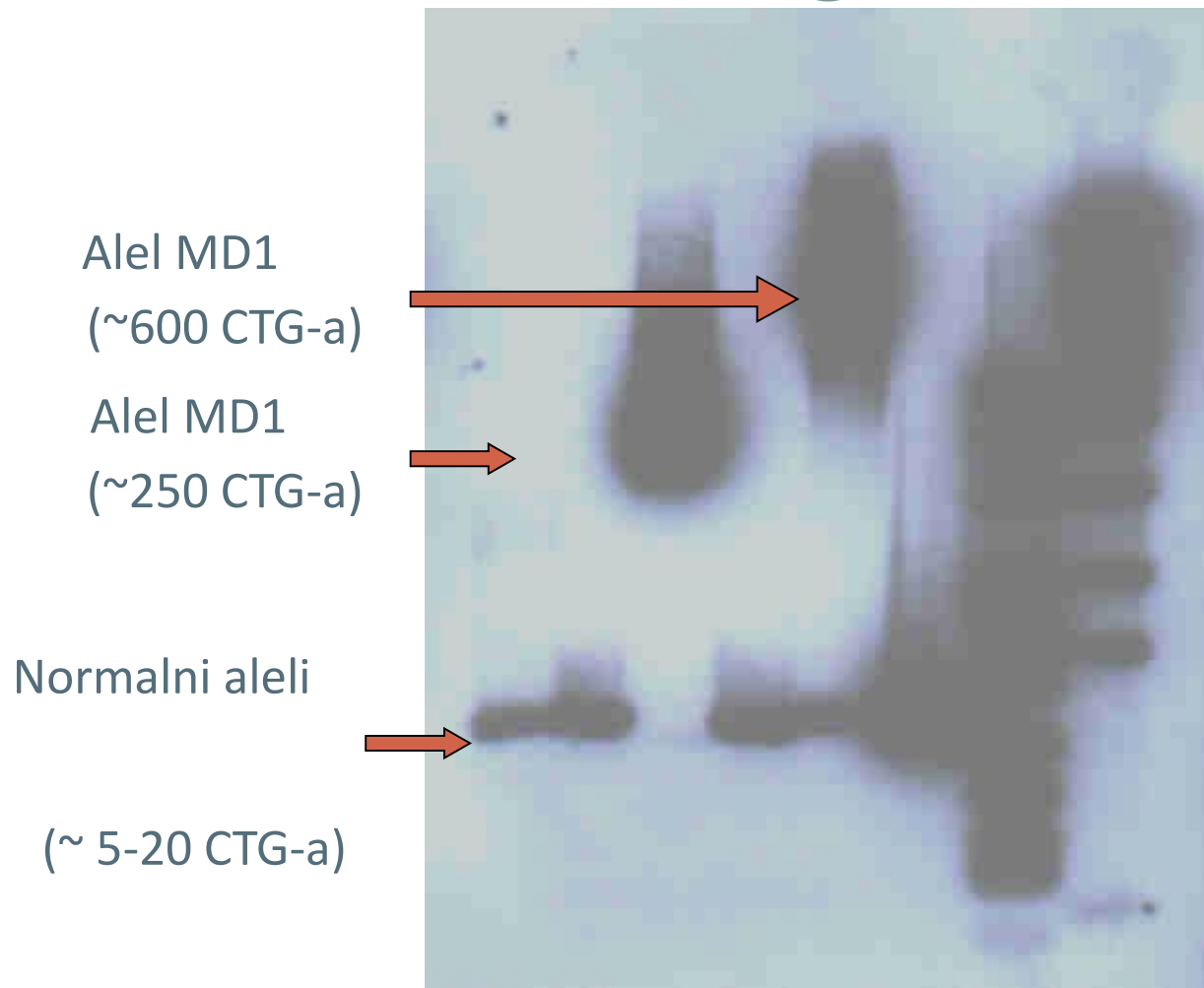
- omogućava zajedničko objašnjenje patogeneze za MD1 i MD2 (produljeni sljedovi CUG i CCUG u pre-mRNA)
- daje moguća objašnjenja za multiorganske poremećaje kod MD

Nasljeđivanje MD1



- ovisno o spolu prenositelja
- prenositelj uglavnom majka s premutacijskim alelom ili punom mutacijom
- opseg produljenja donekle korelira s težinom kliničke slike
- najopsežnija produljenja kod prirođene MD (više od ~800 CTG-a)

PCR s oligonukleotidnom hibridizacijom



MD2



- PROMM - proksimalna miotonična miopatija
- produljeni slijed CCTG unutar prvog introna gena ZNF9 (engl. Zinc Finger Protein 9) u kromosomskoj regiji 3q21
- slijed ponavljanja je dio složenog motiva $(TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n$
- broj ponavljanja kod alela MD2 ~ 75 do 11000
- prepisivanjem alela MD2 nastaju pre-mRNA s produljenim slijedom CCUG

SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA

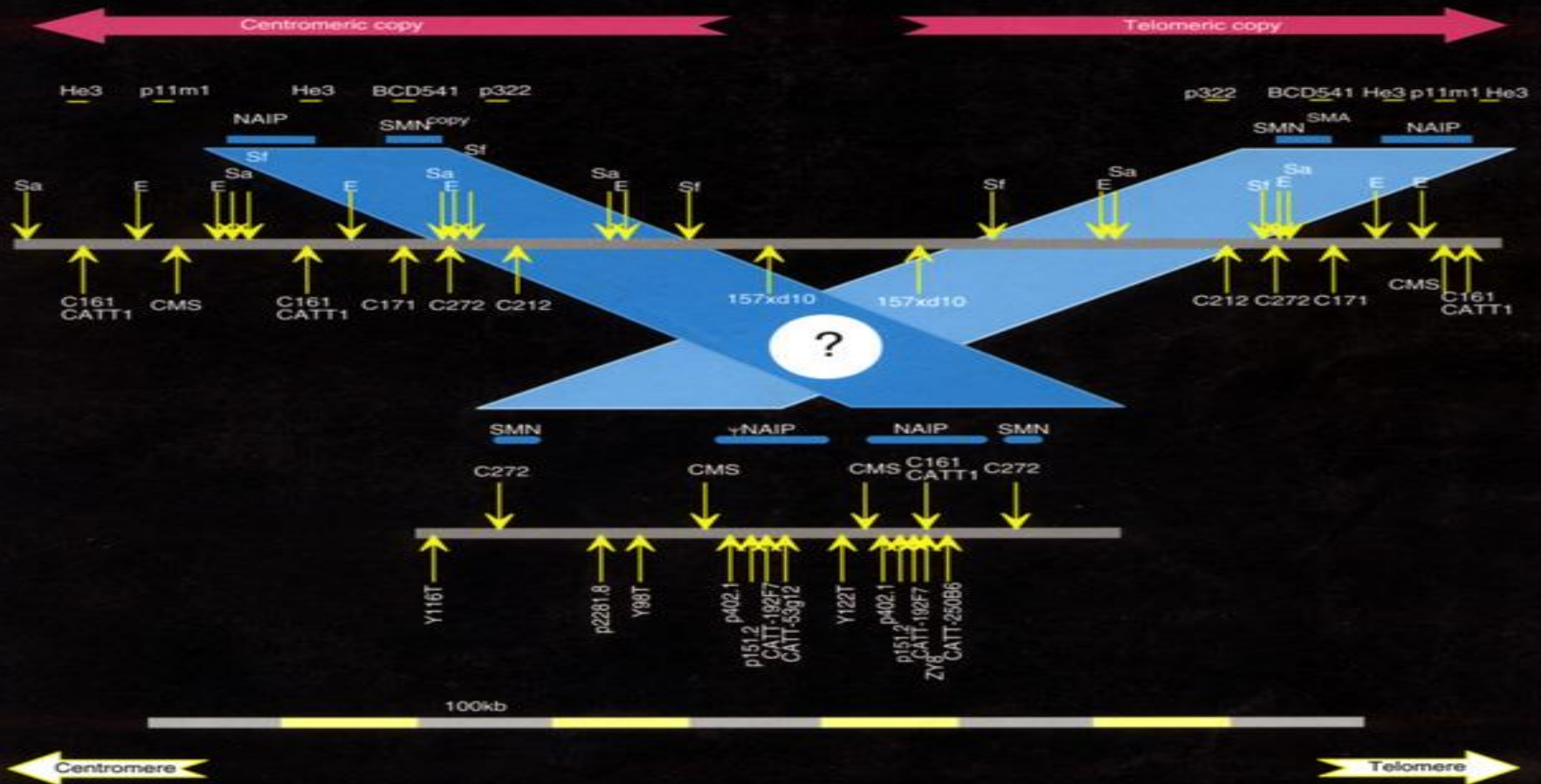


- druga najčešća nasljedna neuromuskularna bolest s incidencijom od 1: 5000-25000
- jedna od 40-ero osoba nosi mutaciju gena koji se nalazi na 5. kromosomu
- genski lokus za tri najčešća tipa spinalne mišićne atrofije nalazi se na 5q 11-13

Cell

Volume 80 Number 1

January 13, 1995

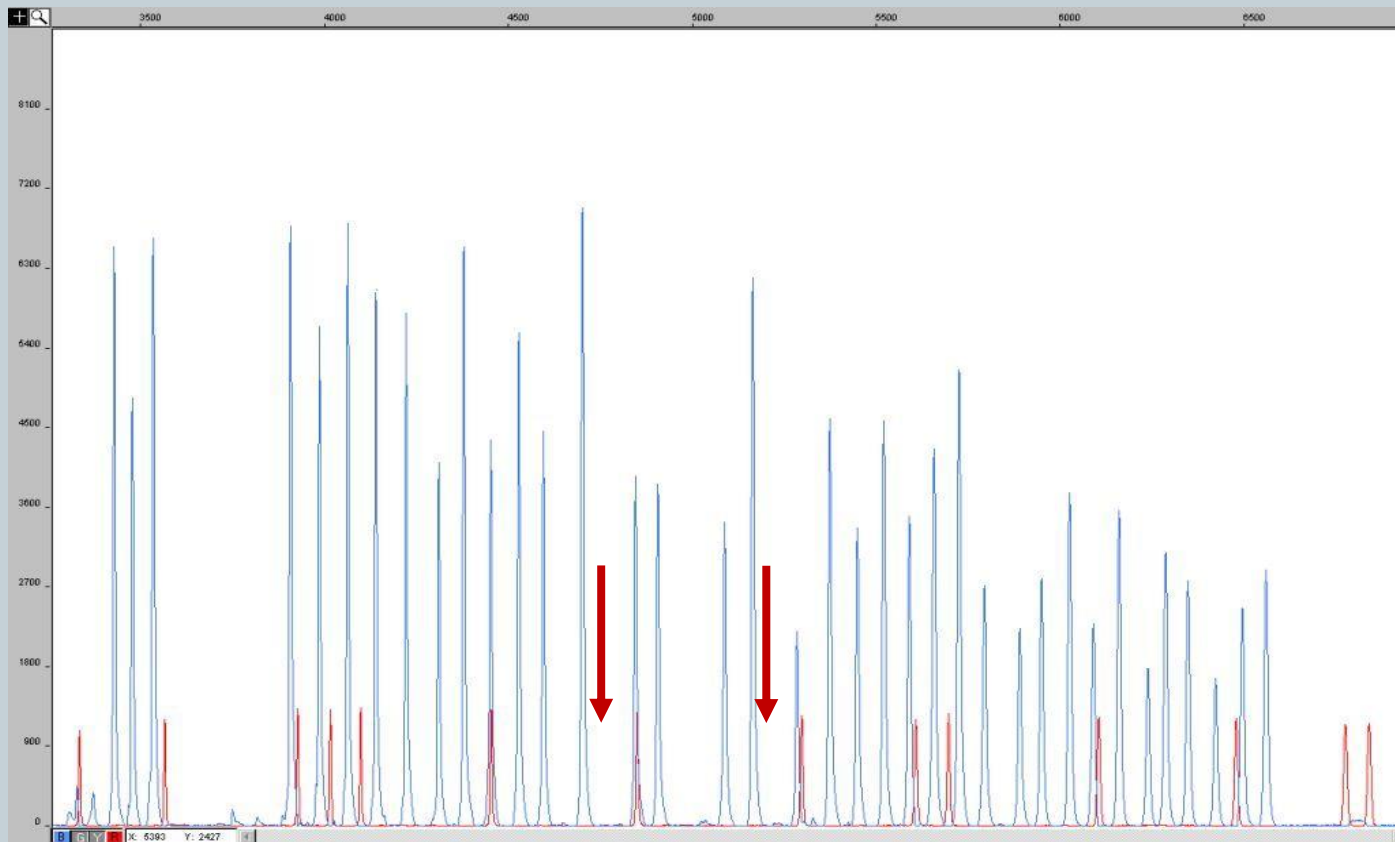


Genes Associated with Spinal Muscular Atrophy

SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA



MLPA/kapilarna elektroforeza



Uzorak s **HOMOZIGOTNOM DELECIJOM:**

0 kopija eksona 7 i 8 u genu SMN1

A. Merkle, Lj. Juričić 2011.

*"Ranije smo mislili da nam je sudbina u zvijezdama:
sada znamo da nam je sudbina u velikoj mjeri i u
genima..."*

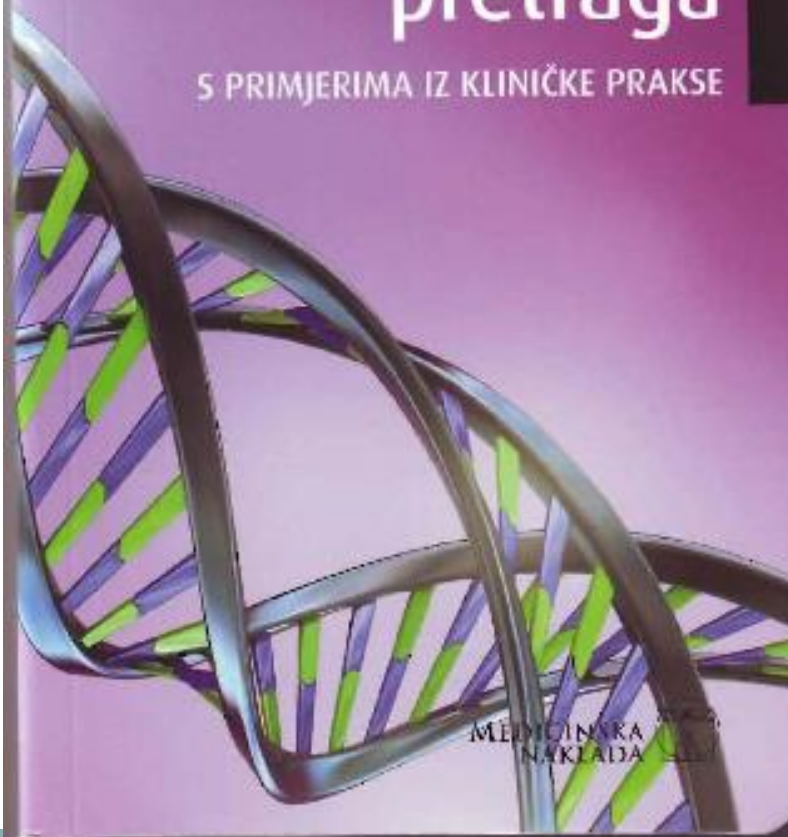
James Watson



JADRANKA SERTIĆ I SURADNICI

KATALOG dijagnostičkih laboratorijskih pretraga

S PRIMJERIMA IZ KLINIČKE PRAKSE



MEDICINSKA
NAKLADA

HVALA NA POZORNOSTI!

