

Komplexní diagnostika Duchennovy / Beckerovy svalové dystrofie



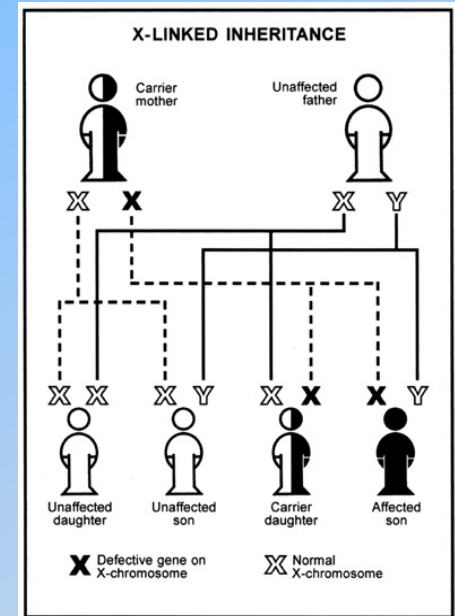
Hrubá Z., Sedláčková J., Fajkusová L.

Centrum molekulární biologie a genové terapie

FN Brno

DMD/BMD

- 🔍 nervosvalové degenerativní onemocnění
- 🔍 X - recesivní dědičnost
 - postižení jsou jedinci mužského pohlaví
 - ženy - přenašečky



DMD - incidence 1:3 500 živě narozených chlapců

- nejčastější typ svalové dystrofie

BMD - lehčí forma onemocnění

- incidence 1:17 000 živě narozených chlapců

Projevy DMD/BMD



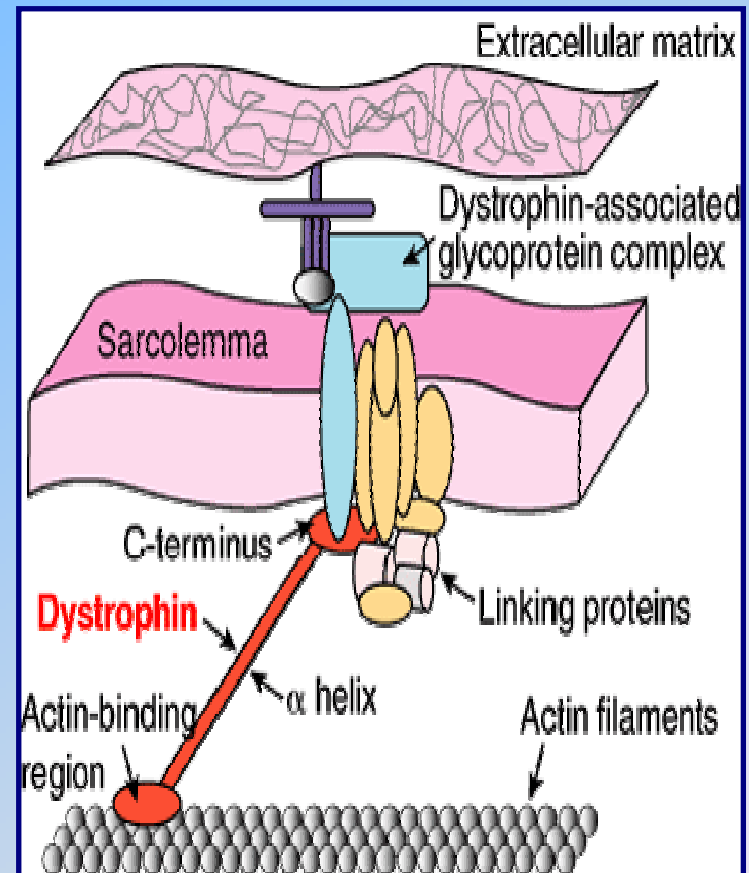
- svalová slabost - destrukce svalových vláken (postupné nahrazování svalových vláken vazivem)
- kolébavý krok, chůze po špičkách
- potíže s chůzí po schodech, během, zvedáním se ze země
- pseudohypertrofie lýtek
- nástup obtíží - mezi 2. - 5. rokem života chlapců (obtíže se zhoršují s věkem)
- kolem 10. roku - ztráta schopnosti samostatné chůze, upoutání na invalidní vozík
- následují dýchací potíže, degenerace srdečního svalu
- úmrtí kolem 20. roku
- BMD - podobné projevy jako DMD, pozdější nástup příznaků (mezi 5. - 12. rokem), celkový průběh nemoci je mírnější a pomalejší

Klinické příznaky DMD/BMD

- zvýšená hodnota enzymu fosfokreatinkinázy v séru - hladina je 50 - 100 x vyšší než u zdravých lidí (zvýšenou hladinu mají také přenašečky DMD)
- většinou abnormální EKG
- asi 30% pacientů má mírně snížené IQ
- histologické preparáty ze svalové biopsie – změny průměru svalových vláken, zvětšení tukové a vazivové tkáně
- imunohistochemická analýza pomocí protilátek proti jednotlivým doménám dystrofinu vykazuje nepřítomnost dystrofinu (u pacientů s DMD) nebo sníženou hladinu dystrofinu (u BMD pacientů a u přenašeček)

Dystrofinový gen a jeho produkt

- lokalizace - chromozóm Xp 21.2
- velikost cca 2,3 Mb (79 exonů)
- přepisem a sestřihem dystrofinového genu ve svalech vzniká mRNA o velikosti 14 kb
- translací mRNA vzniká protein dystrofin o velikosti 3 685 AK a molekulové hmotnosti 427 kD
- dystrofin - na vnitřní straně cytoplazmatické membrány kosterních, srdečních i hladkých svalových bb. - s dalšími proteiny a glykoproteiny vytváří komplex spojující extracelulární matrix s vlákny cytoskeletálního f-aktinu



Mutace v dystrofinovém genu

- ▶ 65% delece
- ▶ 5% duplikace
- ▶ 30% bodové mutace, malé delece a inserce



mutace způsobující posun čtecího rámce, vznik předčasného terminačního kodonu (=> protein bez C-koncové oblasti) => **fenotyp DMD**

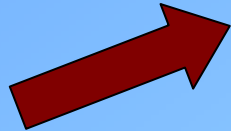


vnitřní delece a duplikace bez posunu čtecího rámce – podle rozsahu => **fenotyp BMD** nebo intermediální typ (D/BMD)

Mutační analýza dystrofinového genu

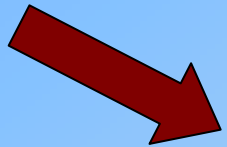
analýza na úrovni DNA

výchozí materiál: periferní krev



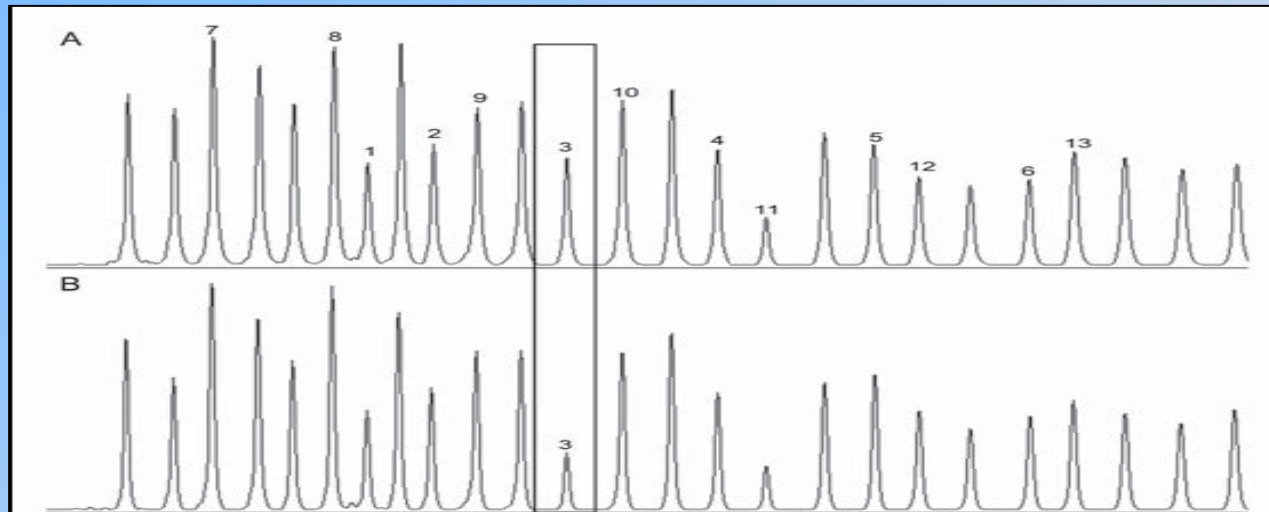
analýza na úrovni RNA

výchozí materiál: svalová biopsie



Diagnostika D/BMD na úrovni DNA

- izolace DNA z leukocytů periferní krve
- MLPA analýza (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
 - detekce delecí a duplikací



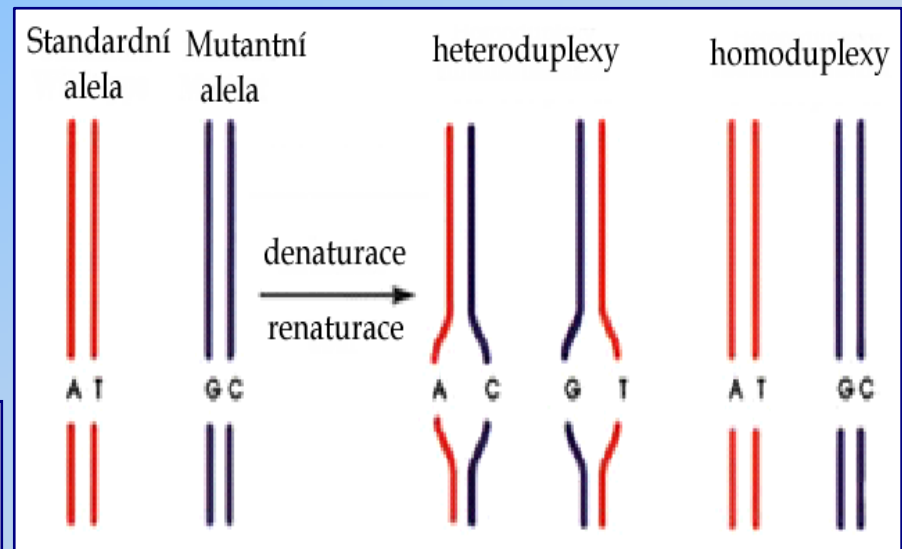
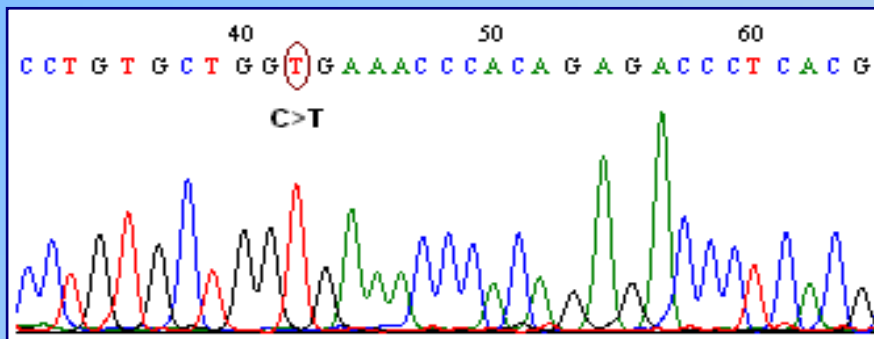
MLPA analýza negativní



- **DHPLC analýza** (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)
 - metoda založená na tvorbě heteroduplexů a jejich separaci za podmínek částečné denaturace
 - presekvenační metoda
 - pozitivní vzorky



sekvenování

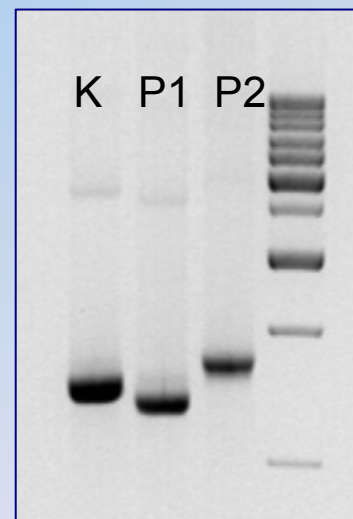


Diagnostika D/BMD na úrovni RNA

- izolace RNA ze svalových buněk
- reverzní transkripce
- PCR (mRNA dystrofinového genu rozdělena do 10 vzájemně se překrývajících úseků)
- elektroforéza

↑
délka fragmentu odlišná od standardní délky → sekvenování daného úseku (delece, duplikace, sestřihové varianty)

↓
délka fragmentu standardní → PTT → sekvenování (*nonsense* mutace)



PTT (Protein Truncation Test)

- detekce mutací vedoucích ke vzniku předčasného stop kodonu

RNA → cDNA (10 překrývajících se úseků)



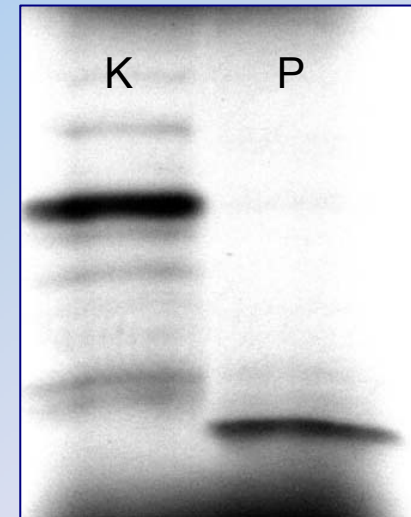
transkripce a translace *in vitro* (inkorporace radioaktivně značeného methioninu do proteinu)



elektroforéza proteinů (PAGE)



autoradiografie

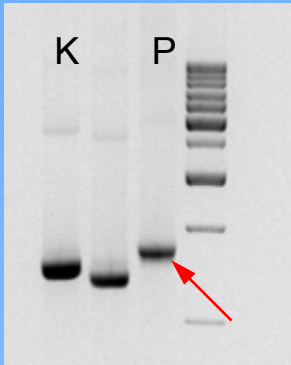


Výhody RNA diagnostiky

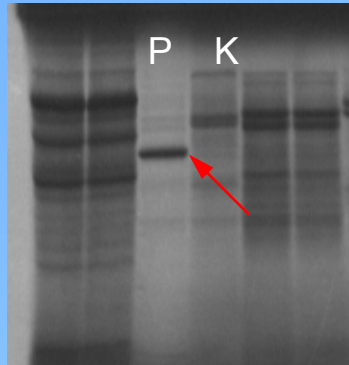
- rychlá detekce *nonsense* mutací
- detekce sestřihových variant - mutace hluboko v intronu (nenalezneme ji při analýze DNA) → vytvoření nového sestřihového místa → pseudoexon
- analýza alternativních sestřihů, které modifikují klinické projevy choroby u pacientů (korelace genotyp / fenotyp u některých pacientů)

Detekce sestřihových variant

PCR



PTT



RNA:

exon 65 - **část intronu 65** - exon 66
(inzerce → vznik stop kodonu)

```
agatcatatatttgaatgctgttttaataagagtatgatattttttttacggagataaacat 9564-541
ttatattctatattatgtgttatgtggcctgaagt aatt aattttcttttcaataaggggc 9564-481
aatctgatgaagatctgagcatttaagaagggctgagcagtt agtt gct ggt aattttttt 9564-421
ggcttccatgaccaaagt aggt aattttgtttt agt aaccaaagt agattggt gaa gca 9564-361
gt aattcttctgtttaccaactt aaacc aaggt ggctttccat aggt gaat agaattttt 9564-301
```

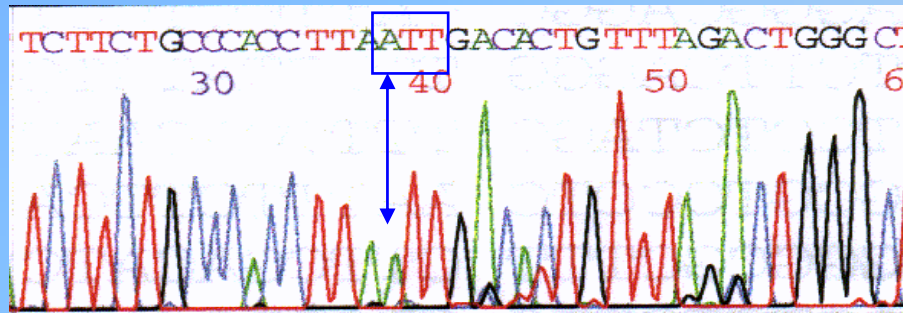
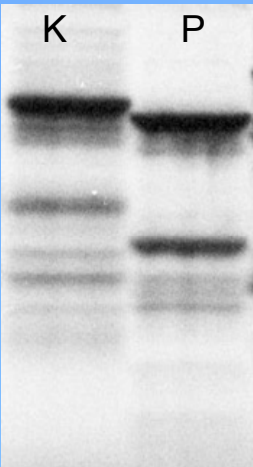
DNA:

mutace v intronu **T>G**
část intronu = pseudoexon

Analýza alternativních sestřihů

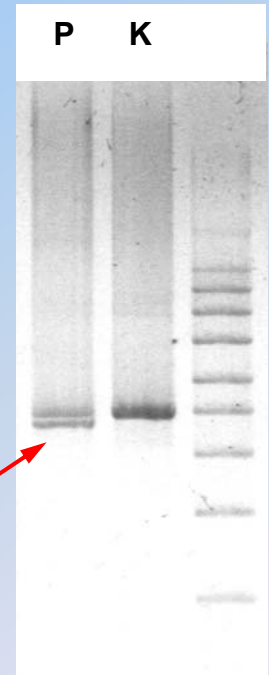
Např. pacient s BMD nesoucí *nonsense* mutaci Glu1110X

PTT



C>A; exon 25; Glu1110X

PCR



Detekce transkriptu s alternativním sestřihem exonu 25

transkript s *in-frame* delecí

Fenotyp DMD > BMD

Nevýhody RNA diagnostiky

- spolehlivost metody pouze u pacientů - mužů
- u žen (přenašeček) může dojít k degradaci mRNA s *frame-shift* a *nonsense* mutací (procesem *nonsense mediated mRNA decay*)

Závislost hladiny mRNA na typu mutace (Real Time PCR)

PTC mutace - pokles hladiny mRNA na 30%

pacienti - analýza je možná

X

přenašečky - mutace nemusí být odhalena (přednostní amplifikace alely bez mutace)

Poděkování

Sekce vrozených genetických chorob
Centrum molekulární biologie a genové terapie
FN Brno

Děkuji za pozornost

