

Molekulární diagnostika pletencové svalové dystrofie typu 2A

Lenka Fajkusová

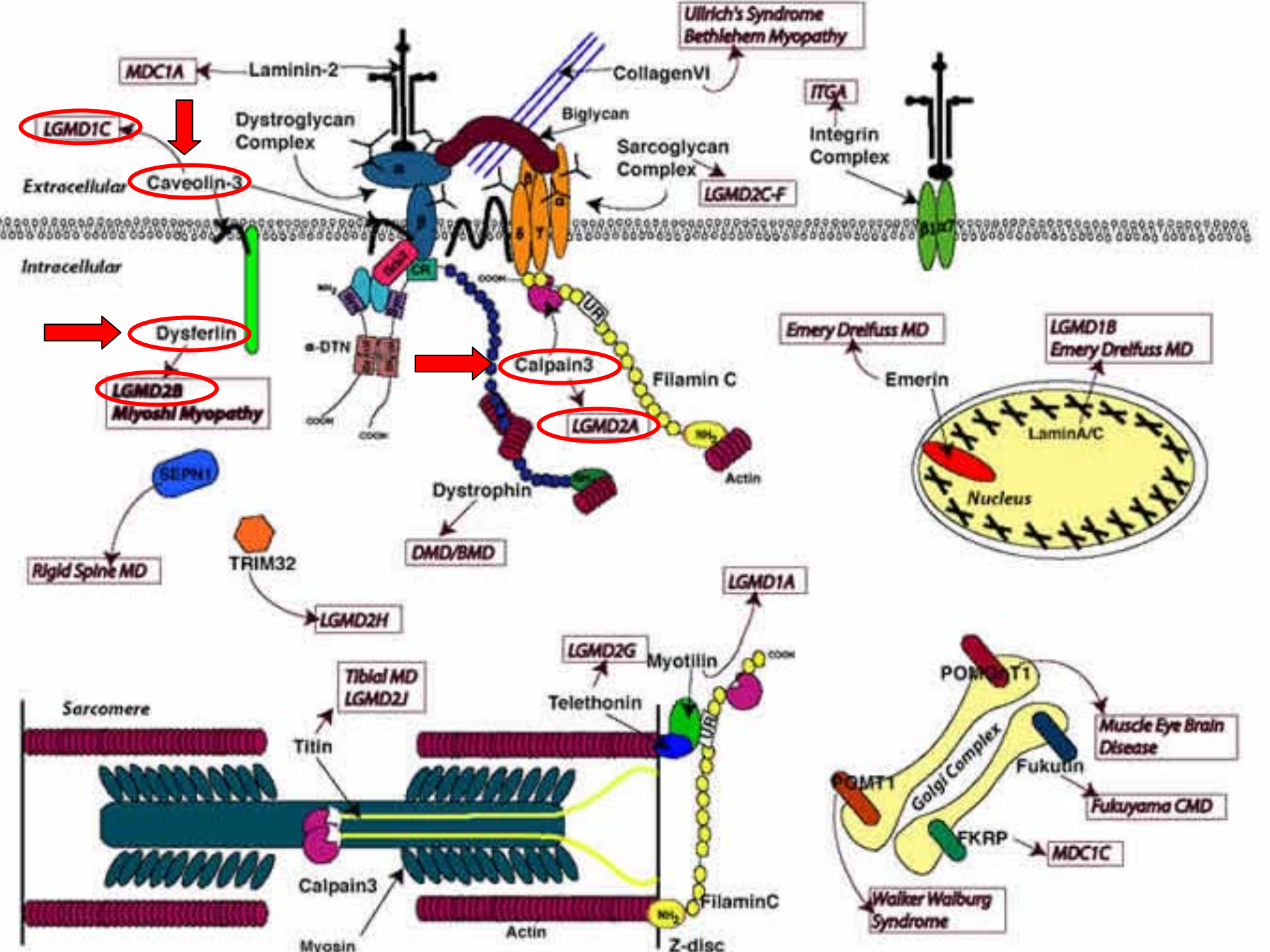
**Centrum molekulární biologie a genové
terapie**

Fakultní nemocnice Brno

Pletencové svalové dystrofie

(Limb Girdle Muscular Dystrophy – LGMD)

- Klinicky a geneticky heterogenní skupina svalových poruch
- Progresivní slabost svalů pánevního a ramenního pletence
- Dnes známo 17 forem LGMD
 - 6 s autosomálně dominantním typem dědičnosti (LGMD1A-F)
 - 11 s autosomálně recesivním typem dědičnosti (LGMD2A-K)



| Typ onemocnění | Typ dědičnosti | Lokalizace genu | Genový produkt |
|--|----------------|-----------------|----------------|
| 1A | AD | 5q | Myotilin |
| Myotilin: lokalizace: sarkomera, funkce: kontrola integrity sarkomer | | | |
| 1B | AD | 1q | Lamin A/C |
| Lamin A/C: lokalizace: vnitřní jaderná membrána, funkce: stabilizace jaderné membrány, fosforylace laminu → rozložení jaderné síťoviny během mitózy | | | |
| 1C | AD | 3p | Kaveolin 3 |
| Kaveolin 3: lokalizace: plazmatická membrána, základní proteinová komponenta „caveolae“, funkce: vazba a transport komponent signálních drah | | | |
| 1D | AD | 7q | neznámý |
| 1E | AD | 6q | neznámý |
| 1F | AD | 7q | neznámý |





| Typ onemocnění | Typ dědičnosti | Lokalizace genu | Genový produkt |
|----------------|----------------|-----------------|--|
| 2A | AR | 15q | Kalpain 3 |
| 2B | AR | 2p | Dysferlin |
| 2C | AR | 13q | Gama-sarkoglykan – součást DAPC |
| 2D | AR | 17q | Alfa-sarkoglykan – součást DAPC |
| 2E | AR | 4q | Beta-sarkoglykan – součást DAPC |
| 2F | AR | 5q | Delta-sarkoglykan – součást DAPC |
| 2G | AR | 17q | Telethonin – kontrola integrity sarkomer |
| 2H | AR | 9q | TRIM32 – E3-ubiquitin ligáza – označení proteinu ubiquitinem a jeho degradace v proteasomu |
| 2I | AR | 19q | <i>Fukutin-related protein</i> – glykosyltransferáza (př. postranlační úpravy dystroglykanu) |
| 2J | AR | 2q | Titin – tvorba sarkomer |

Pletencová svalové dystrofie 2A

CAPN3 gen

lokalizace: 15q15.1

velikost: 53 kb, 24 exonů

délka mRNA: 2,5 kb

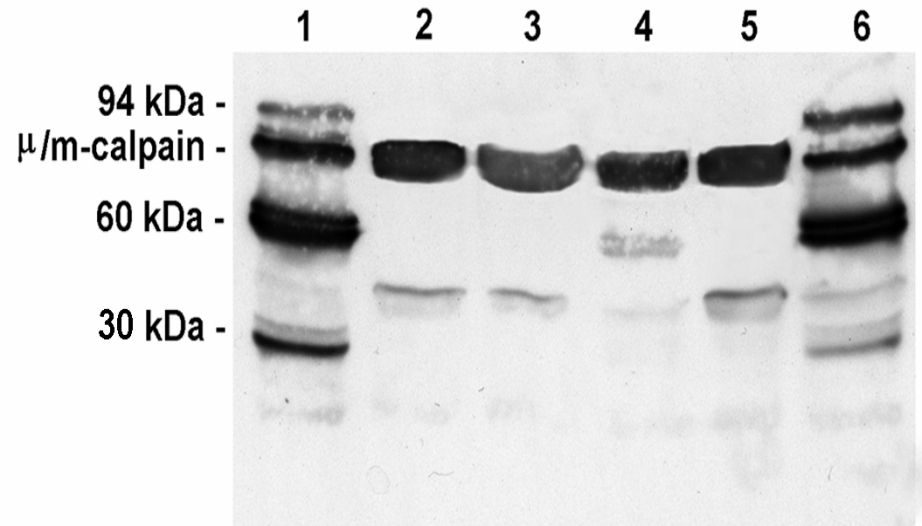
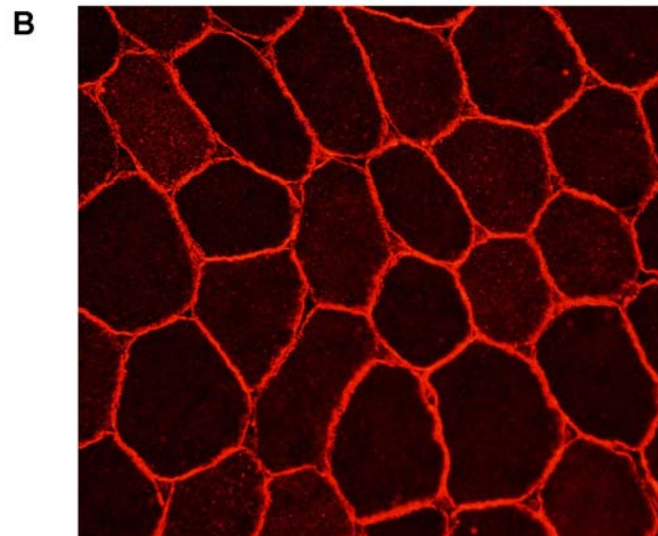
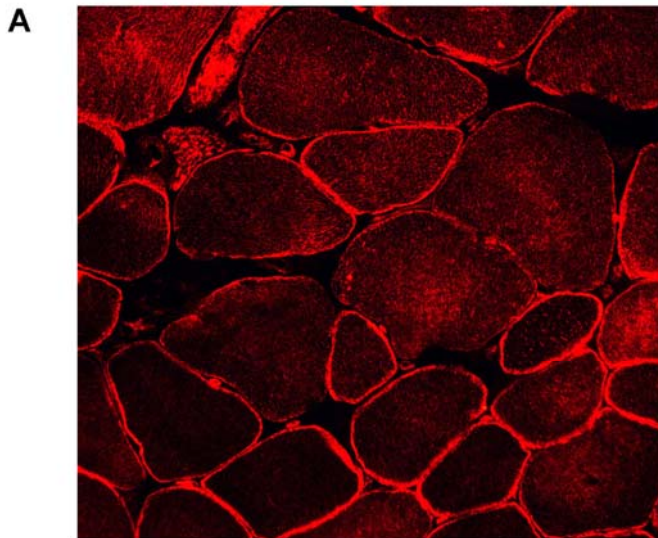
Kalpain-3 protein (p94)

hmotnost proteinu: 94 kDa

exprese: svalové buňky

funkce: proteasa - degradace proteinů na polypeptidy

Imunochemická analýza svalových proteinů



Western blot kalpainu-3
1, 6 – kontrola,
2, 3, 4, 5 – pacient

Imunofluorescenční detekce dysferlinu
A - pacient, B - zdravá kontrola

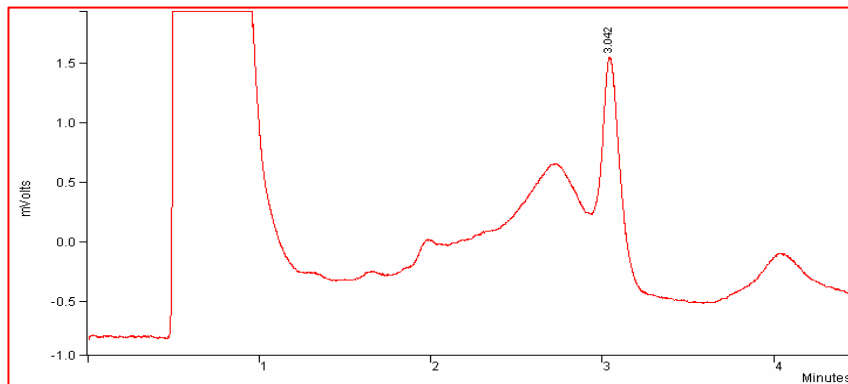
Analýza mRNA genu pro kalpain3:

- izolace RNA ze svalových buněk,
- reverzní transkripce a amplifikace kódující sekvence (RT-PCR),
- přímá sekvenční analýza.

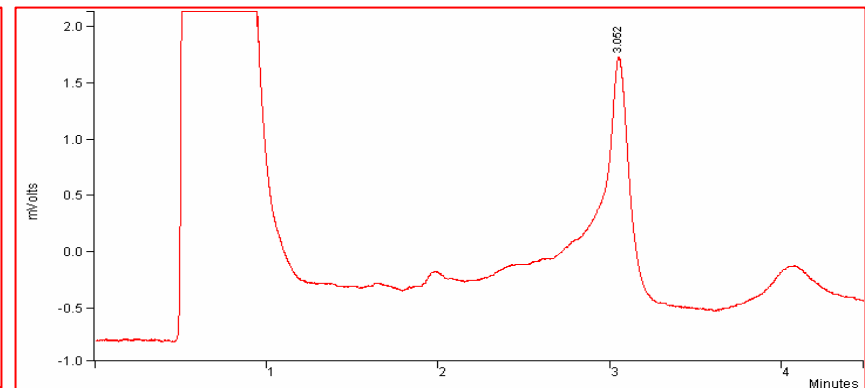
Analýza DNA genu pro kalpain3:

- izolace DNA,
- amplifikace 24 exonů (PCR),
- denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (DHPLC),
- sekvenční analýza exonů vykazujících změněný profil při analýze na DHPLC.

Výstup z DHPLC:



mutace c.550delA



kontrolní DNA

V současné době provedeno

- **38 analýz mRNA genu CAPN3
(14 pozitivních pacientů)**
- **56 analýz DNA genu CAPN3
(17 pozitivních pacientů)**

Analýza DNA a mRNA

| PACIENT | MUTACE DETEKOVANÁ NA ALELE 1 | MUTACE DETEKOVANÁ NA ALELE 2 |
|---------|------------------------------|---|
| 1 | 224A>G, Y75C | 224A>G, Y75C |
| 2 | 133G >A, A45T | 133G >A, A45T |
| 3 | 245C>T, P82L | 550delA, T184RfsX36 |
| 4 | 245C>T, P82L | 2314-2317del, D772delK773NfsX3 |
| 5 | 550delA, T184RfsX36 | 598-612del, F200_L204del |
| 6 | 550delA, T184RfsX36 | 1468C>T, R490W |
| 7 | 550delA, T184RfsX36 | 550delA, T184RfsX36 |
| 8 | 550delA, T184RfsX36 | 1981delA, I661X |
| 9 | 550delA, T184RfsX36 | 1722delC, F574FfsX21 |
| 10 | 598-612del, F200_L204del | 2245A>C, N749H |
| 11 | 598-612del, F200_L204del | 1745-20C>G, ??? |
| 12 | 1783-1788del, K595_K596del | 2242C>T, R748X |

| PACIENT | MUTACE DETEKOVANÁ NA ALELE 1 | MUTACE DETEKOVANÁ NA ALELE 2 |
|---------|------------------------------|---|
| 3 | 245C>T, P82L | 550delA, T184RfsX36 |
| 4 | 245C>T, P82L | 2314-2317del, D772delK773NfsX3 |
| 5 | 550delA, T184RfsX36 | 598-612del, F200_L204del |
| 6 | 550delA, T184RfsX36 | 1468C>T, R490W |

mRNA: homozygotní výskyt *missense* mutace nebo *in-frame* delece

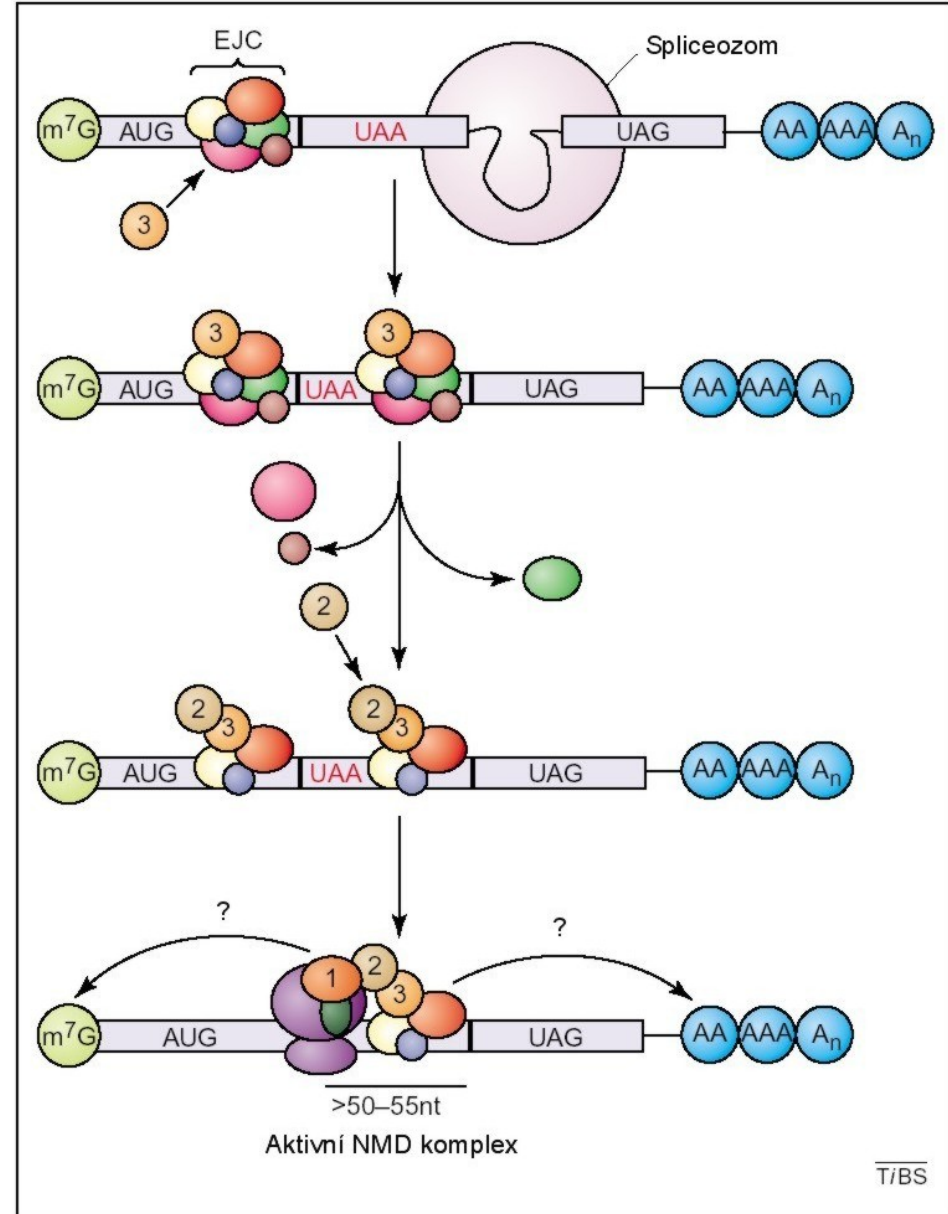
DNA: heterozygotní výskyt *missense* mutace nebo *in-frame* delece + detekce ***frame-shift*** delece

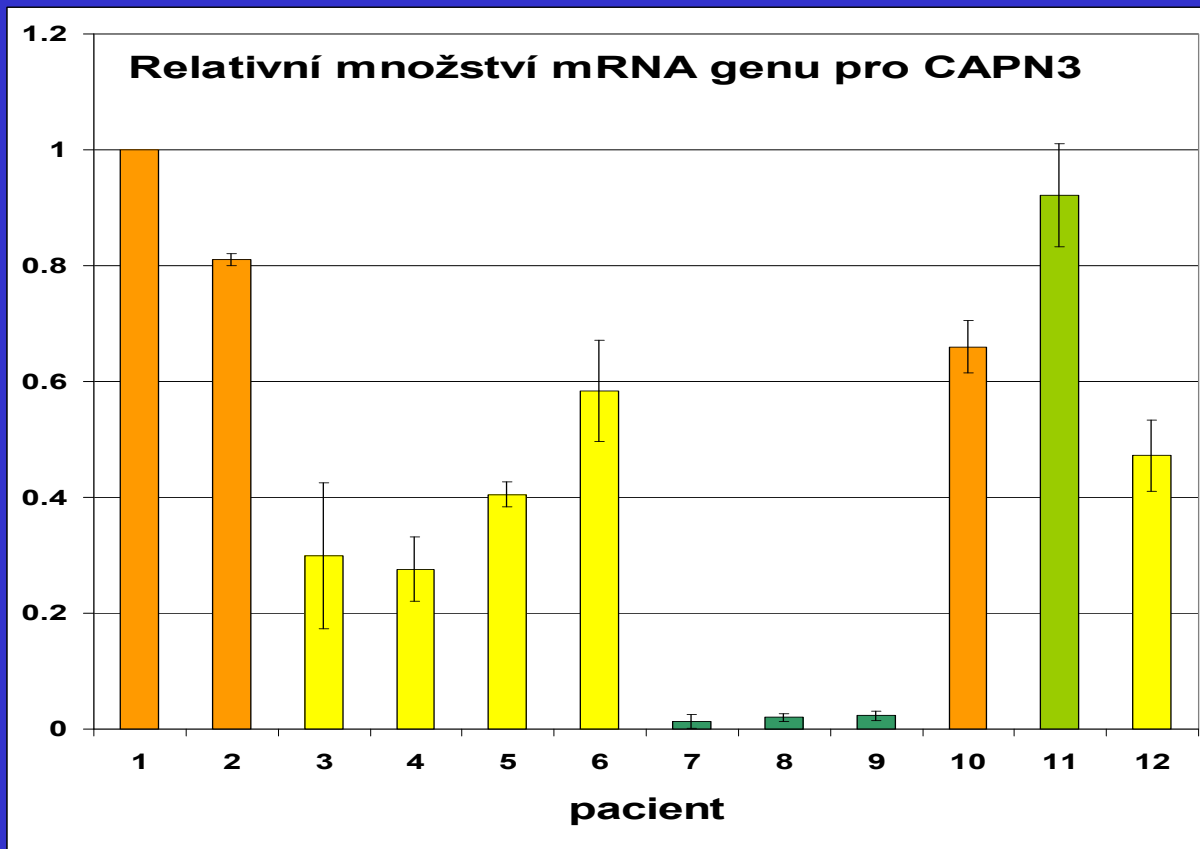
→ **degradace mRNA nesoucí *frame-shift* delecí**

mechanismem *nonsense mediated mRNA decay*

Nonsense mediated mRNA decay (NMD)

- K degradaci mRNA dochází v případě, že se předčasný terminační kodon nachází ≥ 50 nt. před místem spojení dvou exonů.
- Po sestřihu se vytvoří 20-24 nt. od místa sestřihu EJC (*exon junction complex*), na něj se naváží proteiny Upf3 a Upf2.
- Při první vlně translace první navázaný ribozom odtrhne EJC z mRNA
- Pokud je přítomen předčasný terminační kodon, na mRNA zůstane navázaný 1 nebo více EJC a na EJC se prostřednictvím Upf3 a Upf2 naváže Upf1 - **signál ke spuštění degradace mRNA**






- *Real-time* PCR
- Komparativní metoda pro relativní kvantifikaci – množství mRNA genu CAPN3 vztaženo k referenčnímu genu (GAPDH, HPRT) a kalibrátoru (pacient 1)

| GENOTYP PACIENTA | PRŮMĚRNÁ HODNOTA |
|--|------------------|
| missense / missense in-frame delece / missense | 0,82 |
| missense/frame-shift missense/nonsense in-frame delece/frame-shift in-frame delece/nonsense | 0,41 |
| frame-shift/frame-shift | 0,02 |

- *Frame-shift* nebo *nonsense* mutace na 1 alele: snížení množství mRNA na ~ 40 %
- *Frame-shift* mutace na obou alelách: snížení množství mRNA na ~ 2 %

Závěr:

Molekulárně genetická diagnostika LGMD2A je časově a finančně náročné vyšetření 

nutnost správného zhodnocení **klinických nálezů, výsledků histologické, histochemické a imunohistochemické analýzy svalové tkáně.**

Poděkování:

Molekulárně genetické analýzy

Kristýna Stehlíková

Imunohistochemické analýzy

Markéta Hermanová (PAU, FN Brno)

Josef Zámečník (Ústav patologie a molekulární medicíny, FN Motol)

Klinická pracoviště

Petr Vondráček (Klinika dětské neurologie, FN Brno)

Stanislav Vohánka (Neurologická klinika, FN Brno)

Taťána Maříková (Ústav biologie a lékařské genetiky, FN Motol)

Radim Mazanec (Klinika dětské neurologie, FN Motol)

Jan Staněk (Klinika dětské neurologie, FN Ostrava)