

GENETIKA A MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DUCHENNEOVY MUSKULÁRNÍ DYSTROFIE

POHLED Z LABORATOŘE

Petra Hedvičáková

ÚBLG FN Motol

Odd. lékařské molekulární genetiky

MZO 00064203

23.-24.5.2008

Brno

Duchenneova muskulární dystrofie

- Neuromuskulární onemocnění
- Progresivní svalová slabost
- XR
(u myší, krys, 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

~ 12. rok invalidní vozík

~ 15. - 25. rok † kardiovaskulární a pulmonární dysfunkce

Svalová pseudohypertrofie, kontraktury, skoliosa

Laboratorně ↑ CK v séru, EMG, mol. genetika, 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)

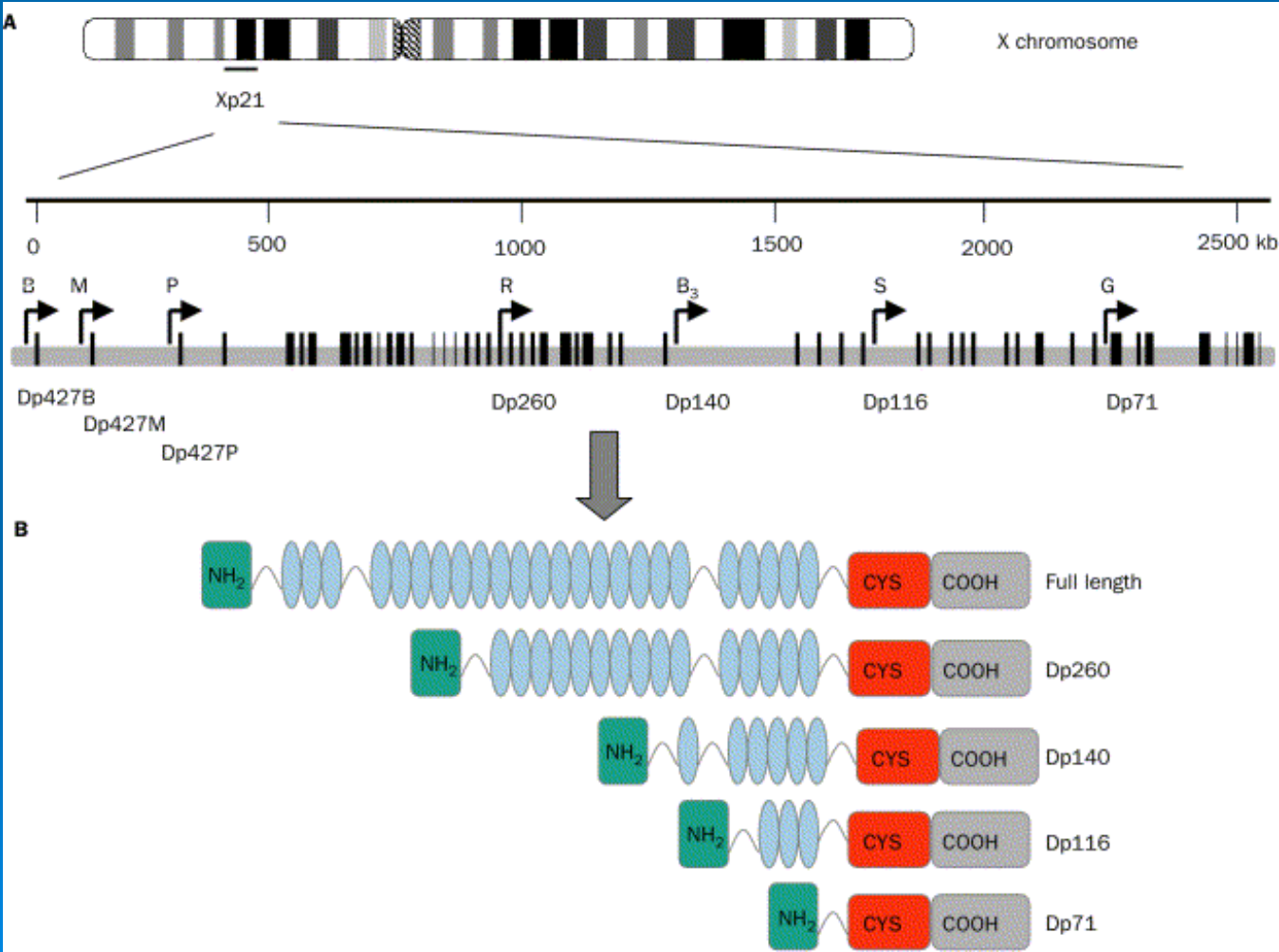
Organizace

Xp21

gen: 2.5 milionu bp
mRNA: 14000bp
1+78 exonů

promotory:

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



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

79 exonů $\cong$ 0.6% genu

14 kb mRNA

různé promotory: Dp427l, Dp427c, Dp427m, Dp427p, Dp260, Dp140, Dp116 a Dp71

alternativní splicing: Dp140ab, Dp140b, Dp140bc, Dp140c, Dp71a, Dp71b a Dp71ab

alternativní polyA-addition sites: Dp40

7 různých transkriptů

-svalový

-kortikální

-v Purkyňových buňkách

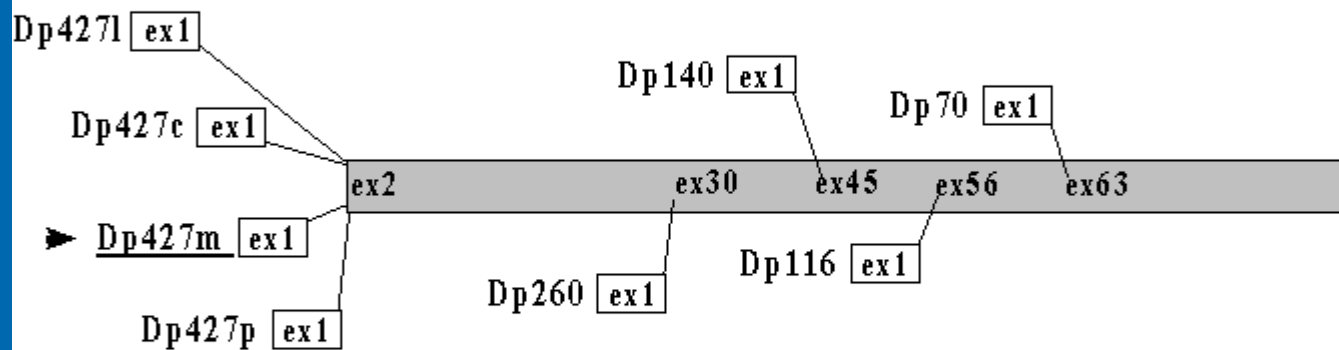
-retinální

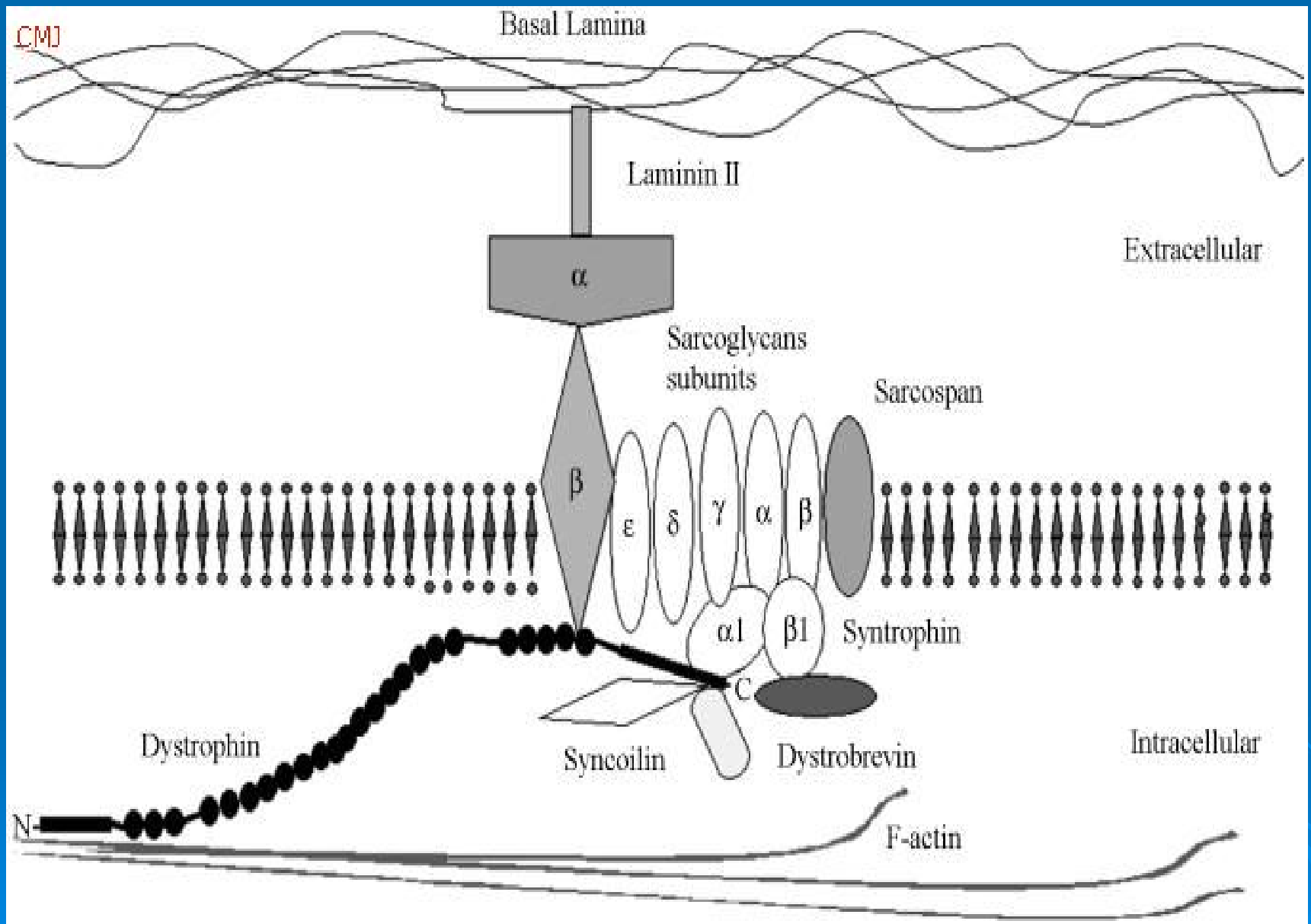
-mozkový

-ve Schwannových buňkách

-v gliových buňkách

promoters dystrophin gene





Diagnostika

1. Delece a duplikace

Multiplex PCR, Southern blot, MLPA

2. Haplotypová analýza - segregace alel

intragenová rekombinace!! až 12%

Rizikový haplotyp – 14% riziko opakování

Chamberlain

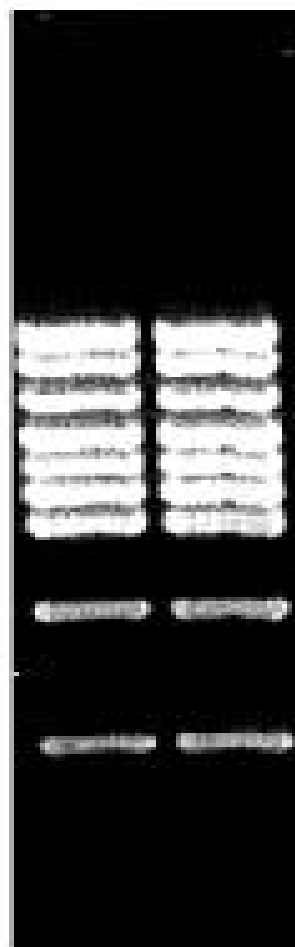
Size^a

Exon^b

547
506
459
416
388
360
331

268

186



45
48
19
17
51
8
12

44

4

Beggs

Size^a

Exon^b

535

410

357

271

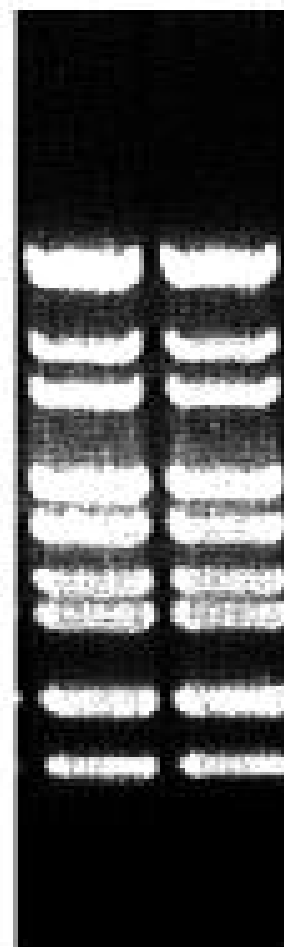
238

202

181

139

113



Pm

3

43

50

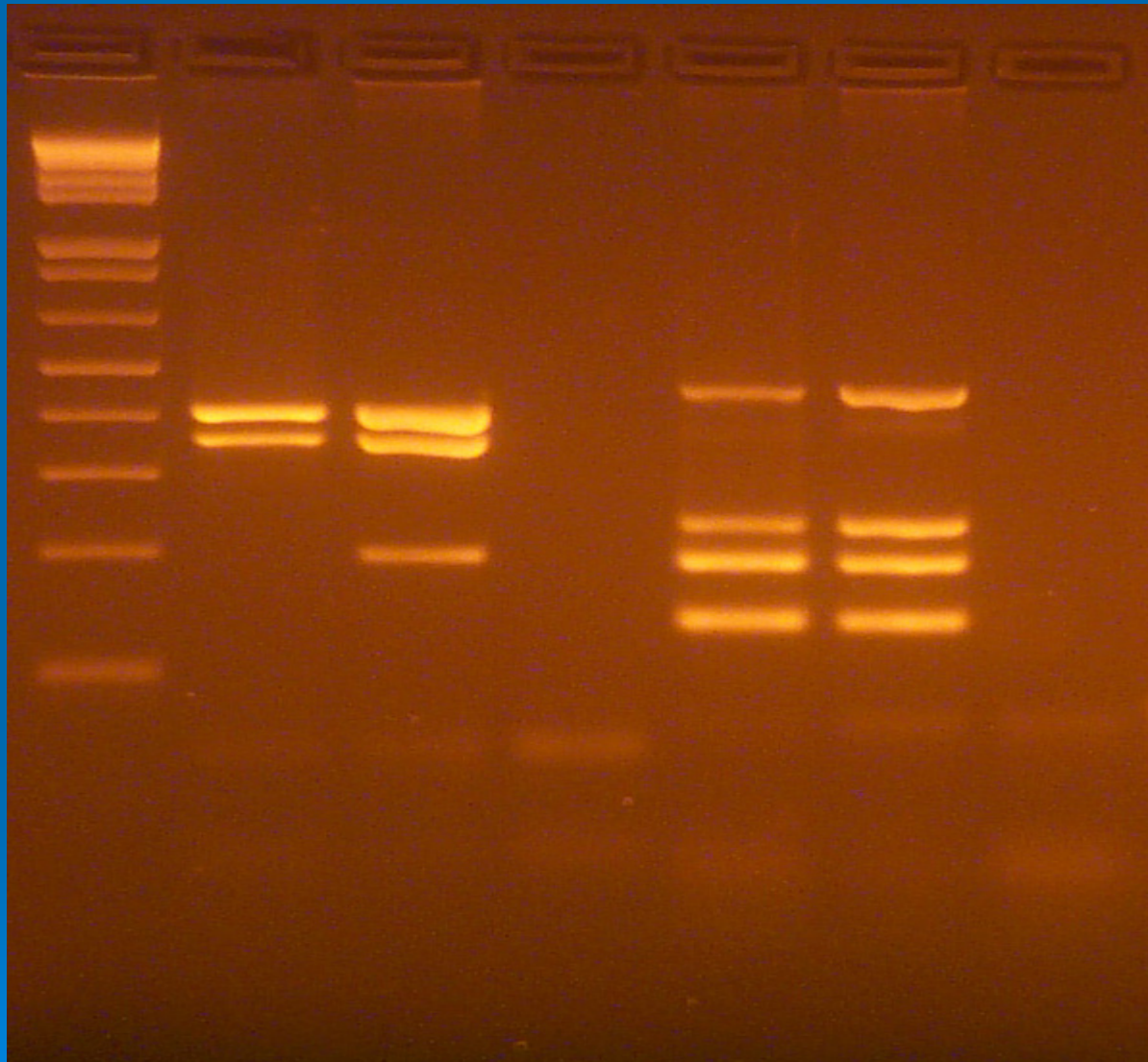
13

6

47

60

57



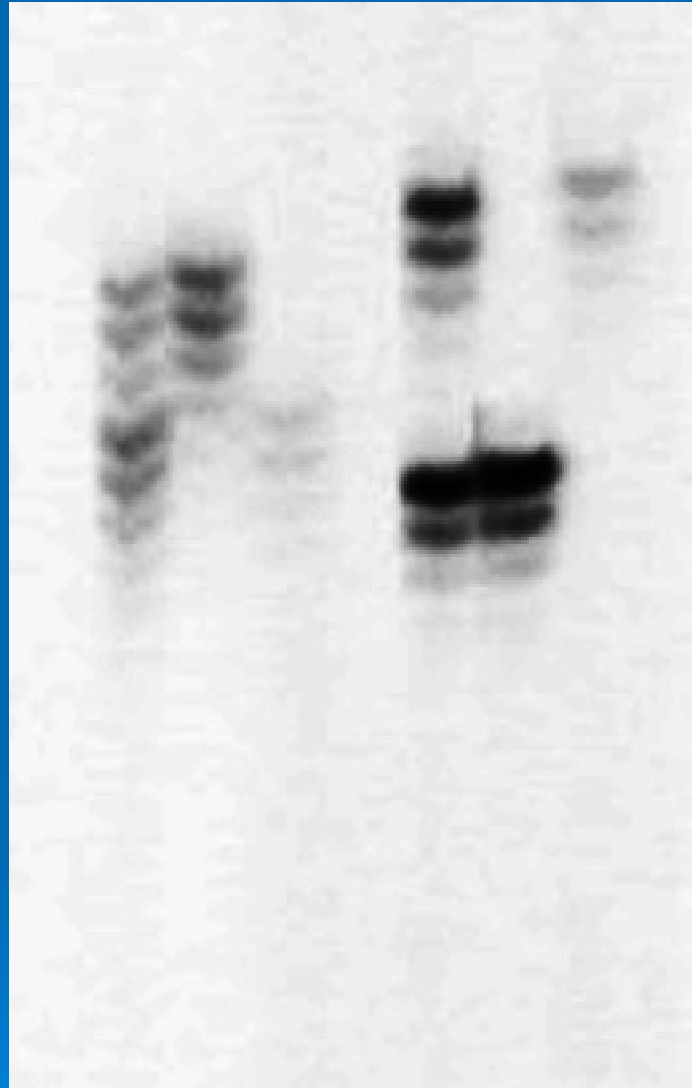
Haplotypová analýza

8 polymorfismů s vysokou informativitou

CA repeats DYS I, DYS II, STR 07,
STR44, STR45, STR 49,
STR50, AFM283

fluorescenčně značené primery

separace na polyakrylamidu





www.mlpa.com

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

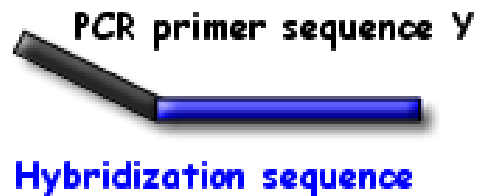
Prvně popsáno:

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg 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.

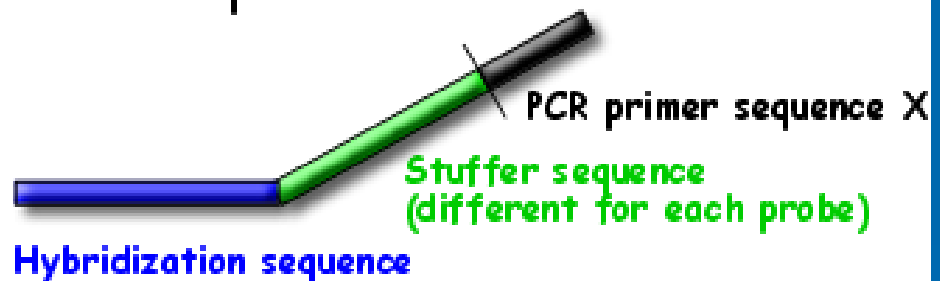
- 1. denaturace
- 2. hybridizace
- 3. ligace
- 4. amplifikace
- 5. elektroforéza

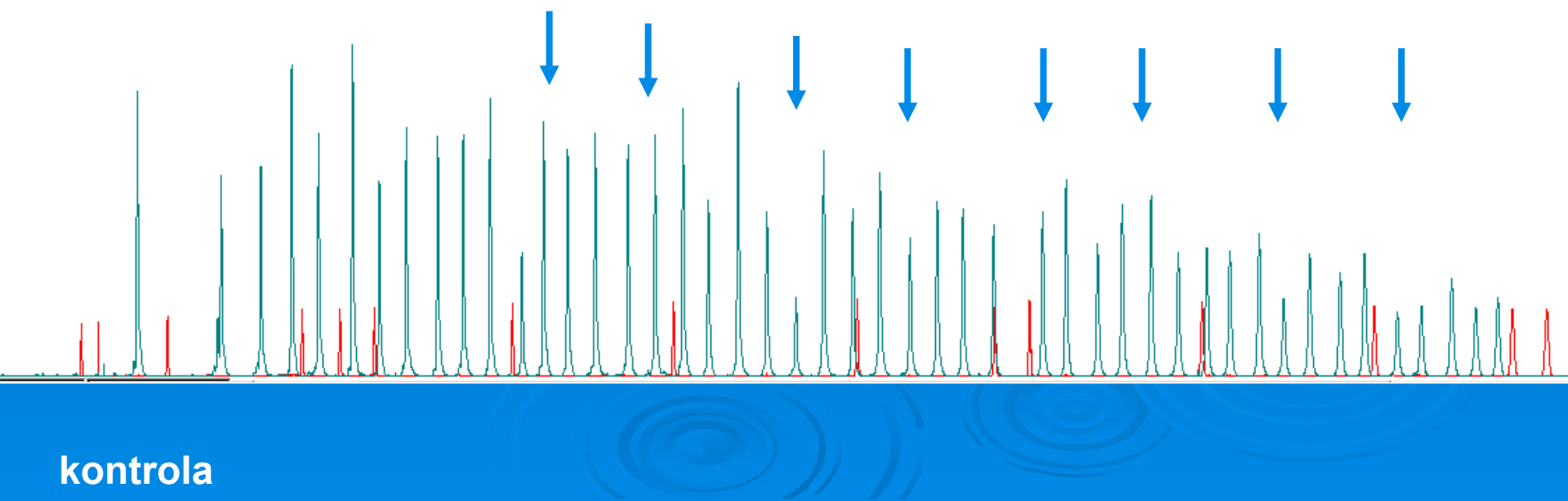
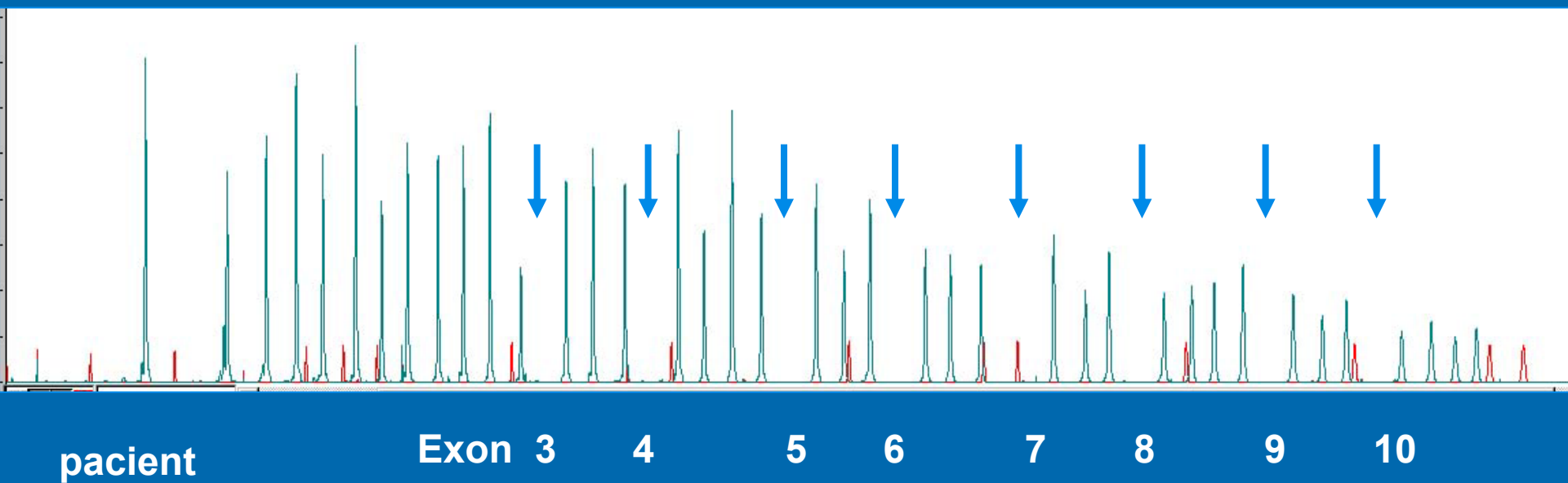
SALSA MLPA sondy

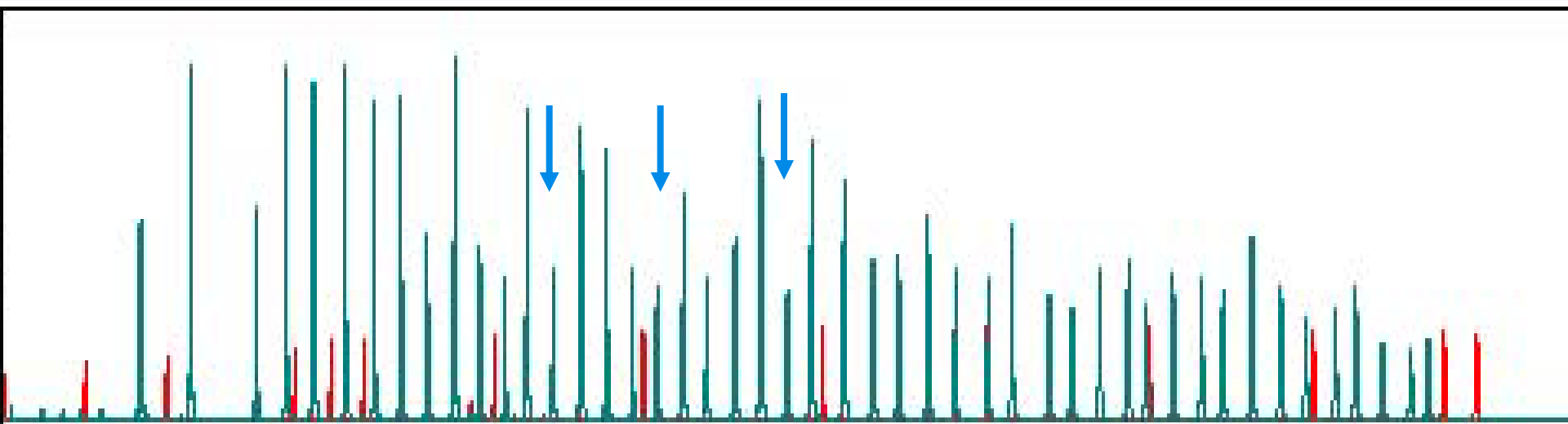
Synthetic oligonucleotide
50-60 bp



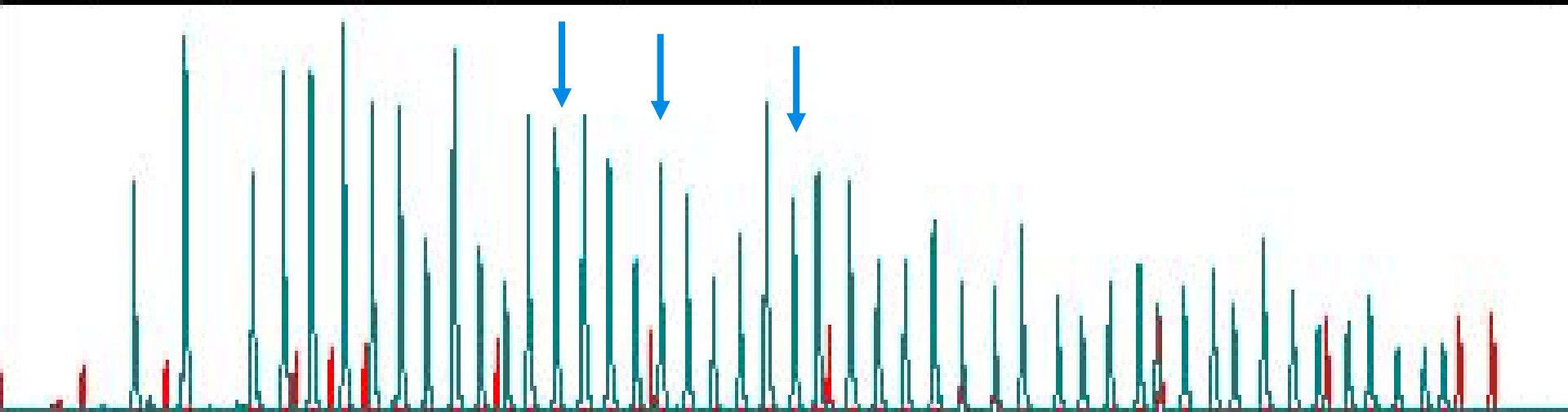
M13-derived oligonucleotide
60-450 bp



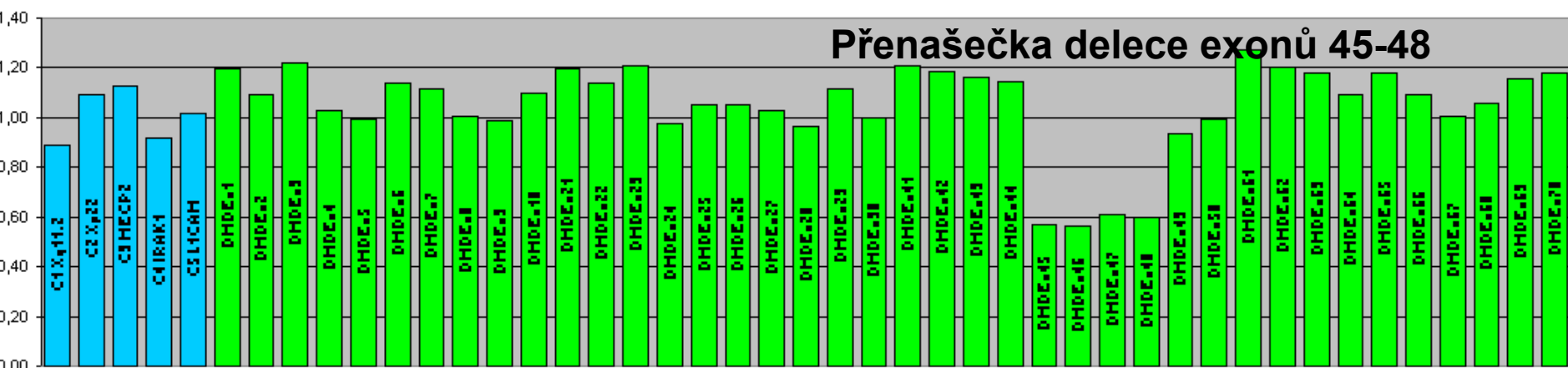
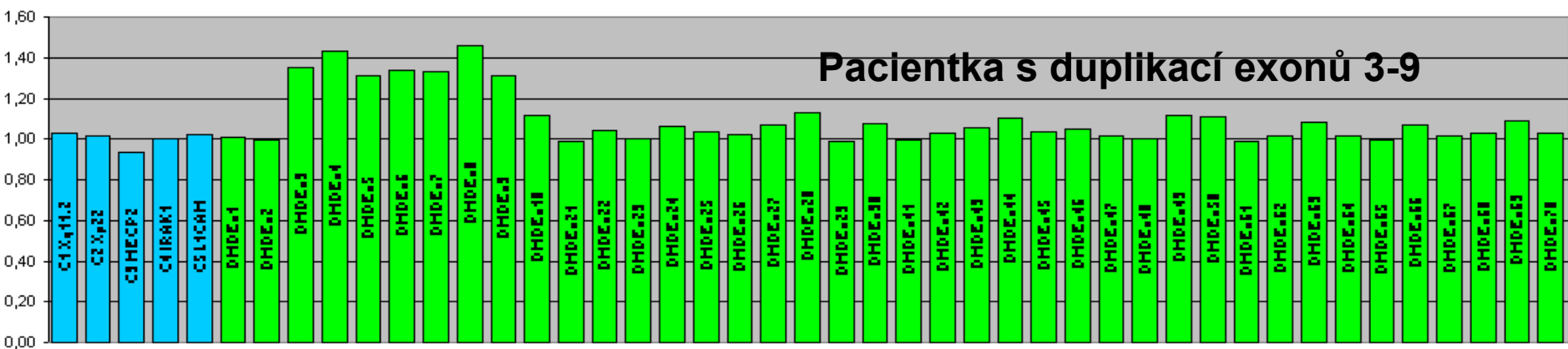
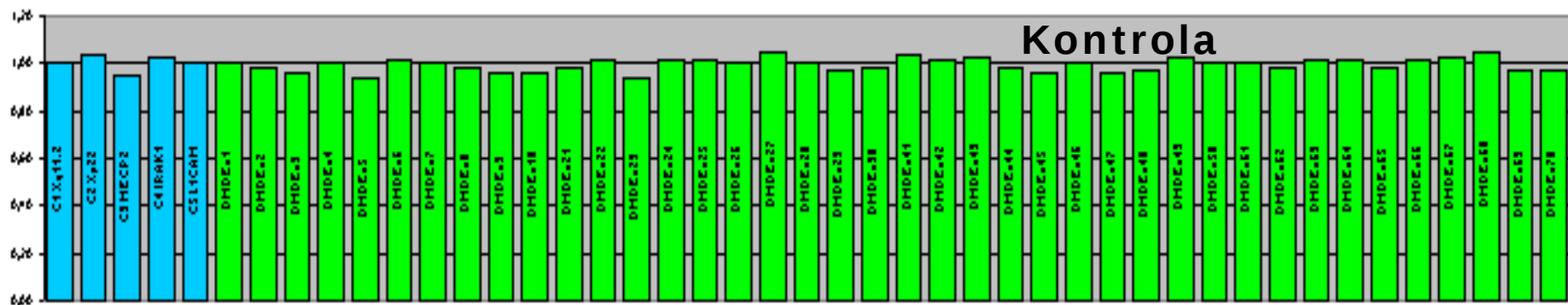




Přenašečka del exonů 53 54 55



Kontrola



DMD/BMD

Metodou MLPA vyšetřeno 74 rodin
z nich 114 žen v riziku

Matky: 52
z nich 27 přenašeček
25 nejsou přenašečky

ostatní relevantní příbuzné: 62
z nich 19 přenašeček delece či duplikace

Příbuzné netestovaných nebo nedelečních pacientů

- 1x del 53-55 (multiplex nedeteguje)
- 1x del 68-71 (multiplex nedeteguje)
- 1x matka netestovaného pacienta, del 45
- 1x matka netestovaného pacienta, del 46-47
- 1x matka manifestující dcery, del 50-52
- 1x matka netestovaného pacienta, dupl. 61
- 1x sestra netestovaného pacienta, dupl. 61-66

65x manifestní přenašečky

51x bez nálezu

Del 48-51

Del 46-47, matka tatáž delece, bez příznaků

Del 8-17

Del 52

Del 18-33

Del 45-52, matka bez delece

Del 51- 55, dcera tatáž delece, bez příznaků

Del 61, matka bez delece

Del 50-52

Del 48-52

Dupl 3-9, matka tatáž dupl., bez příznaků

Dupl 20-43, oba rodiče bez duplikace

Dupl 43-44

Dupl 2-52

Metoda MLPA je

- jednoduchá
- rychlá
- citlivá
- nepřiliš náročná na množství a kvalitu analyzované DNA

Metoda MLPA je

- v praxi prověřená a diagnosticky spolehlivá
- pacienta nezatěžuje – odběr krve x svalová biopsie
- snadné stanovení přenašečství DMD/BMD u žen v riziku
- rychlé zjištění přítomnosti duplikace jako kauzální příčiny tohoto onemocnění
- výrazné zlepšení možností diagnostiky v rodinách s DMD/BMD

Poděkování

Dr. J.P. Schouten

Dr. A. Wallace

MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Mgr. Zuzana Mušová

Doc. MUDr. Tat'ána Maříková, CSc.

MUDr. Josef Kraus, CSc.

MUDr. Jana Haberlová

MUDr. Radim Mazanec, PhD.

MZO 00064203