

**FISH ANALÝZA m-RNA DMPK
(ZNF9) V DIFERENCOVANÝCH
TKÁNÍCH PACIENTŮ S
MYOTONICKOU DYSTROFIÍ**

Lukáš Z, Kroupová I, Falk M*

Ústav patologie FN Brno

*Biofyzikální ústav AVČR Brno

Definice MD

- **Myotonická dystrofie (MD):** autosomálně dominantní neuromuskulární onemocnění s incidencí asi 1/8000. Nejčastější forma svalové dystrofie postihující dospělou populaci.
- **Klasická myotonická dystrofie (DM1):** Příčina - nestabilní trinukleotidová repetitivní sekvence (CTG)_n v genu kódujícím protein kinázu DMPK (dystrophia myotonica protein kinase) na chromosomu 19q13.3 .

Definice MD

Myotonická dystrofie DM2: mutace – expanze repetice (CCTG)_n - na 3q21 v intronu zinc finger proteinu 9 (ZNF9). Expanze jsou delší než u DM1, avšak u DM2 není korelace mezi závažností onemocnění a délkou repetice

Transkripce, translace DMPK

Norma:

Nucleus: DMPK DNA =>DMPK mRNA =>

ER: DMPK protein (exprese dosud prokázána jen v některých tkáních)

DM1:

Nucleus: DMPK DNA (CTG)_n =>DMPK mRNA
(CUG)_n = => || stop

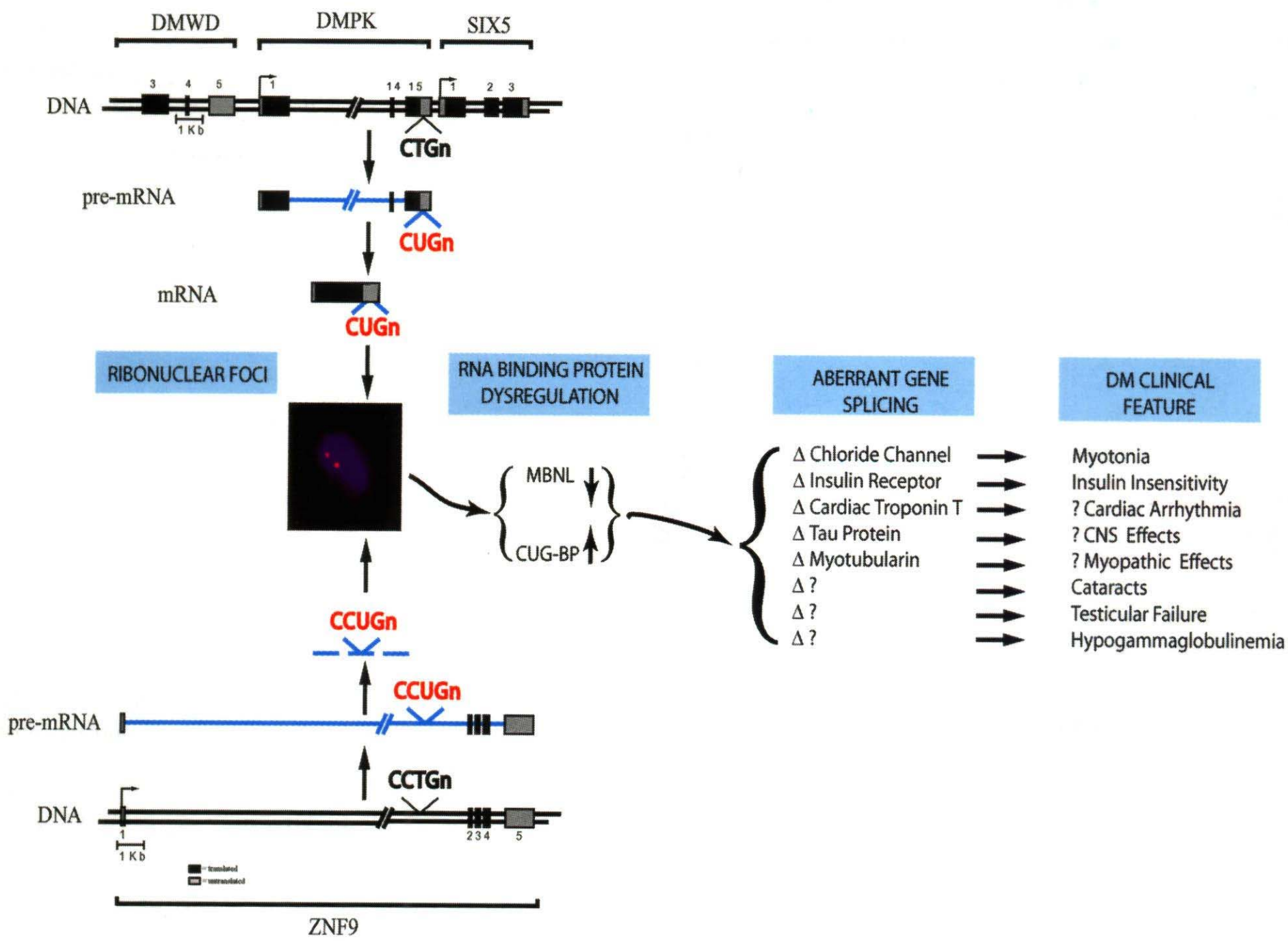
ER: ---

Patogeneze DM

Snížené množství DMPK proteinu v důsledku abnormálního transportu DMPK mRNA do cytoplasmy (ER).

Omezení exprese proteinu sousedícího genu (SIX5)

Toxické účinky expanze CUG na úrovni RNA v intranukleárních fokusech: **RNA-vazebné proteiny** se specificky vážou na **expandované CUG repetice** a ovlivňují jejich regulaci, což způsobí aberantní sestřih některých genů



Exprese DMPK a přítomnost inkluzí v lidských tkáních – dosavadní údaje

V **normálních** lidských buňkách a tkáních byla exprese **DMPK proteinu** zjištěna jen v hladkém a kosterním svalu a v myokardu. Nebyla prokázána v nervové tkáni **DMPK mRNA v normálních** buňkách se nachází ve většině doposud studovaných tkání, i v těch, které nebývají postiženy při DM

Inkluze obsahující retinovanou mRNA u DM1 byly dosud popsány jen ve svalové tkáni, neuronech, fibroblastech a myoblastech. Rovněž byly popsány v extraembryonálních strukturách lidského zárodku – v buňkách trofoblastu. **Jsou přítomny i ve tkáních nepostižených myotonickou dystrofií ?**

Předmět tohoto sdělení:

- (1) histopatologické vyšetření a
- (2) FISH analýza RNA některých tkání dospělých pacientů postižených MD.
Vyšetřeny byly tkáně přítomné v diagnostických svalových excizích

Vyšetřené tkáně

- Kosterní sval
- Svalovina cévní medie
- Endotel
- Schwannovy buňky
- Fibroblasty
- Lymfocytární infiltrát

Kosterní sval

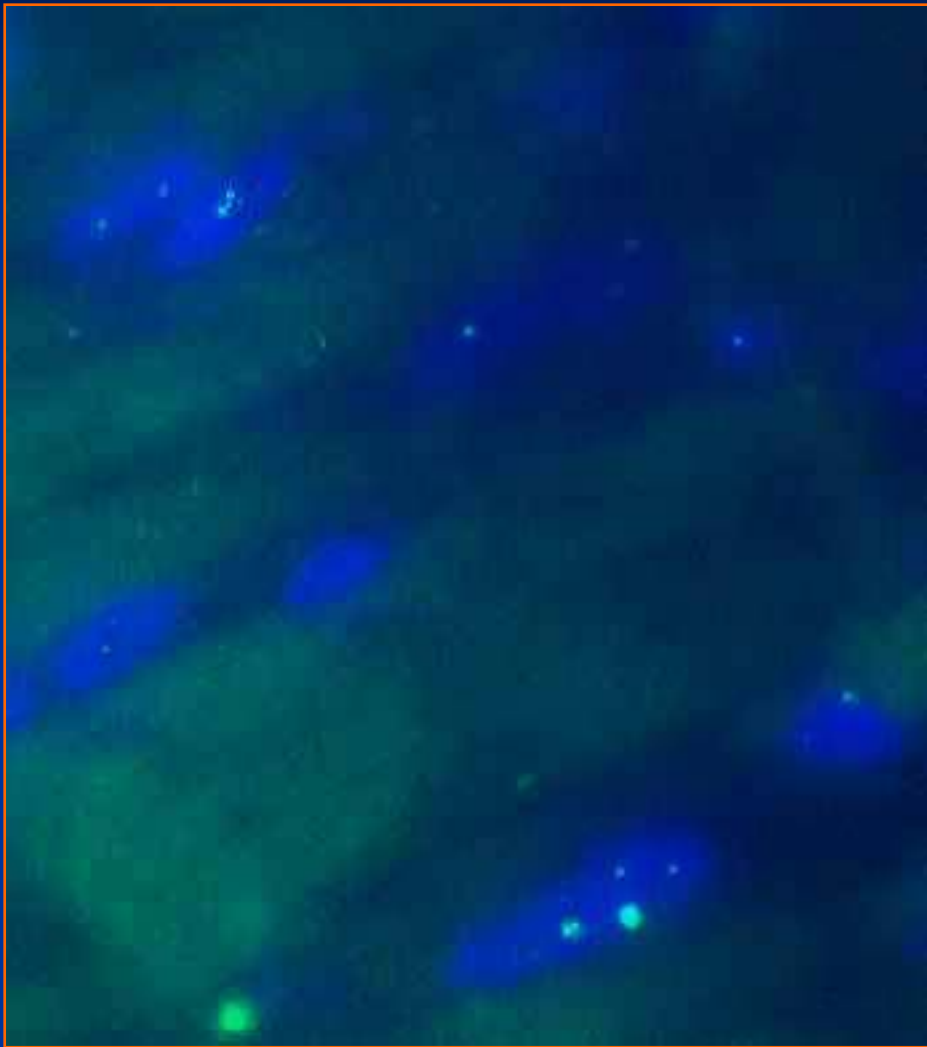
DNA: expanze CTG potvrzena v jádrech lymfocytů periferní krve pacienta

mRNA: retinový transkript v jádře ⇒

mRNA v normě: pozitivní reakce v sarkoplasmě (byla prokázána)

Protein: prokázaná pozitivní exprese v sarkoplasmě (byla prokázána)

DM1, kosterní sval (celkový výřez + detail jádra)



Hladký sval cévní medie

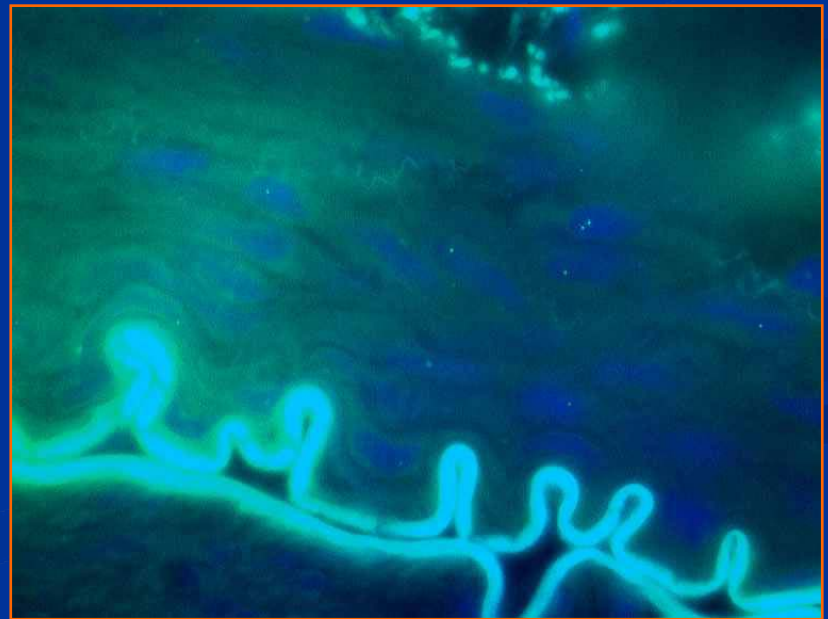
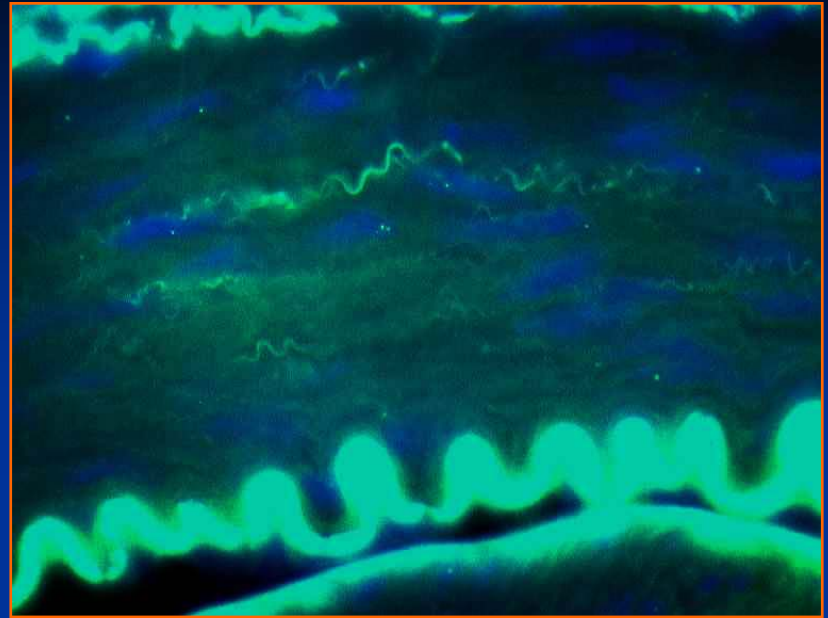
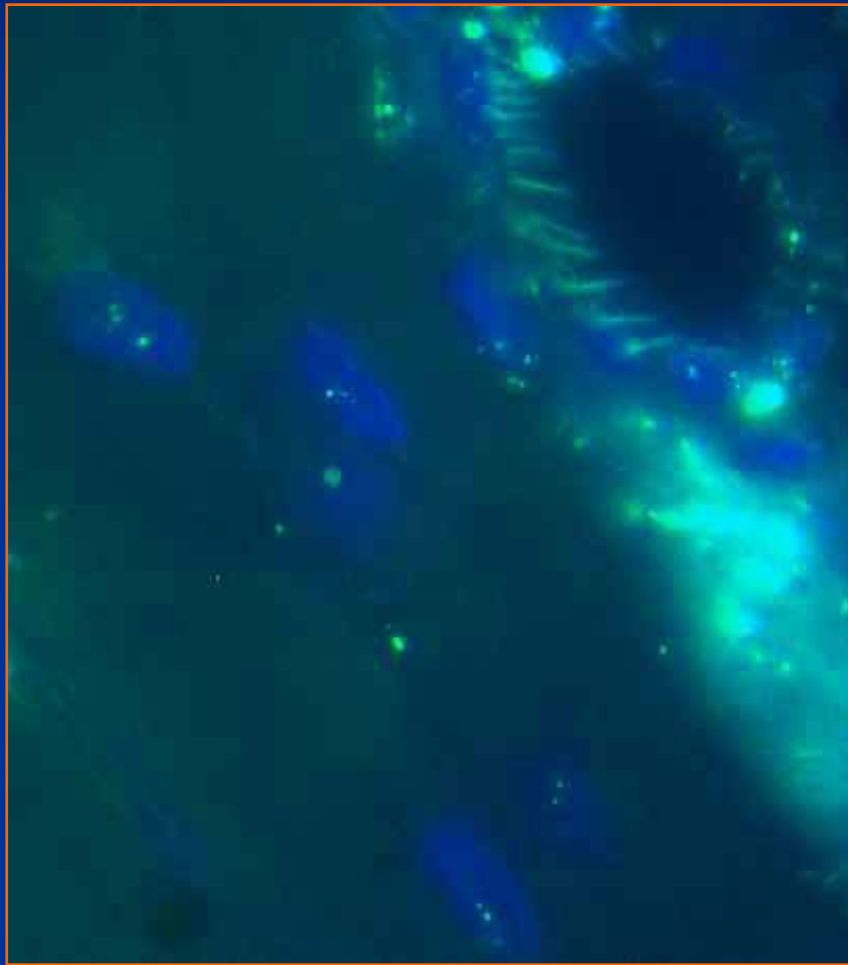
DNA: expanze CTG potvrzena v jádrech lymfocytů periferní krve pacienta

mRNA pacienta: retinový transkript v jádře v.t. ⇒

mRNA v normě: pozitivní reakce v sarkoplasmě (byla prokázána)

Protein: pozitivní reakce (byla prokázána)

DM1, hladký sval medie



Endotel

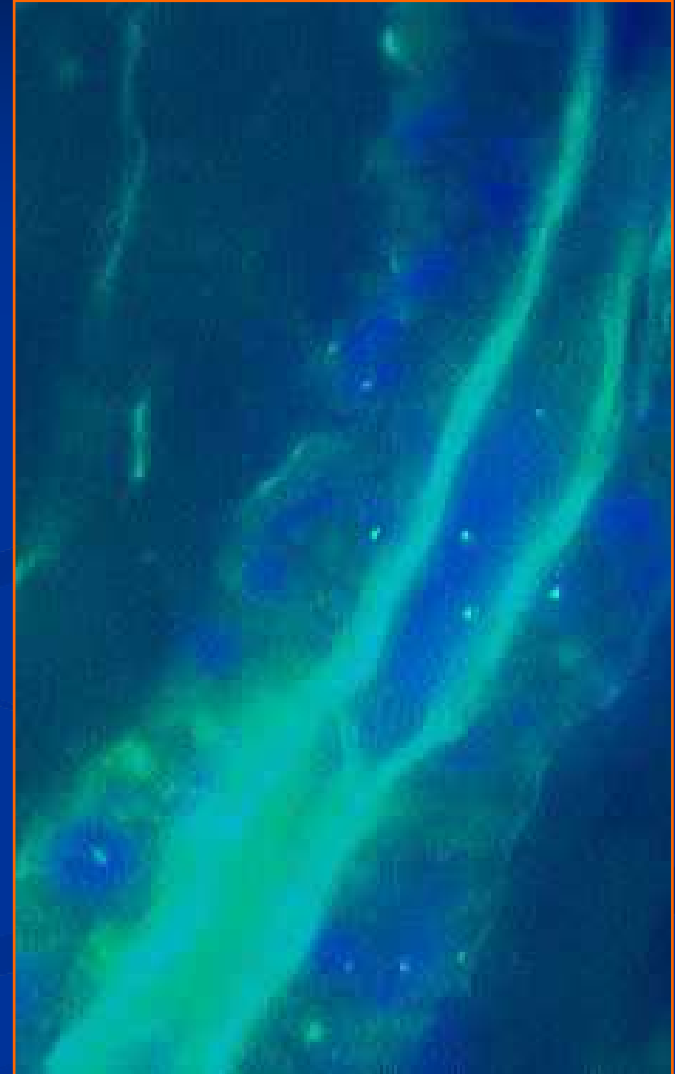
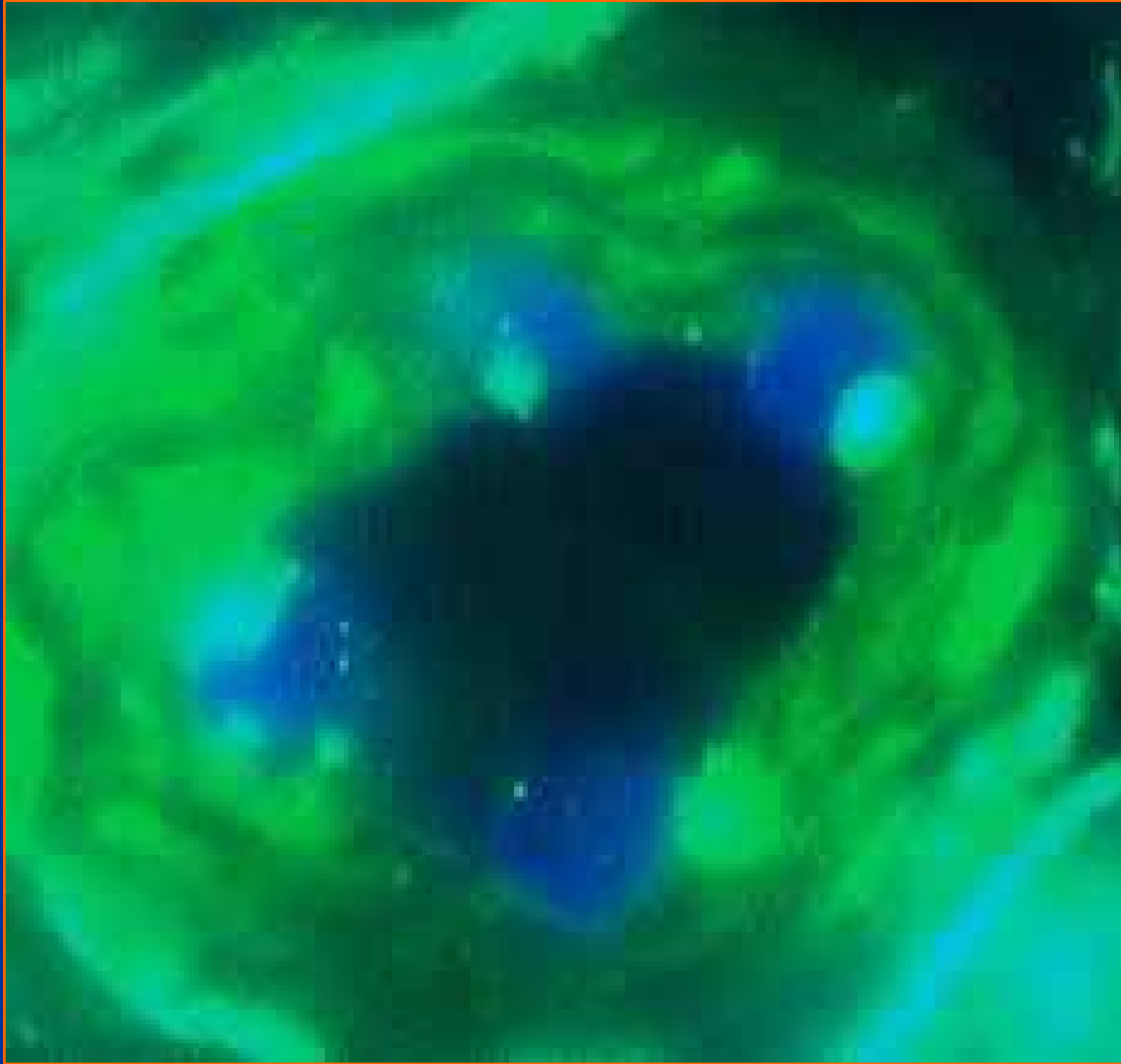
DNA: expanze u pacienta potvrzená

DMPK mRNA – norma: exprese není
známa

mRNA(CUG)n u pacienta: retinový
transkript v jádře v.t. ⇒

Protein: exprese není známa

DM1, Endotel



Schwannova buňka

DNA: expanze u pacienta potvrzená

DMPK mRNA – norma: exprese není
známa

mRNA(CUG)n u pacienta: retinový
transkript v jádře v.t. ⇒

Protein: exprese není známa

DM1,
Schwannova buňka



Fibroblast

DNA: expanze u pacienta potvrzená

DMPK mRNA – norma: exprese není
známa

mRNA(CUG)n u pacienta: retinový
transkript v jádře byl prokázán
(nedemonstrováno)

Protein: exprese není známa

Lymfocyt

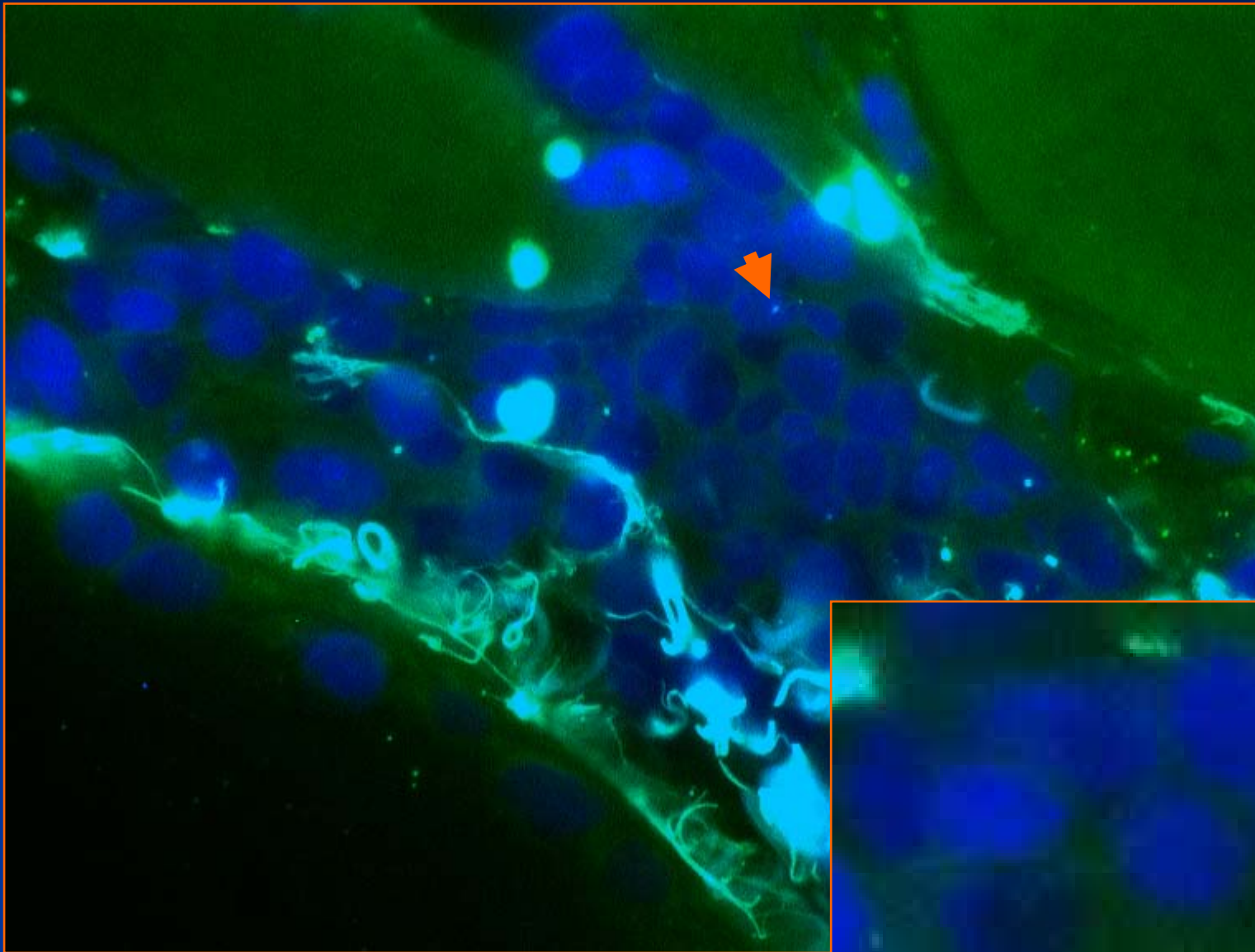
DNA: expanze u pacienta potvrzená

DMPK mRNA – norma: exprese není
známa

mRNA(CUG)n u pacienta: zcela ojedinělý
retinový transkript v jádře v.t. ⇒

Protein: exprese není známa

DM2, Lymfocyt



Exprese mRNA (CUG)n retinované v jádrech lidských tkání u DM – souhrn popsaných nálezů:

- Kosterní sval (fetální i diferencovaný)
- Hladký sval cévní medie
- Hladký sval fetálního GIT
- Endotel cévní
- Epitel stěny GIT (fetální)
- Schwannovy buňky
- Fibroblasty
- Lymfocyty ??

ZÁVĚRY:

DM1

Pacient č.:	South. blot [Počet repetice]		kost. sval	endotelie	media	Schwann. b.	FBL
1	350	průměr	0.78	0.18	0.77	-	-
		SD	0.65	0.40	0.86	-	-
		SE	0.15	0.12	0.17	-	-
2	1100	průměr	1.17	0.78	1.17	-	0.33
		SD	0.75	0.97	0.98	-	0.82
		SE	0.31	0.32	0.40	-	0.33
3	1400	průměr	1.23	0.75	1.00	1.02	0.10
		SD	1.02	0.86	1.25	0.88	0.32
		SE	0.14	0.21	0.11	0.13	0.10
4	150	průměr	1.69	0.63	1.86	-	0.15
		SD	1.18	0.82	0.68	-	0.51
		SE	0.24	0.22	0.24	-	0.67
5	670	průměr	1.31	0.89	1.52	1.67	0.25
		SD	0.92	0.80	0.78	0.58	0.46
		SE	0.11	0.13	0.15	0.33	0.16
6	400-750	průměr	1.50	0.95	1.00	--	--
		SD	0.55	0.71	0.00	--	--
		SE	0.22	0.16	0.00	--	--

DM2

Pacient č.:			kost. sval	endotelie	media	Schwann. b.	lymf. infiltrát
1		průměr	1.00	-	-	-	-
		SD	0.89	-	-	-	-
		SE	0.27	-	-	-	-
2		průměr	1.15	0.50	1.25	-	0.01
		SD	0.87	0.83	1.02	-	0.11
		SE	0.12	0.18	0.23	-	0.01
3		průměr	1.05	1.25	0.86	-	-
		SD	0.87	1.07	1.07	-	-
		SE	0.13	0.24	0.40	-	-
4		průměr	0.94	0.96	0.75	1.00	-
		SD	0.95	0.91	0.96	1.10	-
		SE	0.17	0.19	0.48	0.23	-

Frekvence pozitivních jader

Kost. sval	Endothel	Media	Schwann	Fbl
67	18	54		
84	45	67		17
69	50	58	66	10
81	49	68		8
84	69	93	100	75
100	74	100		
67 - 100	45 - 74	54 - 100	66 - 100	8 - 75

Kost. sval	Endothel	Media	Schwann	Fbl	Lymfo
55%					
75%	35%	70%			1%
70%	70%	42%			
62%	62%	50%	66%		
55 - 75	35 - 70	42 - 70	66		1

1. postižené tkáně u MD (kosterní + hladký sval) – vyšší frekvence pozitivních jader než u nepostižených tkání, taktéž vyšší počet retinovaných ohnisek mRNA(CUG)n
2. avšak výskyt retinovaných ohnisek i v tkáních, které nejsou výrazně postiženy a neexprimují DMPK protein

Program dalšího studia patogeneze MD:

Sledovat a porovnat expresi genu DMPK na úrovni transkripce a translace a zejm. detekce fokusů mRNA (CUG)_n v dosud nezkoumaných tkáních účastných v patogeneze DM a ve tkáních nepostižených tímto onemocněním

Sledovat přítomnost a lokalizaci (CUG)_n - vazebných proteinů u obou skupin tkání

