

# Komplexní diagnostika Duchennovy svalové dystrofie



Když jde do první třídy, už se velmi špatně hýbe, nemá rovnováhu a hodně padá.  
Než vyjde z devítky, je trvale invalidní, připoutaný na vozíku.  
A přijímaček na vysokou se nejspíš vůbec nedožije.  
Tak to vypadá, když má chlapec Duchennovu svalovou dystrofii.



Šestiletý Daniel trpí svalovou dystrofií.  
Je upoután na vozíku a jeho svalstvo postupně ochabuje.  
Naděje, že se chlapec dožije dospělosti, je velmi malá.

# Duchennova svalová dystrofie

- genetická choroba
- tělo nemocného při ní není schopné produkovat svalovou bílkovinu dystrofin
- důsledku toho začnou svaly postupně ochabovat: nejprve kosterní, pak dýchací a nakonec i srdce
- světově nejrozšířenější forma svalové dystrofie
- postihne jednoho ze tří tisíc narozených chlapců
- v Česku je evidováno asi pět stovek nemocných

# Duchennova svalová dystrofie

poprvé posána



**Guillaume Benjamin Amand Duchenne**

*narozen. 17. září 1806, Boulogne, Francie*

*zemřel 15. září 1875, Paříž, Francie*

- francouzský neurolog
- popsal několik nervových a svalových poruch

- Aplikoval elektrody, za jejichž pomoci se zjišťoval průběh stahování svalových vláken.

- Vyšetřoval všechny hlavní povrchní svaly za použití elektrod

- Byl schopen rozlišit normální a nenormální svalovou reakci.

A handwritten signature in cursive script, likely reading 'Duchenne' followed by a flourish. The ink is dark and the paper is aged and yellowed.

# Beckerova svalová dystrofie

## mírnější verze

- nápor nemoci se projeví obvykle později (propuká kolem desátého roku života)
- progrese je pomalejší
- prognózy hůře předvidatelné
- u chlapců s tímto typem nemoci sice tělo dokáže dystrofin vyrobit, ale pouze v malém množství a ve špatné kvalitě
- vyskytuje se u 1 chlapce z 18 000 narozených
- jako první popsal německý genetik Peter Emil Becker v roce 1955

# Duchennova svalová dystrofie

## průběh nemoci

- **první příznaky se projeví mezi 3. – 6. rokem života**

začnou později chodit

zvětšené lýtkové svaly - hypertrofie

jsou nemotorní

často padají

nemohou pořádně běhat či chodit do schodů

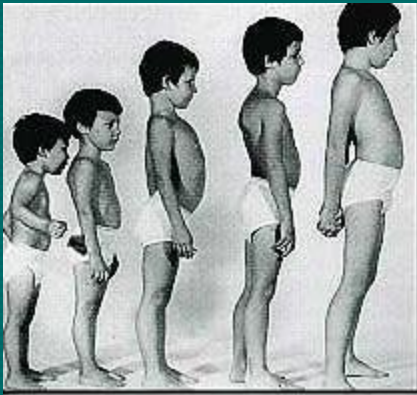
mají potíže při vstávání ze země



# Duchennova svalová dystrofie

## Průběh nemoci

- ve školním věku



většinou chodí po špičkách, protože mají drasticky zkrácené Achillovy šlachy

mění se i držení těla, záda se prohýbají, břicho se naopak vysunuje vpřed



# Duchennova svalová dystrofie

## Průběh nemoci

- do 13. let definitivně přestanou chodit a jsou odkázáni na invalidní vozík



všechny aktivity, při kterých musí být zapojeny svaly rukou a nohou a trupu vyžadují pomoc

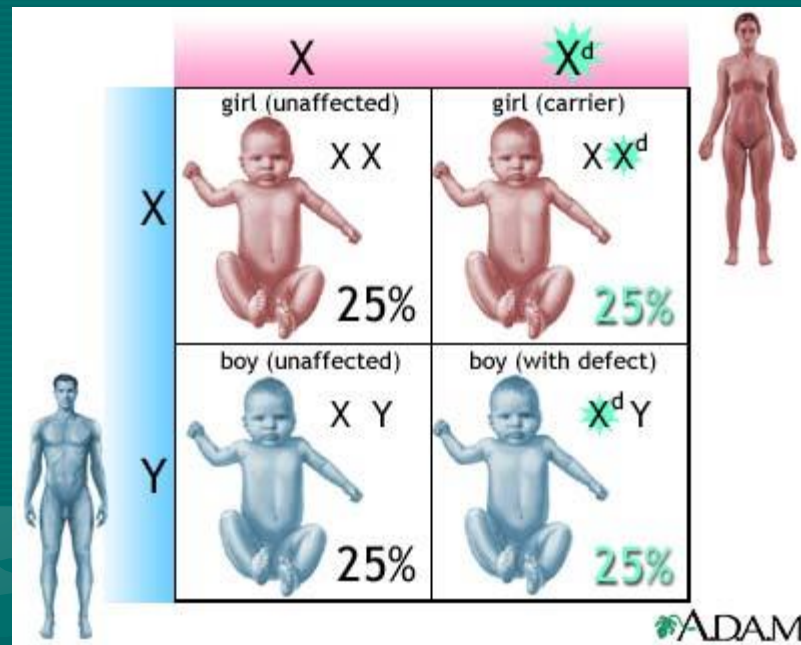
- 20. narozeniny už zpravidla neoslaví.



# Duchennova svalová dystrofie

## dědičnost X-recesivní

- DMD lokus Xp21



DMD v 99,9% postihuje výlučně chlapce (ve vzácných případech mohou onemocnět děvčata)

# Duchennova svalová dystrofie

## dystrofinový gen

Jeden z největších známých lidských genů 2,4 Mb

- 79 exonů
- 14 kb mRNA transkript

exprese ve skeletálním svalstvu a mozku

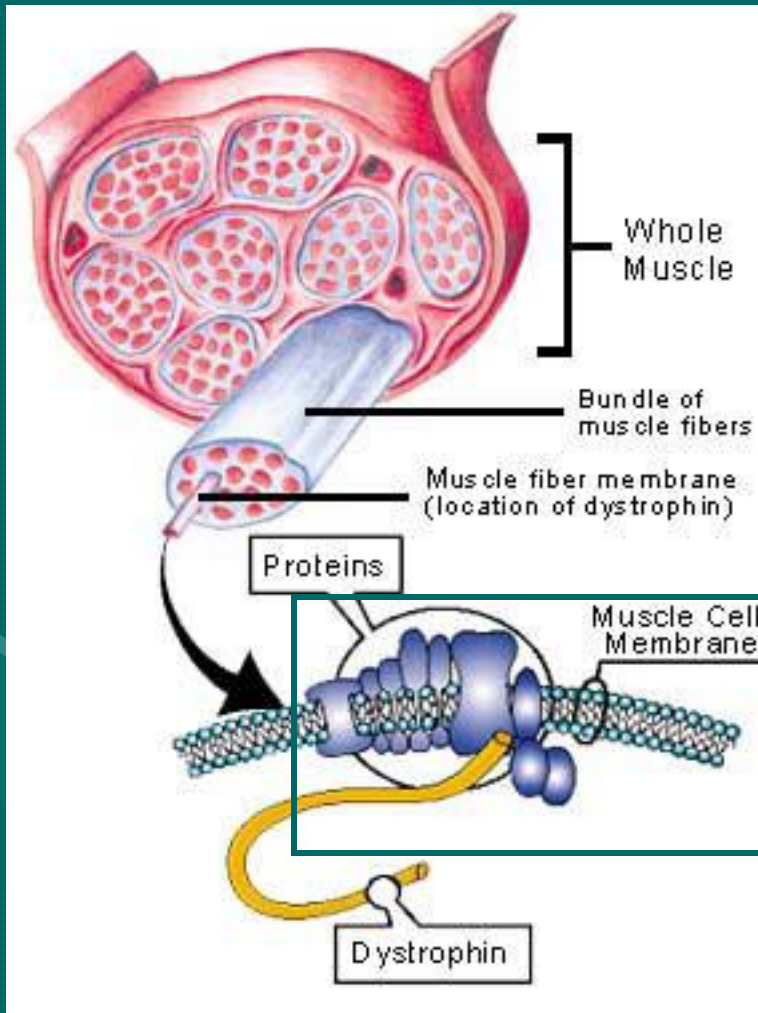
produkt – **dystrofin**

### Mutace

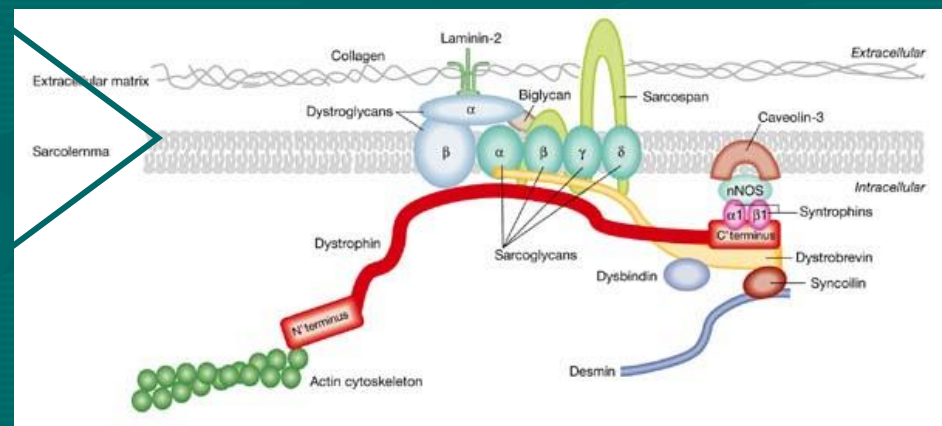
- 96% frameshift mutací
- 60-70% rozsáhlých delecí a duplikací
- 30% nových mutací
- 10-20% nových mutací jsou gonodální mozaiky

# Duchennova svalová dystrofie

## Dystrofin



- 427 kDa
  - sarkolemární protein
- společně s jinými proteiny zajišťuje spojení extracelulární matrix a cytoplasmatického cytoskeletonu



dystrofin asociovaný proteinový komplex

# Duchennova svalová dystrofie

## Dystrofin

### DMD pacienti

dystrofin fakticky chybí



normální dystrofin



dystrofin chybí



oblasti chybějícího dystrofinu u heterozygotů

### BMD pacienti

- 10-40% normálního množství dystrofinu
- produkce částečně funkčního dystrofinu v alternativním množství

Determinace kvantity a distribuce dystrofinu imunohistochemickým barvením svalových biopsií

- může potvrdit přítomnost dystrofinopatie
- umožňuje diferenciaci mezi DMD a BMD
- výsledek nemusí být vždy přesný

**Pouze identifikace patogenní DMD mutace dává absolutní diagnostickou jistotu**

# Duchennova svalová dystrofie

## Algoritmus molekulárně genetického vyšetření

1. Detekce delecí DMD exonů v *hot spot* oblastech dystrofinového genu
2. MLPA
3. Sekvenování kódujících oblastí DMD genu
4. Nepřímá DNA dignostka

# Duchennova svalová dystrofie

## Detekce delecí DMD exonů

Základní molekulárně genetická diagnostika  
založena

na detekci delecí DMD exonů v *hot spot* oblastech dystrofinového genu

DMD *hot spot* oblasti

DMD exony 1 – 22

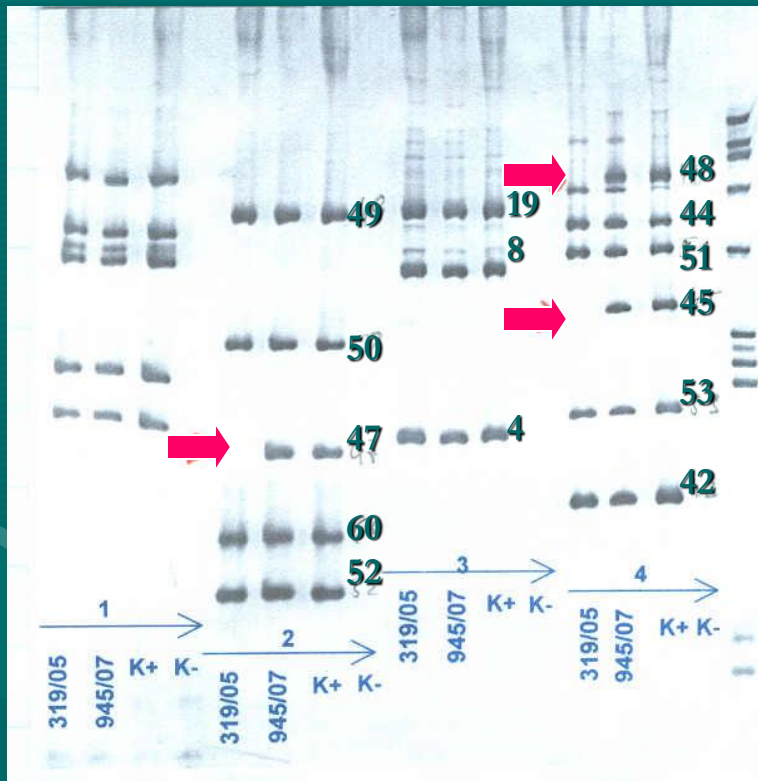
DMD exony 44 - 54

Prováděna multiplex PCR – amplifikace promotorové oblasti a 18 DMD exonů



# Duchennova svalová dystrofie

## Detekce delece DMD exonů



### 4 sety multiplex PCR

#### Zkumavka 1

Pm 535 pb  
exon 3 410 pb  
exon 43 357 pb  
exon 13 238 pb  
exon 6 207 pb

#### Zkumavka 2

exon 49 439 pb  
exon 50 271 pb  
exon 47 181 pb  
exon 60 139 pb  
exon 52 113 pb

#### Zkumavka 3

exon 19 459 pb  
exon 8 360 pb  
exon 4 196 pb

#### Zkumavka 4

exon 48 506 pb  
exon 44 426 pb  
exon 51 388 pb  
exon 45 307 pb  
exon 53 212 pb  
exon 42 155 pb

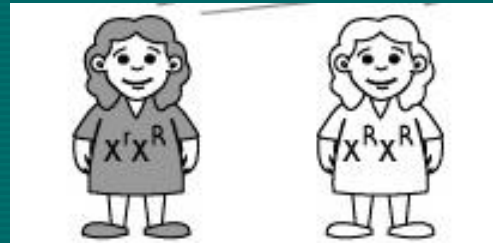
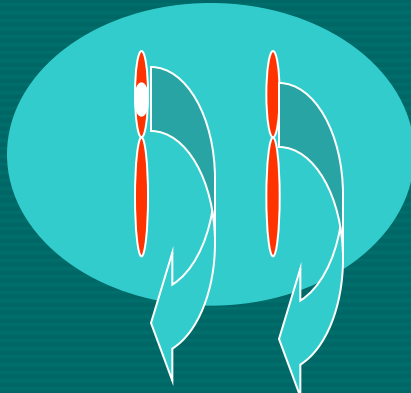
**potvrzena DMD:**

**delece DMD exonů 45, 47, 48**

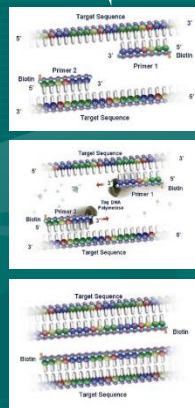
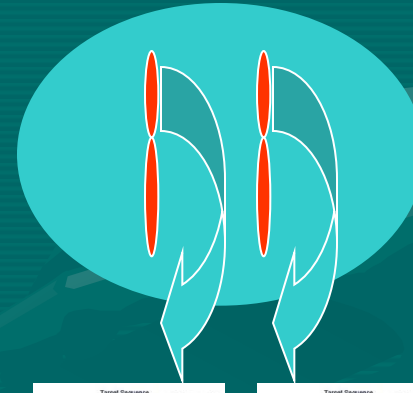
# Duchennova svalová dystrofie

## Detekce delece DMD exonů

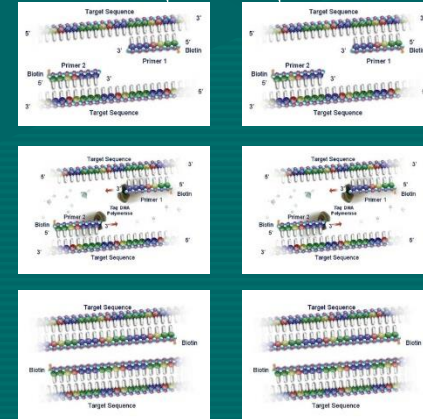
Multiplex PCR neodhalí ženu přenašečku



žena přenašečka      žena nepřenašečka



vždy PCR produkt





# Duchennova svalová dystrofie

MLPA

MRC-Holland b.v.



MLPA<sup>®</sup>

Multiplex Ligation Probe  
Amplification

# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

“Multiplex gene dosage analysis made easy”

Poprvé popsána: Schouten JP et al. (2002)

-Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification.  
*Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):e57.

- detekce aberantních DNA sekvencí jednoduchým provedením na základě PCR reakce
- minimum pouze 20 ng DNA
- Lze analyzovat degradovanou DNA
  - extrahovanou z tkání v parafinových bločcích
  - extrahovanou z tkání ve formalínu
  - volnou fetální DNA získanou z maternální plasmy
- diskriminuje sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu
- determinuje metylační status promotrů
- detekce známých mutací a SNP

# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Přístroje



termocykler



DNA analyzátor

# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### MLPA techniky

1. Denaturace
2. Hybridizace
3. Ligace
4. Amplifikace

# Duchennova svalová dystrofie

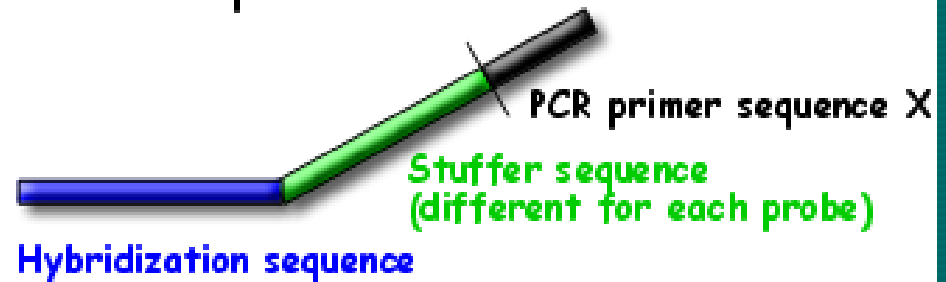
## MLPA

### SALSA MLPA proby

Synthetic oligonucleotide  
50-60 bp



M13-derived oligonucleotide  
60-450 bp

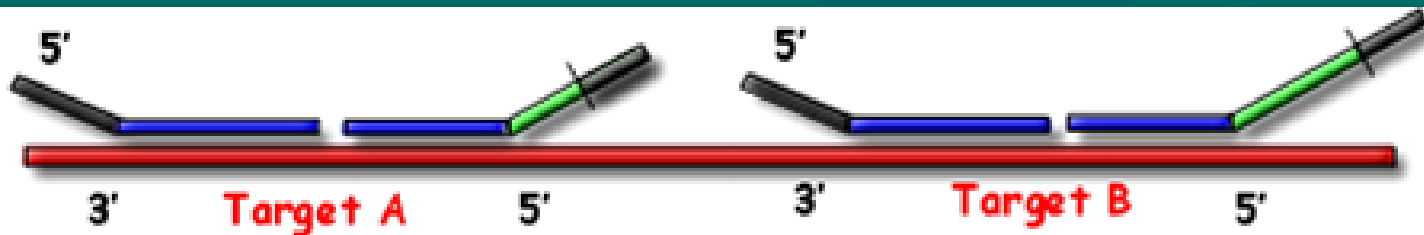


# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Hybridizace

1. MLPA probemix je přidán k denaturované genomické DNA
2. Dvě části každé probe hybridizují k odpovídající sekvenci

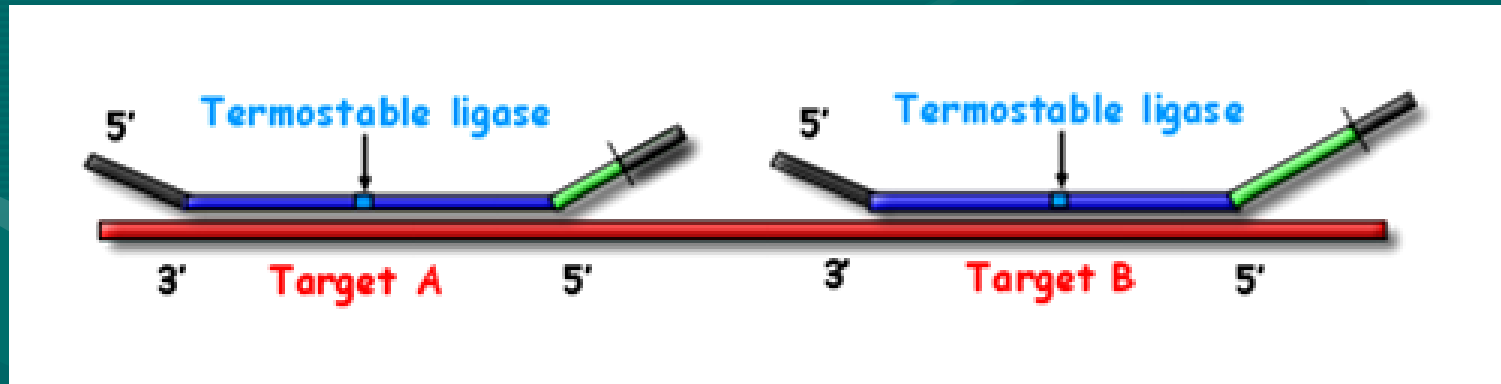


# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Ligace

3. Proby jsou ligovány termostabilní ligásou

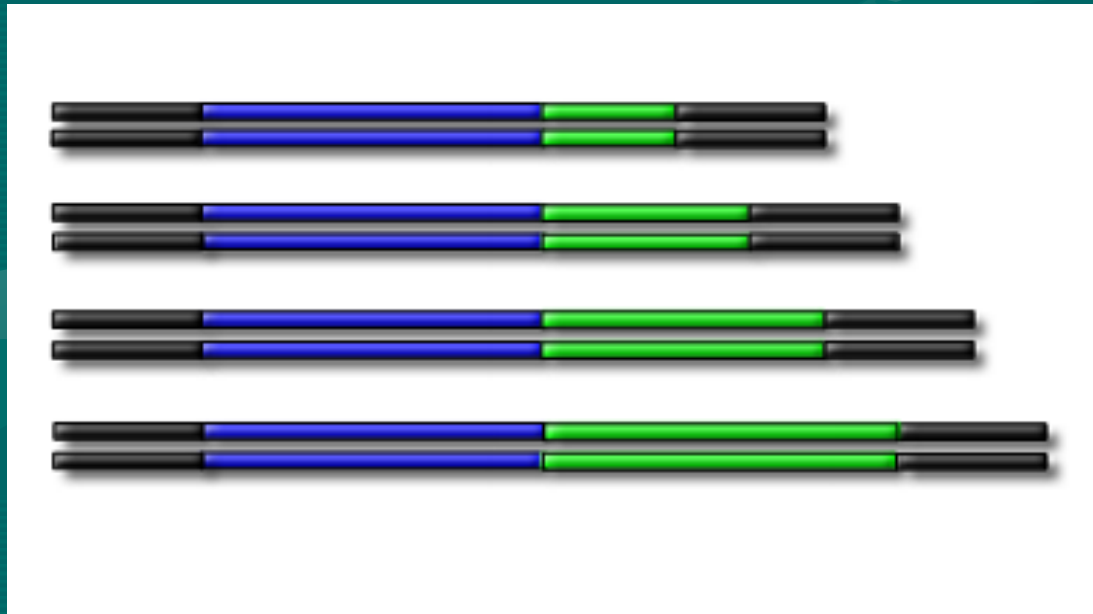


# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Amplifikace

4. Pár univerzálních primerů je použit k amplifikaci všech ligovaných práb.  
Amplifikační produkt každé próby má unikátní délku (130 –480 bp)





# Duchennova svalová dystrofie

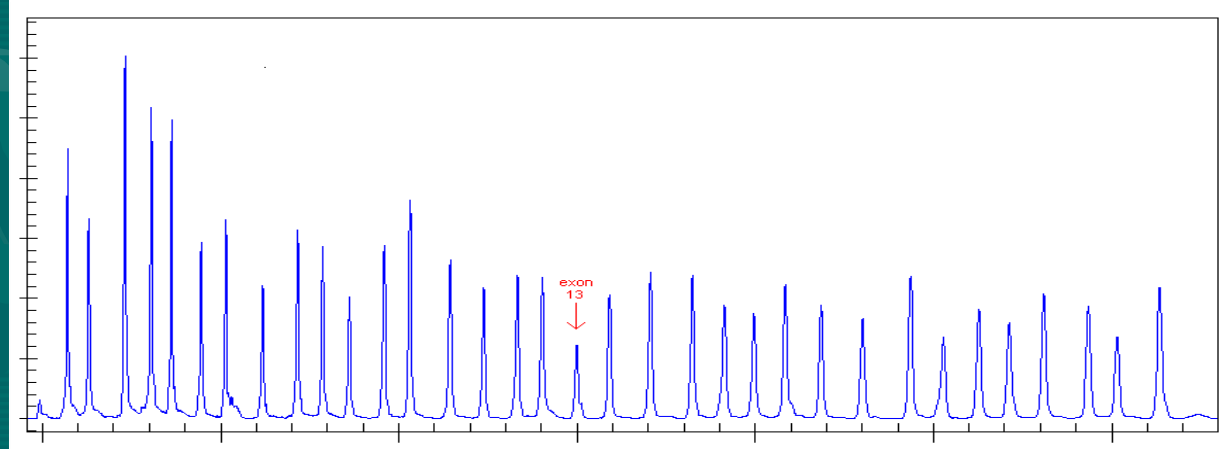
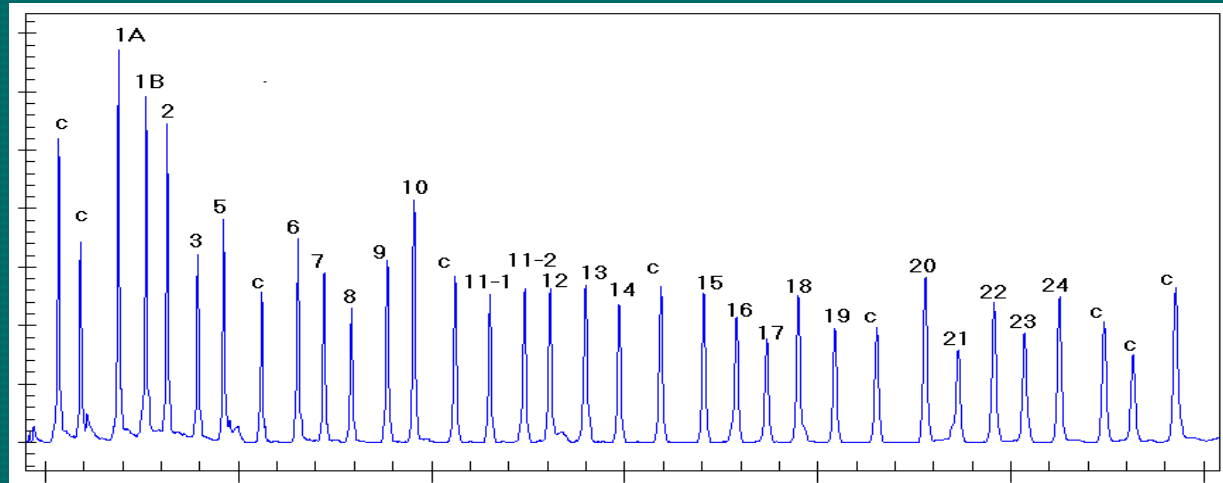
## MLPA

### Separace a kvantifikace kapilární elektroforézou

Každý pík je  
amplifikační produkt  
specifické proby

Vzorky jsou porovnávány  
s kontrolním vzorkem

Rozdíl v relativní výšce  
nebo ploše píku  
v cílové sekvenci próby



# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Salsa MLPA Kit P034/P035 DMD/Becker

Detekuje delece a duplikace všech exonů DMD genu

#### DMD muž

delece probě odpovídající sekvence se projevuje absencí amplifikačního produktu proby

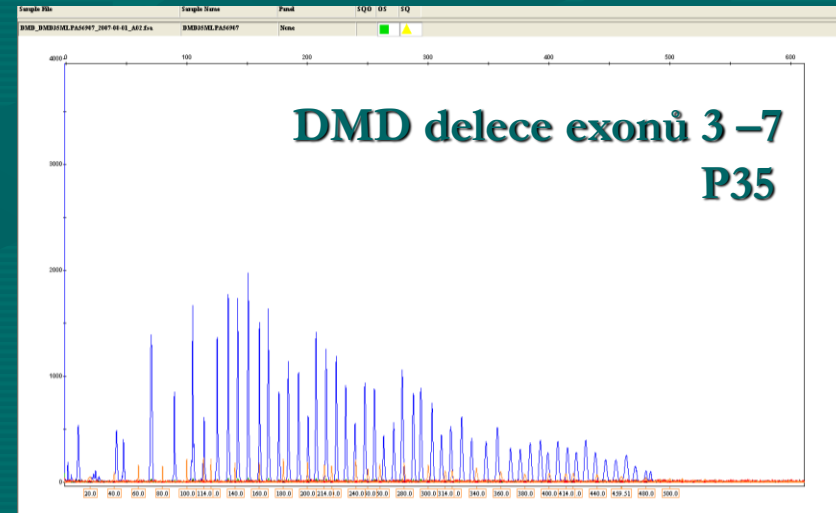
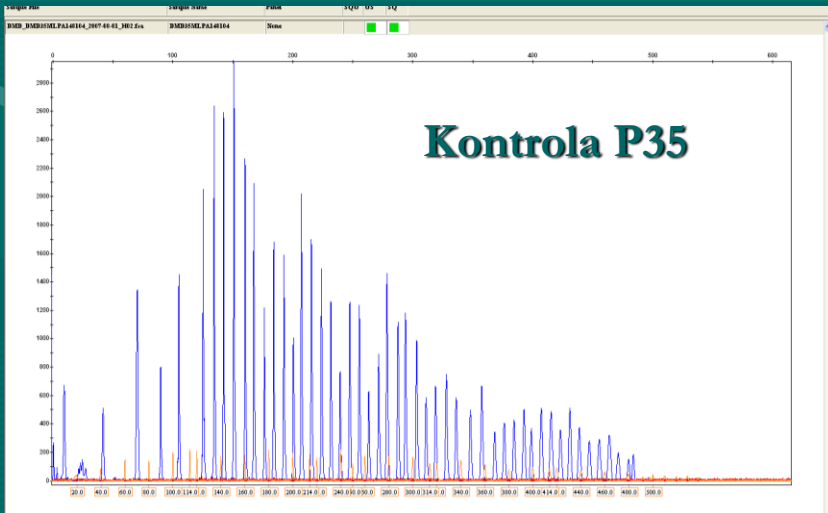
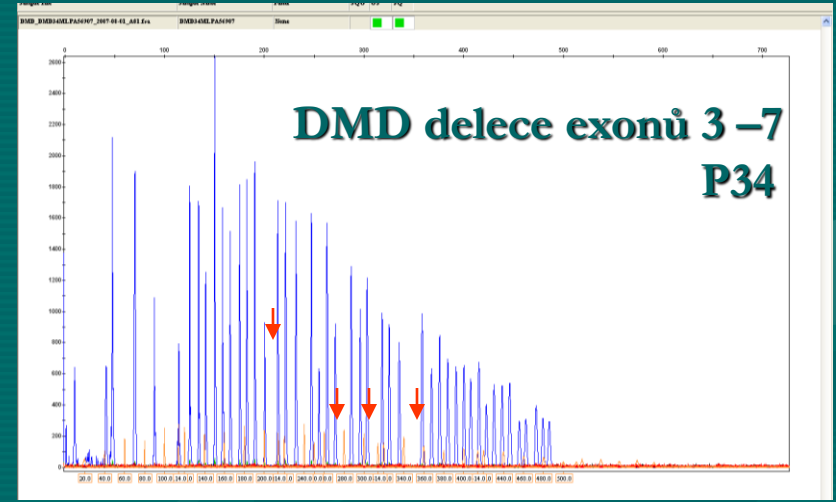
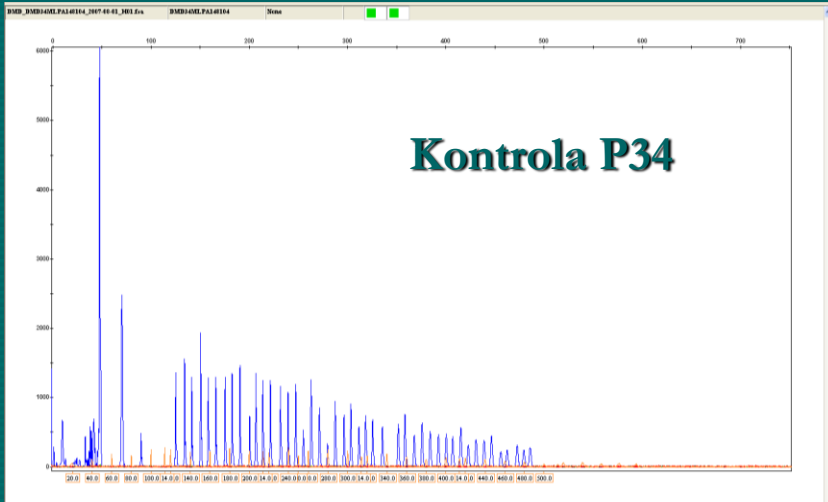
#### DMD žena přenašečka – heterozygot

30- 35% redukována plocha píku amplifikačního produktu příslušné proby

Mutace/polymorfismy ležících v místech dosedání prob mohou také způsobit redukcii plochy píku – delecii jednoho exonu nutné ověřit jinou metodou

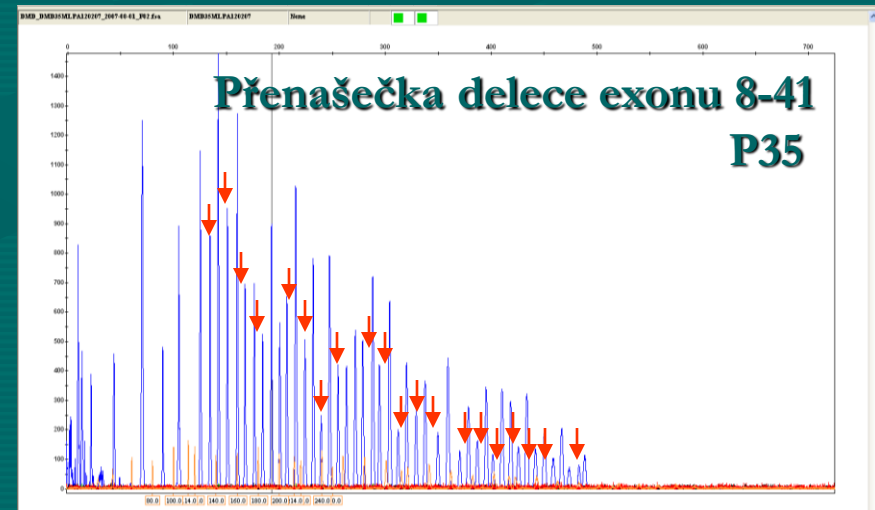
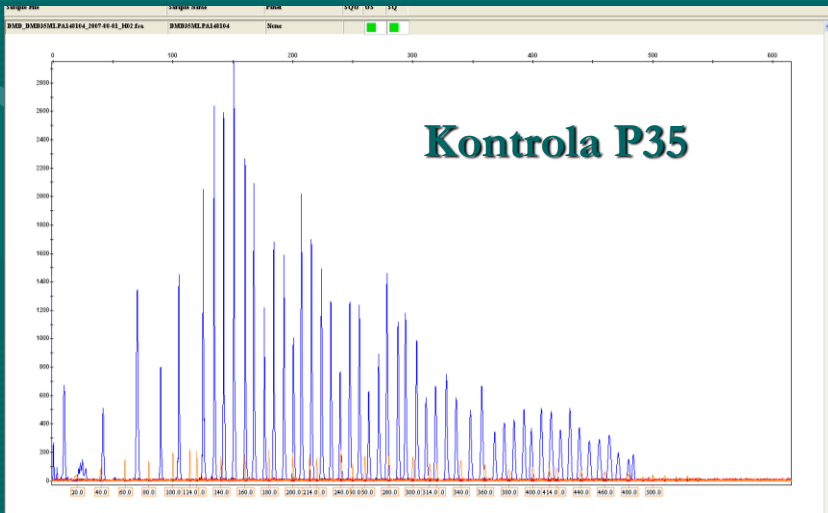
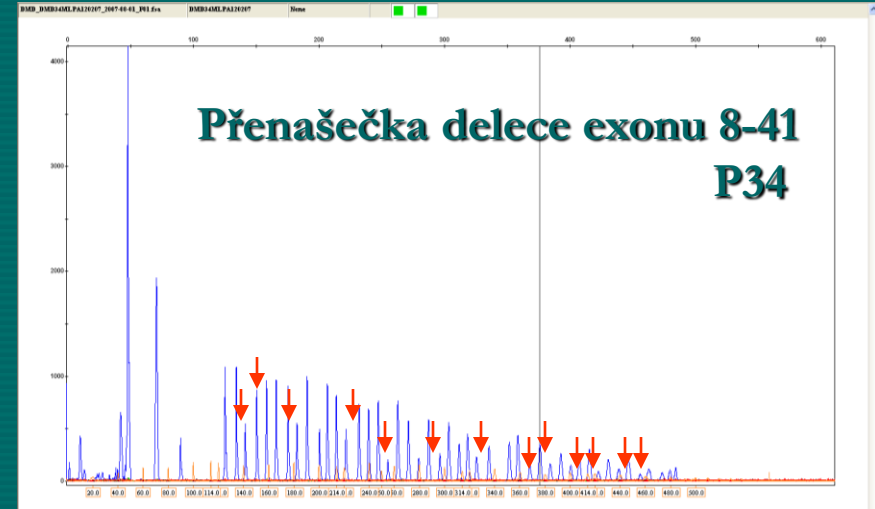
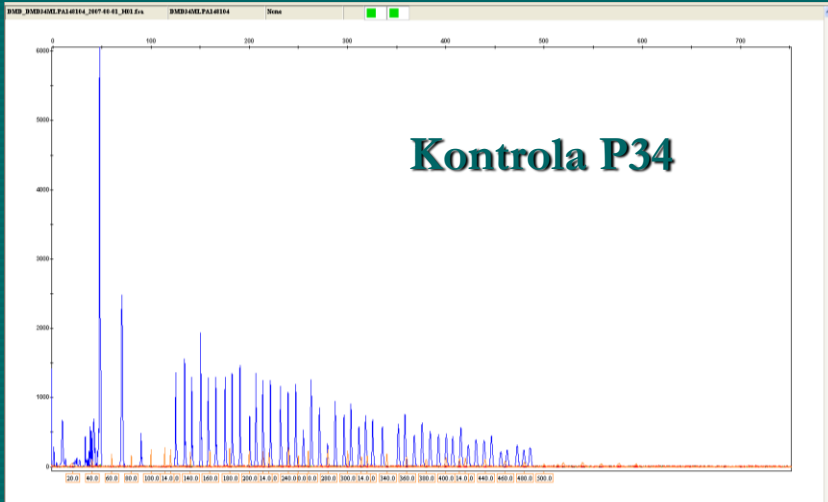
# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA



# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA



# Duchennova svalová dystrofie

## MLPA

### Příklad zápisu výsledku

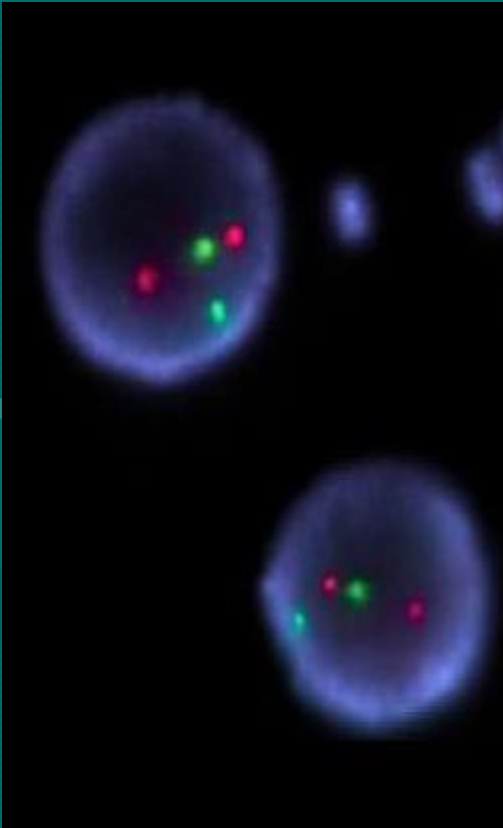
Byla detekována duplikace DMD exonu 2 dystrofinového genu,  
c.263+?\_347-?dup,  
g.32948164+?\_32948247-?.  
Tato duplikace porušuje čtecí rámeček.

<http://www.dmd.nl/> tam vlezte do DMD exonic deletions/duplications reading-frame checker 1.9

# Duchennova svalová dystrofie

## FISH

**Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace lze**  
lokalizovat cílové nukleotidové sekvence  
přímo v buňkách (*in situ*).



*Metoda FISH*

*je*

založena na schopnosti jednořetězcové DNA sondy vázat komplementární úsek cílové DNA fixované na mikroskopickém skle.

# Duchennova svalová dystrofie

Život s dystrofií se podobá temnému tunelu, kde je lepší nevidět konec.  
Světýlek naděje na léčbu v něm bliká málo.  
Ale nyní se z temnoty tunelu ozývá veselý psí štěkot.



Na žádnou z podob svalové dystrofie nebyl zatím nalezen účinný lék.....ale!!!

# Duchennova svalová dystrofie

## Léčba

### Mesengioblasty

- kmenové buňky získané ze stěn cév krevního oběhu
- schopné diferenciaci na svalová vlákna a produkce dystrofinu
- čtyři z pěti psů se postavili na nohy
- transplantované buňky pronikly do svalů v různých částech těla, zapojily se do nich a pomohly k nápravě
- v některých svalech až 70% vláken dárcovského původu

*Giulio Cossa, Nature, listopad 2006*

### Exon skipping

- AON (antisense oligonukleotid)
- zabraňuje transkripci poškozených exonů
- vzniká zkrácený funkční protein

