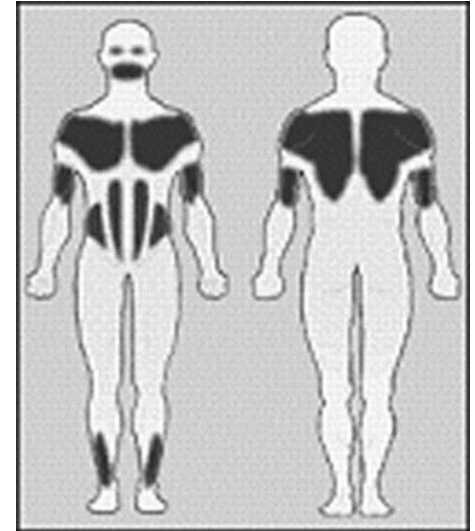


Facioskapulohumerální svalová dystrofie

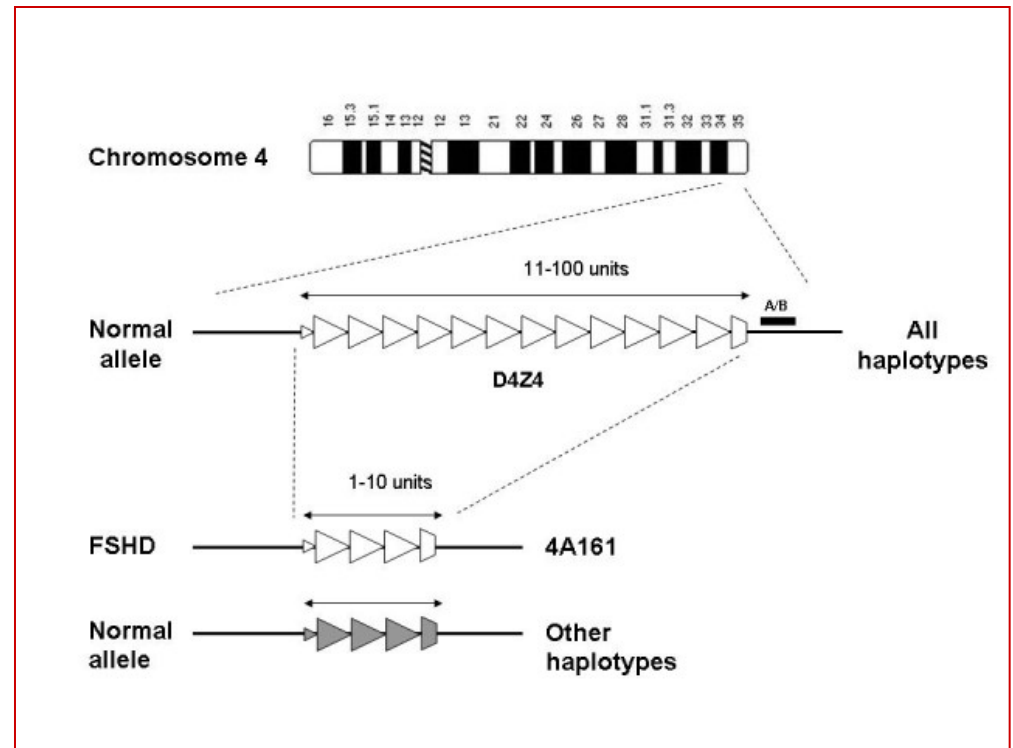
- AD dědičnost, incidence 1:20 000, charakterizována slabostí a atrofií svalů obličeje, nadloktí a ramenního pletence.

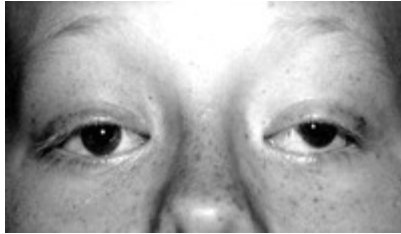
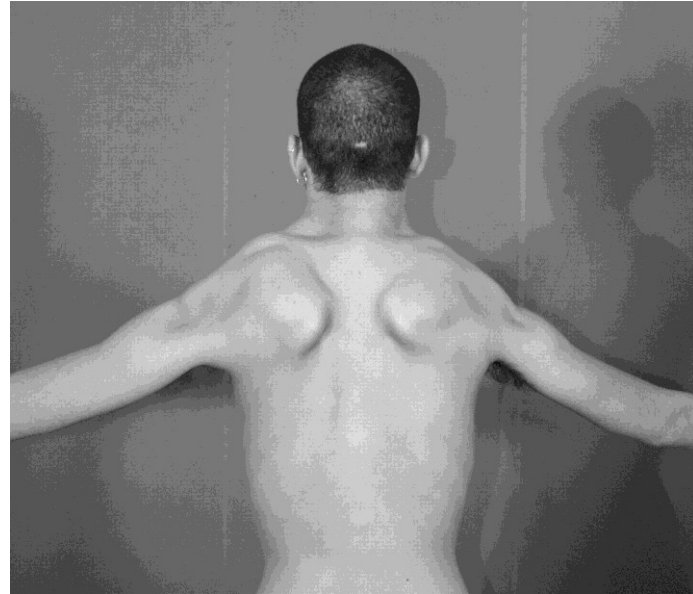
- FSHD lokus: subtelomerická oblast 4 chromozomu (4q35).



Repetice D4Z4

- 11-110 repetice D4Z4 (normální DNA),
- 1-10 repetice D4Z4 (pacienti s FSHD)





Tandemové repetitivní sekvence

- **Mikrosatelitní repetice**: velikosti repetitivní jednotky 1-4 pb,
- **Minisatelitní repetice**: velikost repetitivní jednotky 5-100 pb,
- **Makrosatelitní repetice**: velikost repetitivní jednotky >100 pb.

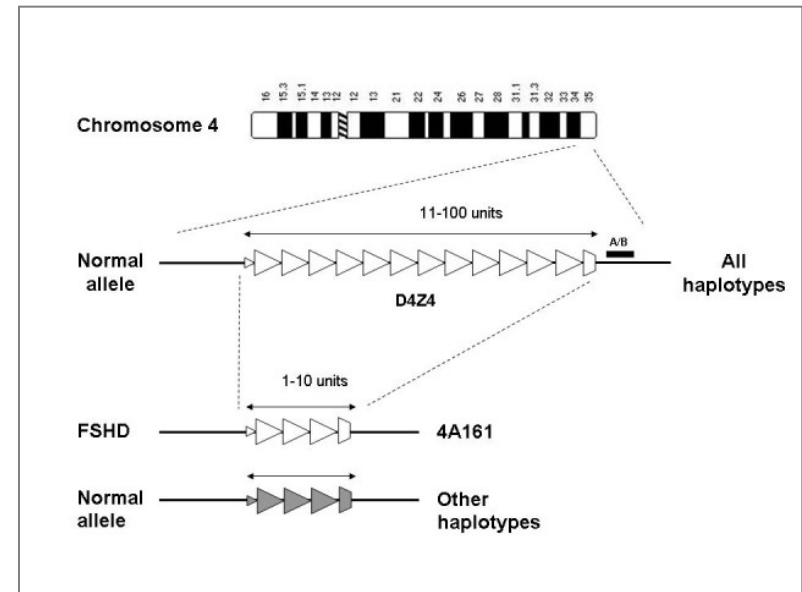
Makrosatelitní repetice

- Většina makrosatelitních repetic je lokalizována v oblasti centromer.
- Makrosatelitní repetice lokalizované mimo centromery (RNU2, DXZ4, **D4Z4**, ...).
- **D4Z4** - jediná makrosatelitní repetice, která je asociována s chorobou.

Velikost D4Z4 repetice: 3.3-kb

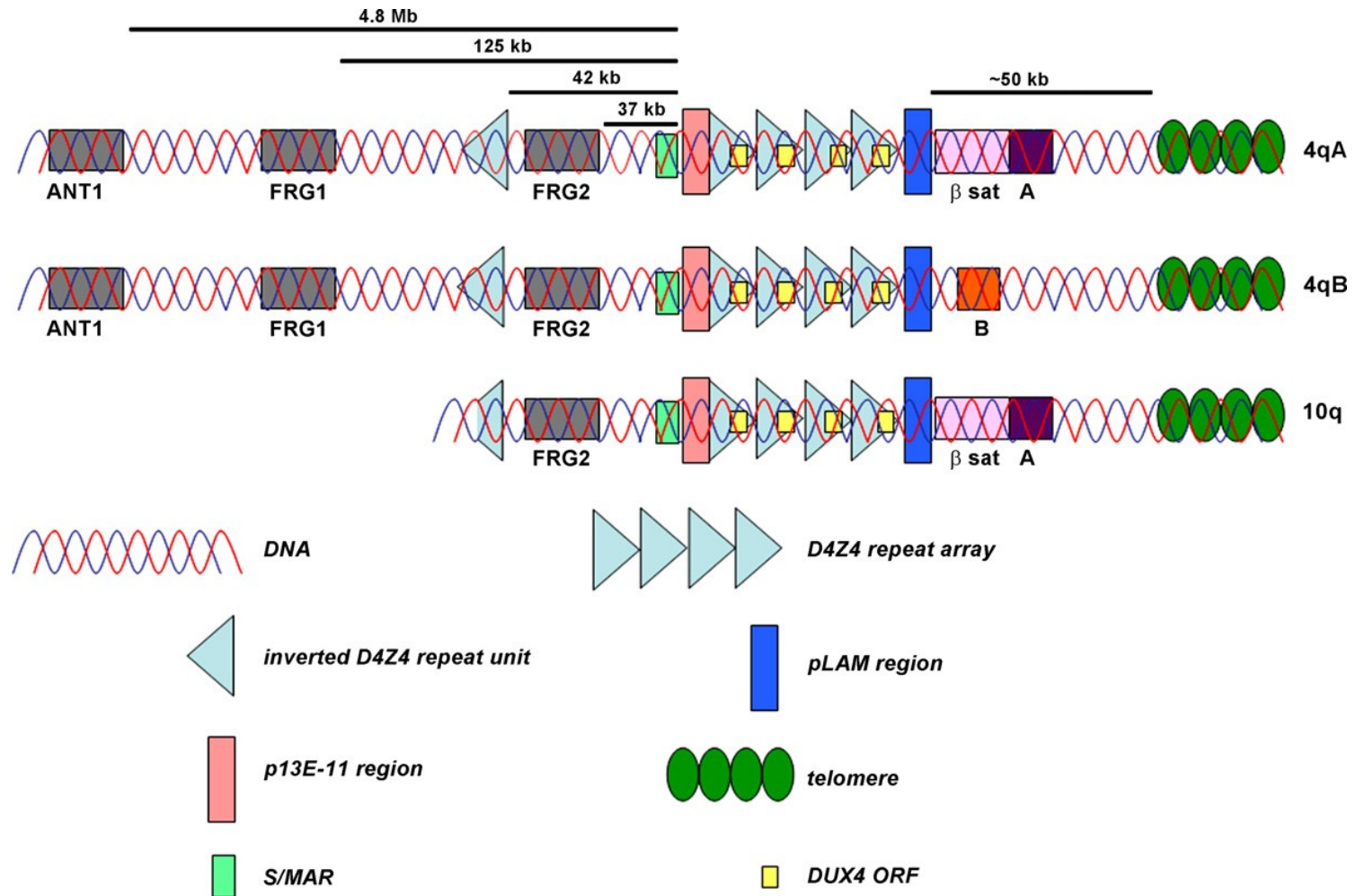
- **Normální DNA: 11-100 D4Z4 (330 kb)**
- **FSHD pacienti: 1-10 D4Z4 (<33 kb)**

- Byly identifikovány dvě alelické varianty 4q35 subtelomery (4qA a 4qB), které jsou podobně zastoupeny v běžné populaci; alela 4qA se od alely 4qB liší přítomností beta-satelitní repetice o velikosti 6,2 kb.
- **FSHD je asociovaná s delecí repetice D4Z4 na alele 4qA (delece D4Z4 na alele 4qB nezpůsobí fenotyp FSHD)!!!**



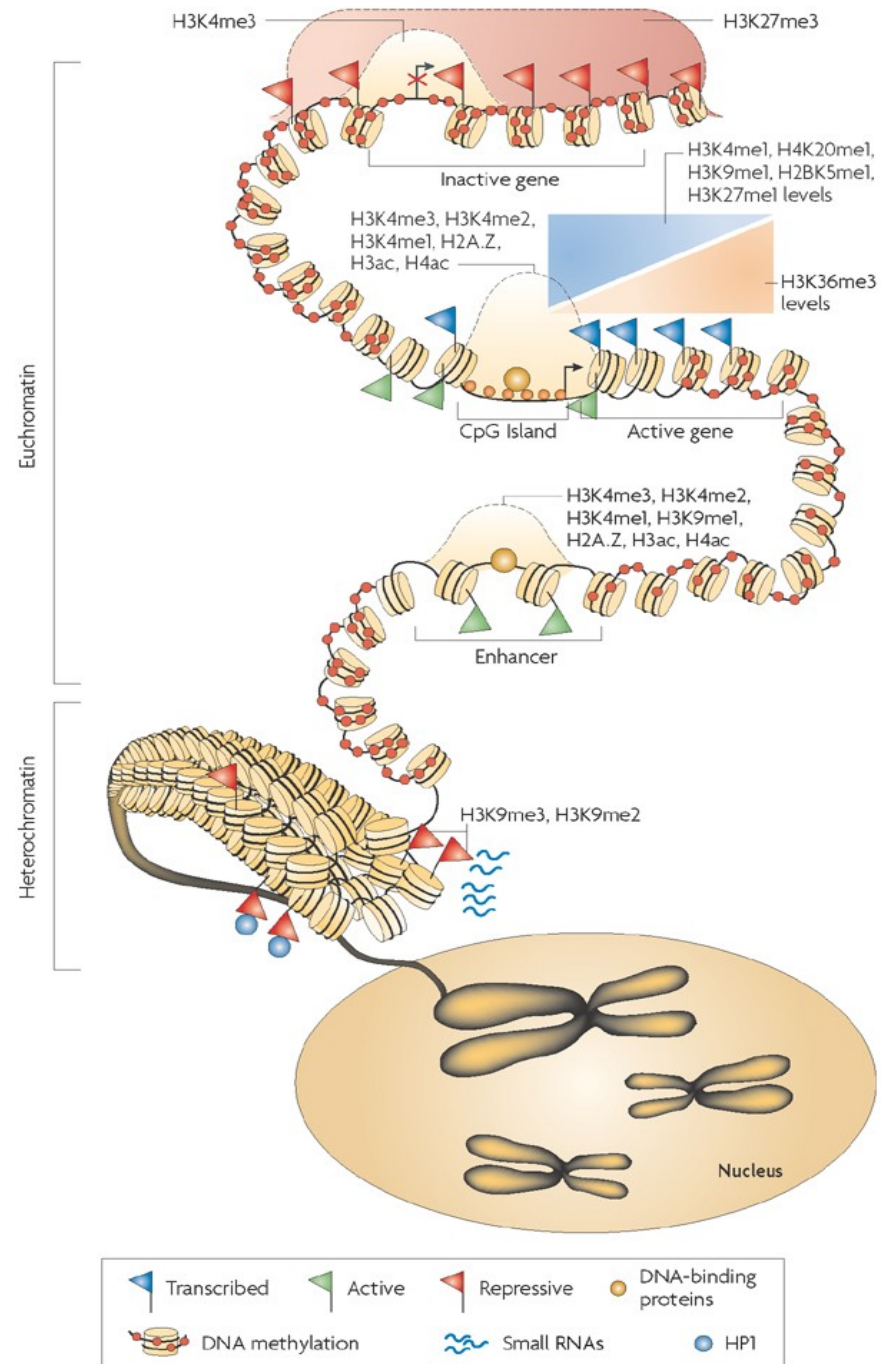
• **Monosomie subtelomery 4q35 nezpůsobí FSHD!!!!**

- Malé procento FSHD pacientů (5%), jsou tzv. „**phenotypic**“ FSHD **pacienti – nemají delecí D4Z4 v oblasti subtelomery 4q35!!!**

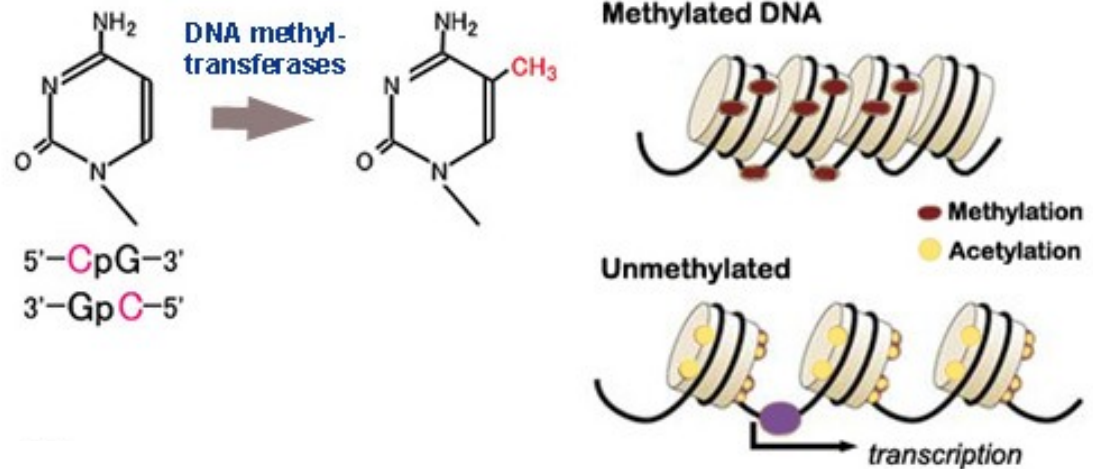


Schematic map of 4qA, 4qB and 10q. The subtelomere of chromosome 10q contains a repeat array that is highly homologous to D4Z4 on 4qter. The homology extends both in proximal (~40 kb upstream) and distal direction. In addition, two allelic variants of the 4q subtelomere have been identified. The presence of beta satellite DNA distal to D4Z4 on 4qA-type alleles is the most prominent difference between these allelic variants.

- Cytosine of CpG dinucleotides can be methylated. The presence of methyl CpG on DNA is associated with increased **chromatin condensation and gene silencing**.
- When a promoter region is methylated, transcription factors cannot bind. On the other hand, the methyl binding domain proteins bind specifically to methylated DNA. Subsequently, these proteins can recruit histone deacetylases and histone methyltransferases, resulting in increased chromatin condensation and recruitment of the chromatin silencer **heterochromatin protein 1 (HP1)**.



- Makrosatelitní repetice jsou bohaté na CpG a jsou tak vhodnými kandidáty pro metylaci DNA.
- D4Z4 repetice obsahuje 290 CpG dinukleotidů.



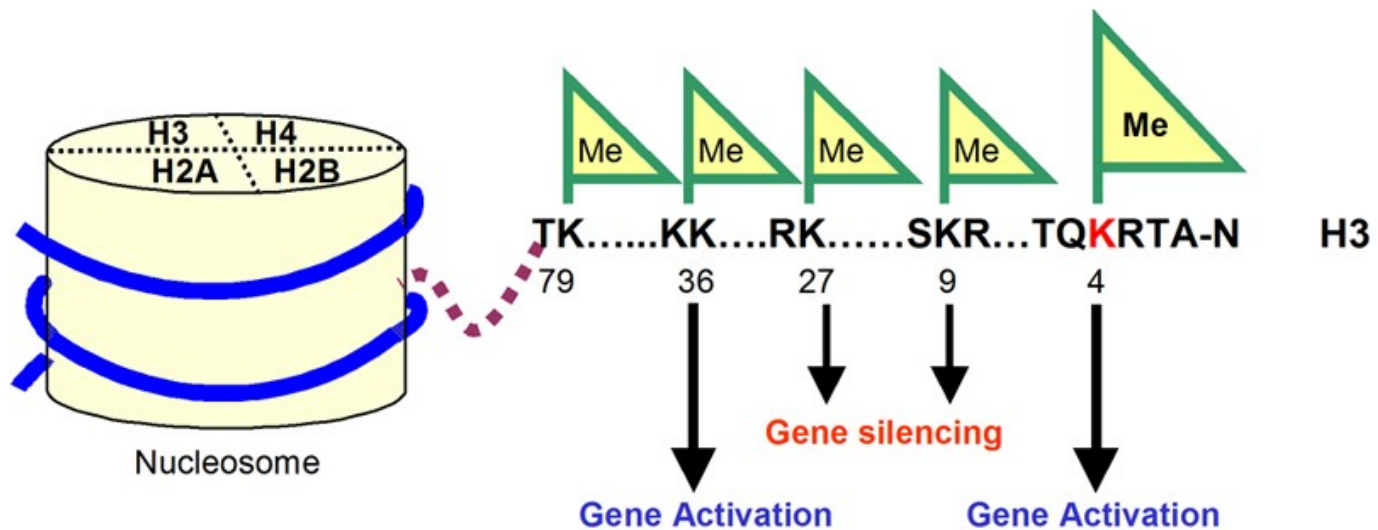
- **FSHD pacienti s delecí D4Z4 i „phenotypic“ FSHD pacienti mají sníženou hladinu DNA metylace repetice D4Z4 na chromozomu 4q.**
- DNA hypometylace D4Z4 je u „phenotypic FSHD“ výraznější a je přítomna na obou alelách chromozomu 4q, zatímco u FSHD pacientů s delecí D4Z4 je DNA hypometylace omezena na chromozom 4q s delecí.

- FSHD pacienti s 1-3 D4Z4 mají výraznější D4Z4 hypometylaci než pacienti s 4-10 D4Z4.
- Pacienti s 4-10 D4Z4 vykazují velkou interindividuální variabilitu hypometylace D4Z4.
- Normální DNA (11-100 D4Z4) nevykazuje žádný vztah mezi D4Z4 metylací a počtem repetit D4Z4.

Delece repetit D4Z4 na chromozomu 4qB i chromozomu 10q (tj. delece neasociované s FSHD) jsou taky spojeny s DNA hypometylací D4Z4.

**→ D4Z4 hypometylace je nutná ale ne dostačující k rozvinutí FSHD
→ další epigenetické faktory a sekvenční polymorfismy determinují rozvoj FSHD.**

- Chromatin - DNA, histone proteins and other chromosomal proteins. A major function of chromatin is packaging of the DNA in the nucleus.
- Histone proteins may undergo several posttranslational modifications (acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination).
- Histone modifications may directly affect chromatin structure by preventing transcription factor binding, altering the interactions between nucleosomes or changing the interactions of the histone tails with the DNA in the nucleosome. On the other hand, histone modifications may serve as a site for recruitment of chromatin-associating proteins that recognize a specific histone code.
- Specific histone modifications seem to be associated with either transcriptional activation or transcriptional repression. Methylation at lysine residues 4, 36 and 79 of histone H3 has been correlated with transcriptional activation. In contrast, **methylation at lysine residues 9 and 27 of histone H3** and at lysine residue 20 of histone H4 has been linked to heterochromatin and gene repression.

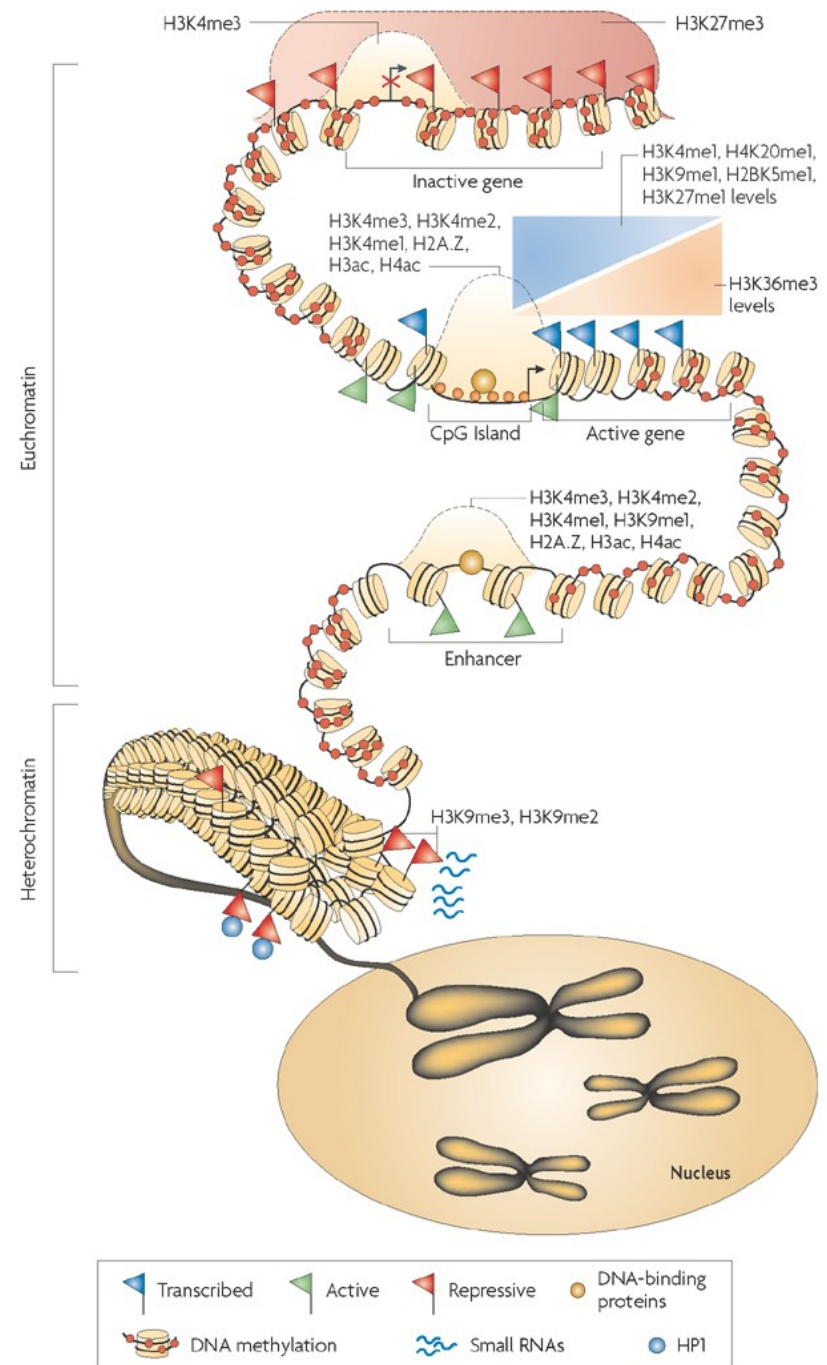


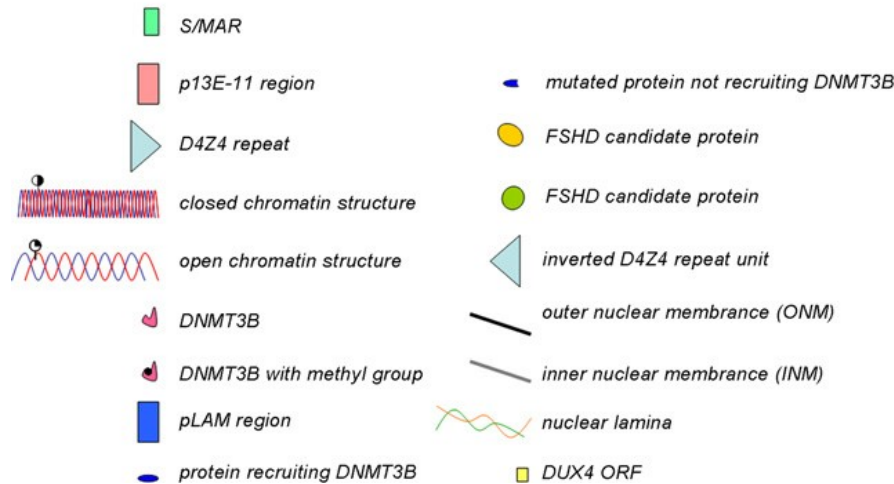
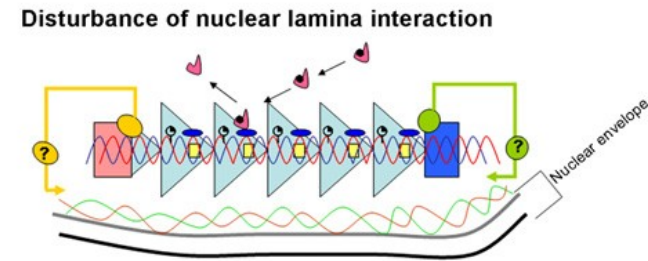
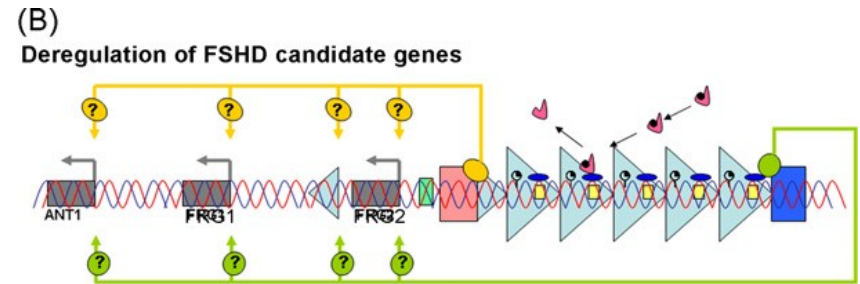
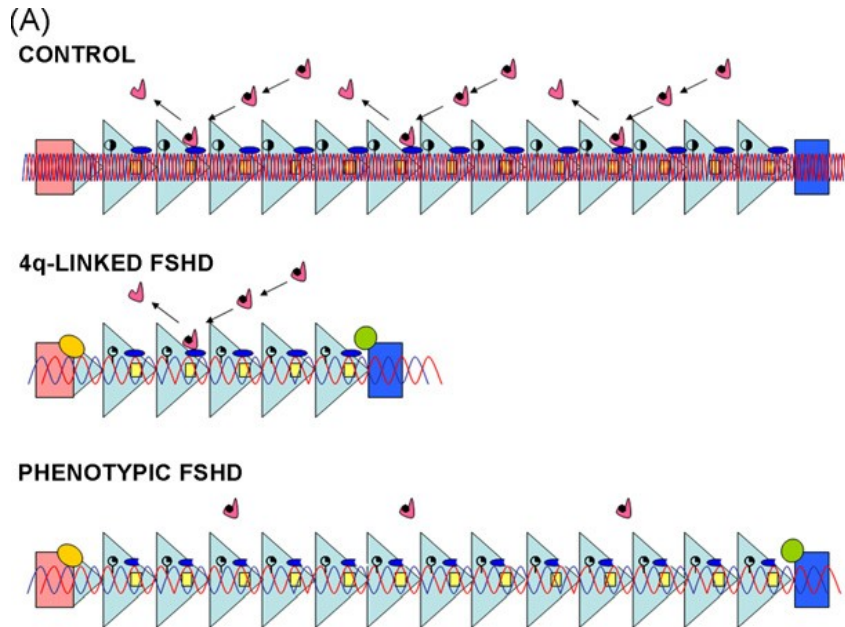
FSHD je asociována s epigenetickými změnami chromatinu – DNA metylace, modifikace H3K9me3

- Normální alela 4q35: DNA metylace, modifikace H3K9me3

- FSHD alela s delecí D4Z4: DNA hypometylace, ztráta modifikace H3K9me3

- „phenotypic“ FSHD pacienti: DNA hypometylace, ztráta modifikace H3K9me3

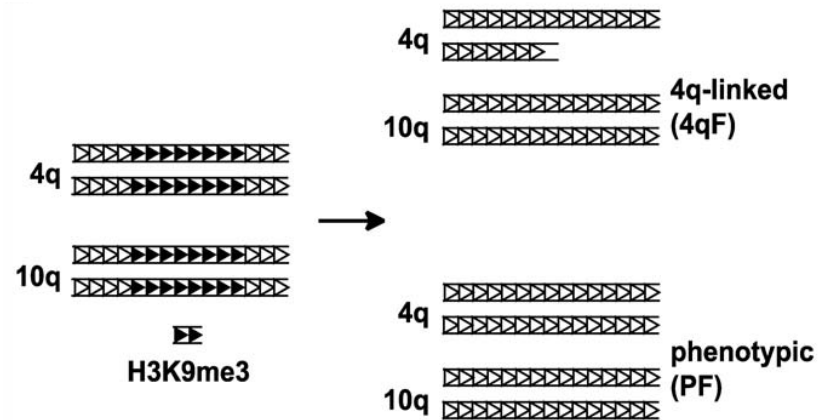




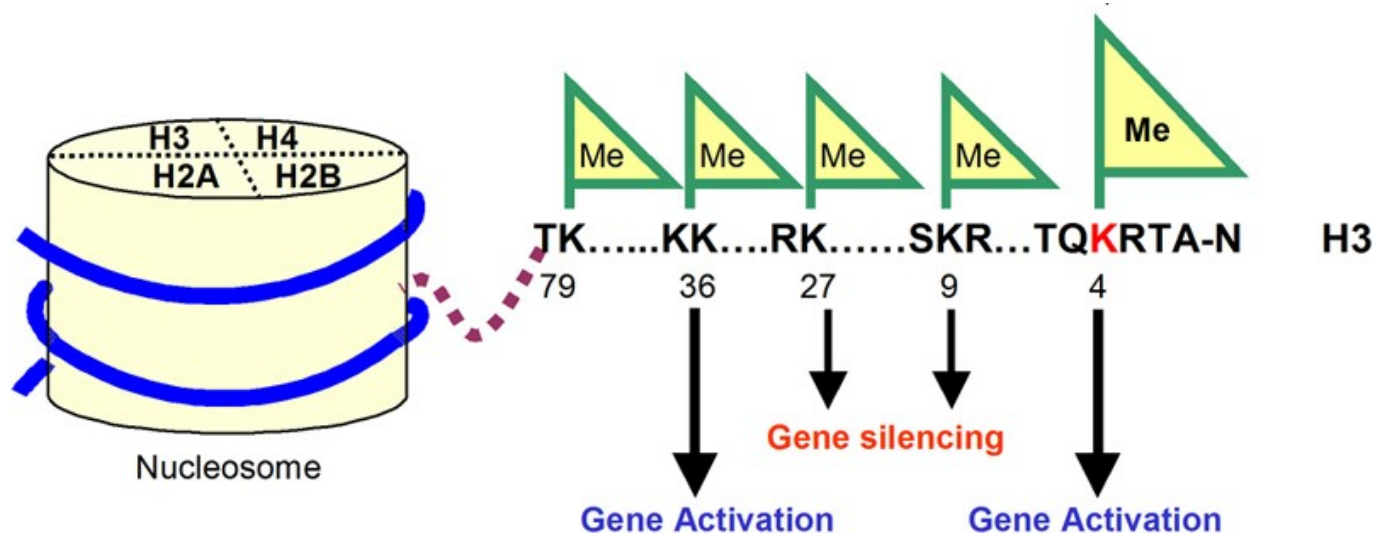
(A) In controls - D4Z4 is packed as heterochromatin. In patients with FSHD - more open chromatin structure is induced. Because of the open chromatin structure in patients with FSHD, binding of protein(s) to D4Z4 that normally do not bind may occur. (B) When the chromatin structure is in a more open conformation, candidate genes may be deregulated *in cis* (upper panel) and the interaction with the nuclear envelope may be disturbed (lower panel).

- FSHD pacienti s delecí D4Z4 (4qF) a „phenotypic“ FSHD pacienti (PF) - ztráta modifikace H3K9me3.
- Ztráta modifikace H3K9me3 se vyskytuje u pacientů (4qF i PF) nejen v oblasti repetice D4Z4 na obou chromozomech 4q ale i v oblasti repetice D4Z4 na obou chromozomech 10q (na rozdíl od DNA hypomethylation, která je asociována s D4Z4 na chromozomu 4q).

• Ztráta modifikace H3K9me3 v oblasti D4Z4 byla pozorována u patientských myoblastů, fibroblastů i lymfoblastů → ztráta modifikace H3K9me3 není tkáňově specifická.



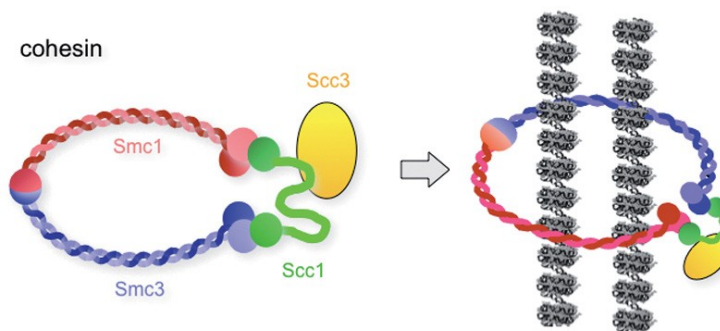
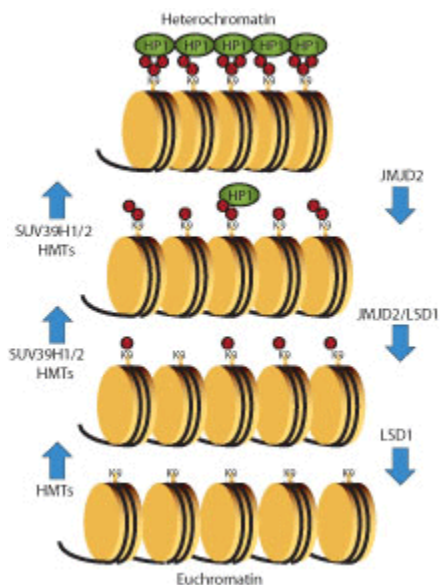
- FSHD pacienti – DNA hypometylace a ztráta modifikace H3K9me3 → je DNA hypometylace určující pro ztrátu H3K9me3???
- Pacientů s ICF („immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies“) syndromem, mutace v genu kódujícím DNA metyltransferázu 3B → celková DNA hypometylace (čtetně D4Z4) → nebyla pozorována ztráta modifikace H3K9me3 v oblasti D4Z4 →
- **DNA hypomethylace není nezbytně nutná pro ztrátu modifikace H3K9me3 → ztráta H3K9me3 v D4Z4 spíše než DNA hypometylation je kauzálně spojena s FSHD.**



Ztráta modifikace H3K9me3 v oblasti repetice D4Z4 je asociována s FSHD → **jak ztráta epigenetické modifikace souvisí se fenotypem svalové dystrofie?**



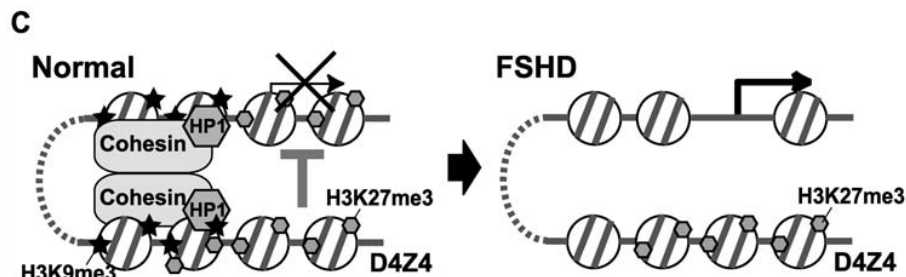
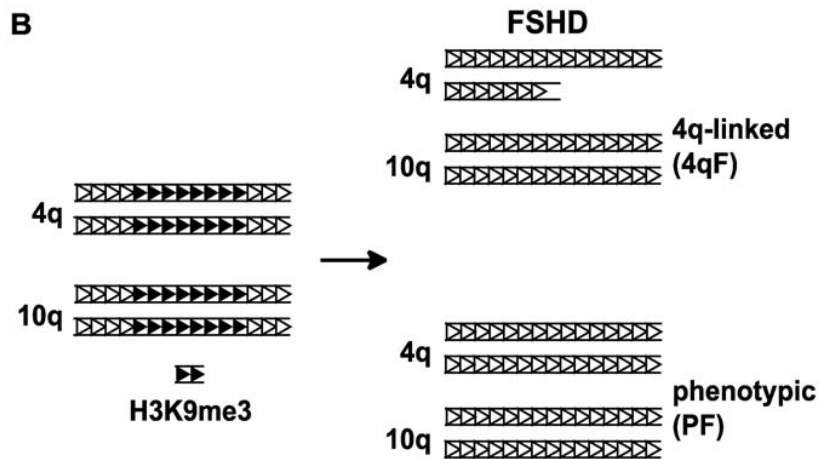
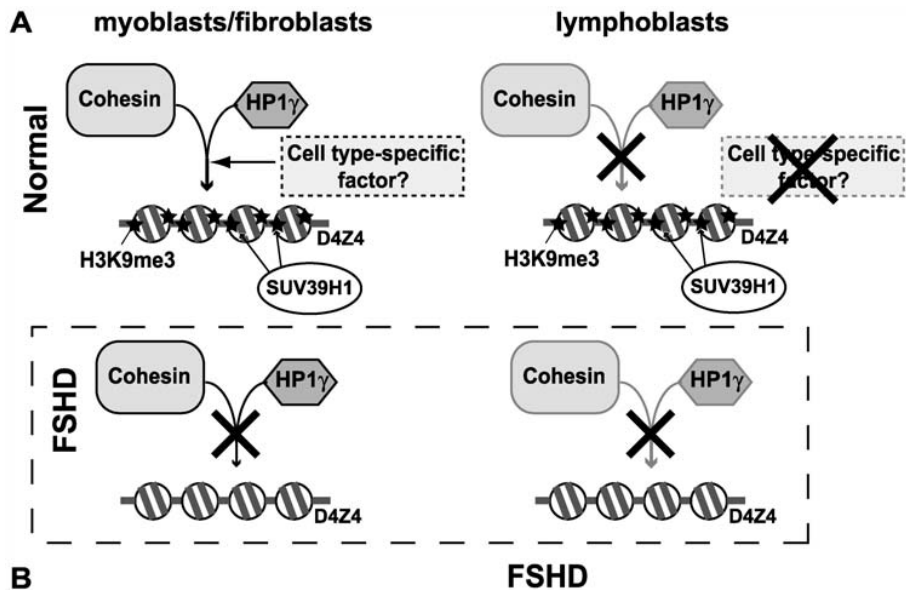
Identifikace dvou proteinů, které se ve svalových buňkách specificky váží k D4Z4 obsahující H3K9me3, **heterochromatin binding protein HP1 γ** a **kohezin**.



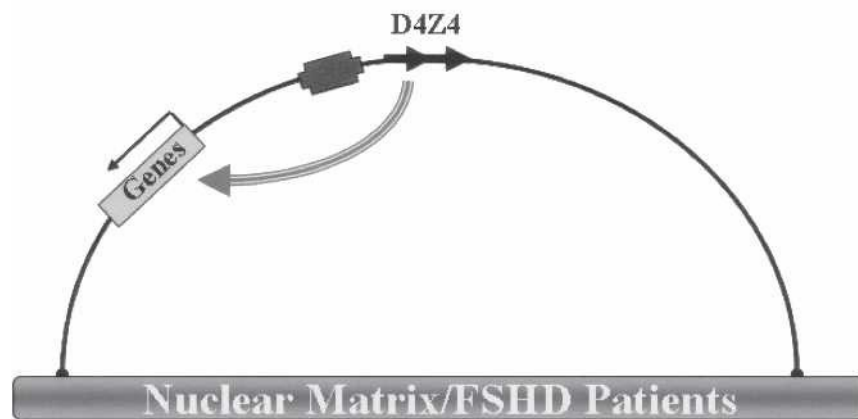
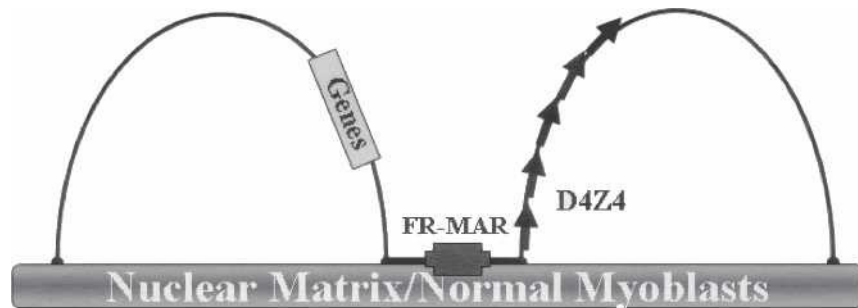
Model of the cohesin ring holding sister chromatids together.

SUV39H1/2 enzymes di- and tri-methylate histone 3. This leads to binding of HP1 to the histones and formation of heterochromatin.

FSHD lokus - delece D4Z4 - ztráta modifikace H3K9me3 - ztráta vazby HP1 γ a kohezinu - změna struktury chromatinu - změny exprese????? - fenotyp svalové dystrofie.



Schematic models of chromatin changes in FSHD. (A) Specific chromatin assembly at D4Z4 and its loss in FSHD. HP1c and cohesin are co-recruited to D4Z4 that harbors SUV39H1-dependent H3K9me3 in myoblasts and fibroblasts. In lymphoblasts, however, despite the presence of H3K9me3, HP1c and cohesin fail to associate with D4Z4 raising the possibility that HP1c and cohesin are involved in cell type-specific chromatin organization and that a putative cell type-specific factor(s) required for their recruitment may not be present in lymphoblasts. Thus, while loss of H3K9me3 at D4Z4 in FSHD has no consequence at D4Z4 in lymphoblasts, it leads to abolishment of HP1c/cohesin binding in myoblasts. (B) Coordinated loss of H3K9me3 on 4q and 10q D4Z4 in 4qF and PF. H3K9me3 (shown by black triangles) clustered in the subdomains of D4Z4 repeat regions (distribution hypothetical) in normal cells is lost in both types of FSHD. (C) A possible model for the spreading of the epigenetic change at D4Z4 to other genomic regions in FSHD. HP1c and cohesin may contribute to the physical interactions of the heterochromatic D4Z4 region with other genomic regions leading to the spreading of the silencing effect to putative target genes in normal cells. In FSHD, the loss of H3K9me3 (but not H3K27me3), HP1c, and cohesin from D4Z4 results in loss of chromatin interaction and **derepression of these genes leading to muscular dystrophy.**



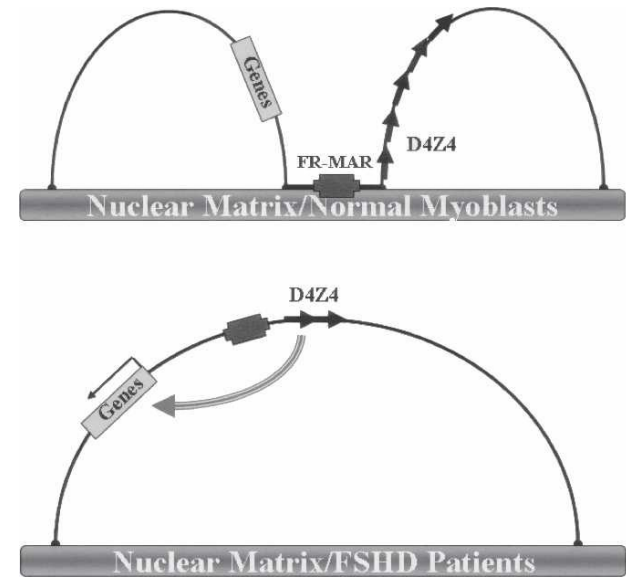
Loop domain organization and transcriptional control in the *4q35* region. MAR - matrix-associated regions, important for the organization of DNA into loop domains as part of a higher order chromatin structure.

(*Top*) In the presence of an intact D4Z4 array, the MAR is attached to the nuclear matrix, protecting the genes in one chromatin loop from the enhancing activity of D4Z4 located in the next loop.

(*Bottom*) In FSHD, the D4Z4 repeat array is reduced in size → delocalizing MAR from the matrix → the D4Z4 repeat array and upstream genes reside in a single loop → inappropriate up-regulation of adjacent *4q35* genes, including *FRG1*, *FRG2*, and *SLC25A4*.

- Ve shodě s uvedeným modelem byla detekována zvýšená exprese genů v oblasti 4q35.
- Myší model se zvýšenou expresí genu *FRG1* vykazoval fenotyp svalové dystrofie.

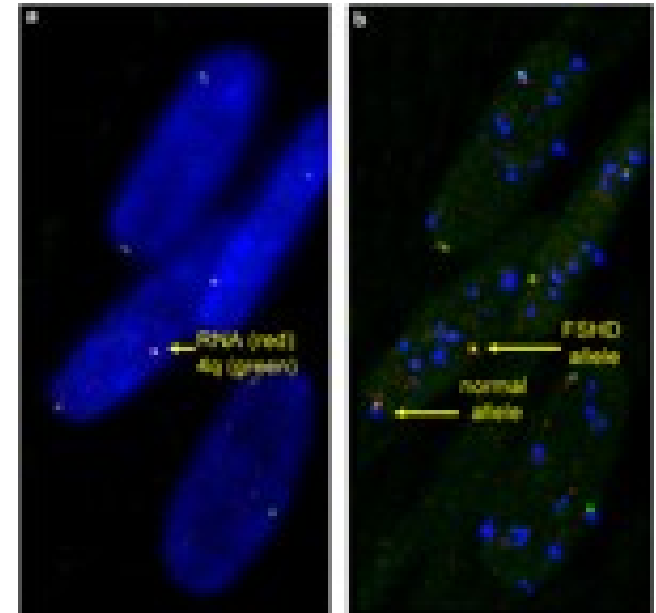
Genome Res. 2008 18: 39-45



Nejnovější výsledky:

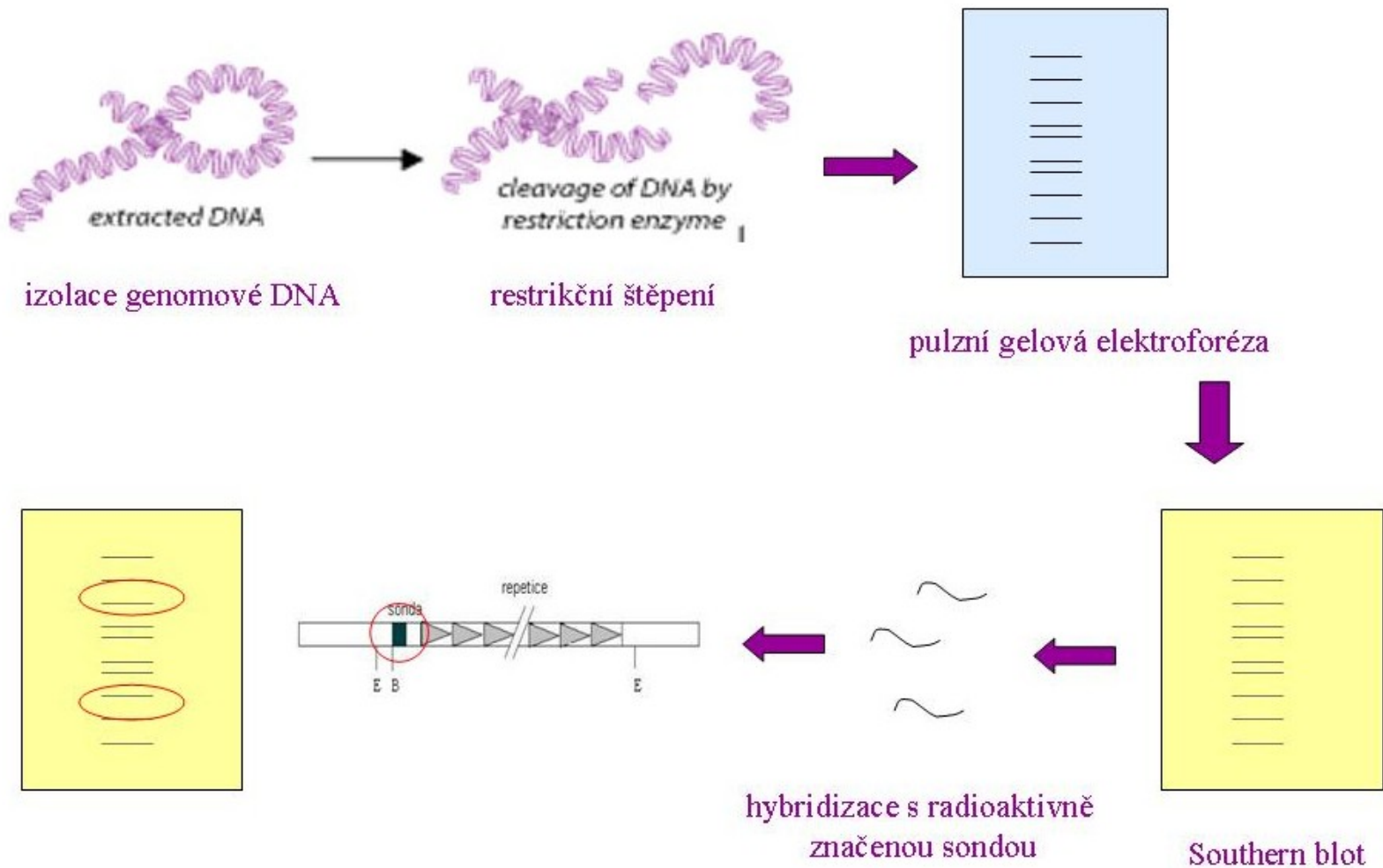
FSHD a kontrolní myoblasty - metodou RNA-DNA FISH analyzována exprese RNA 16 genů lokalizovaných v 4q35 (metafázní chromozomy, postupná hybridizace se sondami, které detekují 1) vznikající RNA, 2) 4q chromozóm (pro potvrzení lokalizace analyzované RNA, 3) D4Z4 repetici (rozlišení mezi alelou normální a s delecí D4Z4).

Výsledek: delece D4Z4 nezpůsobuje zvýšení exprese genů lokalizovaných v oblasti 4q35.

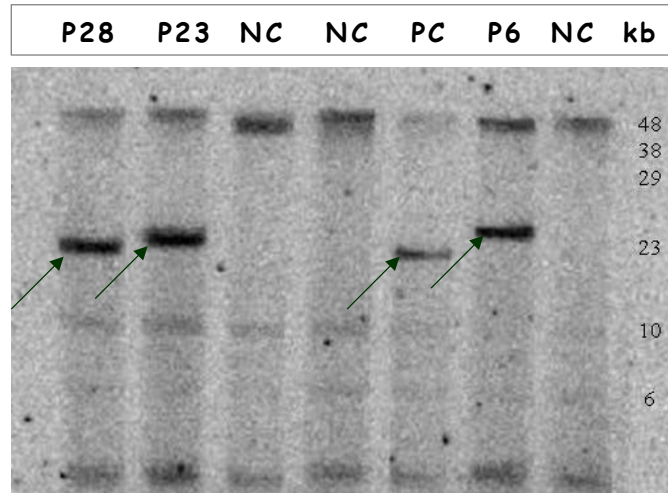
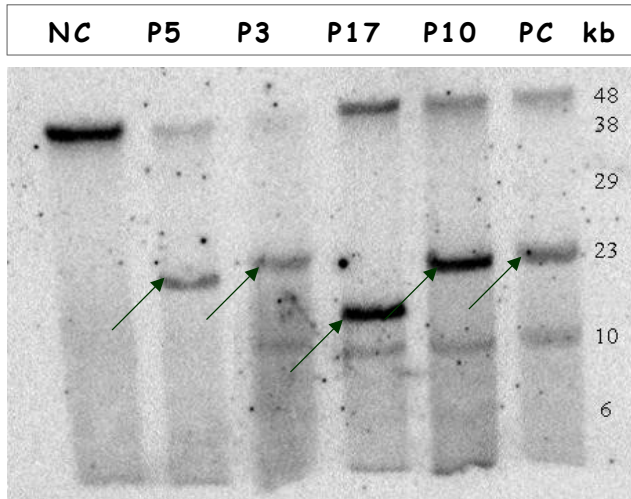
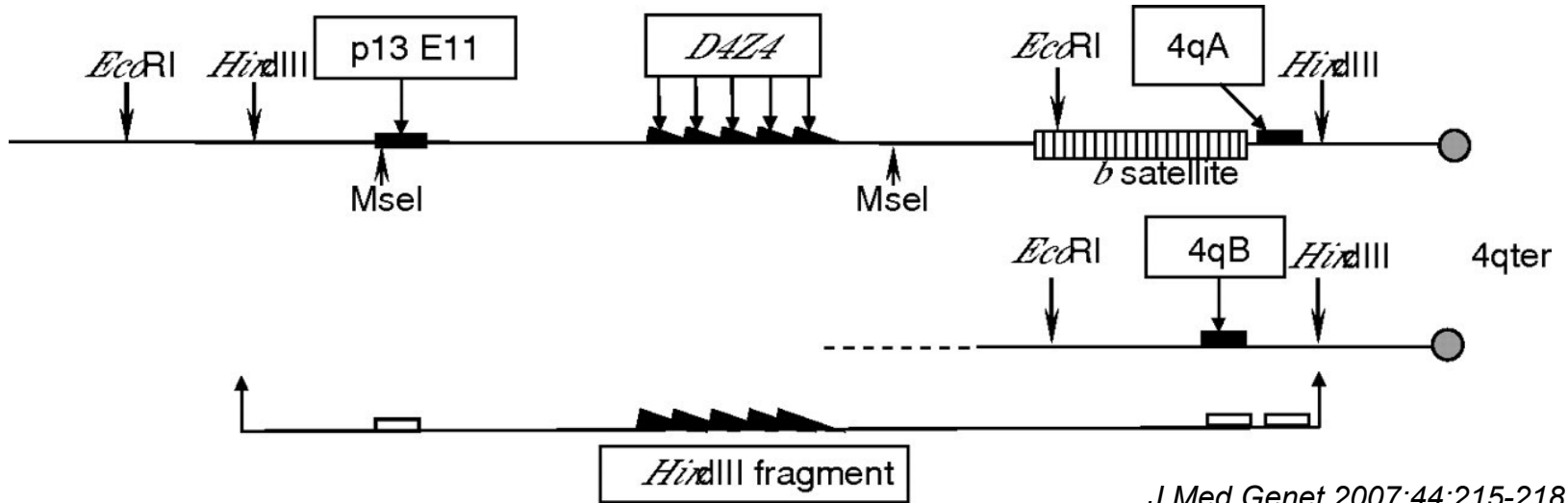


European Journal of Human Genetics 2010, 18, 448-456

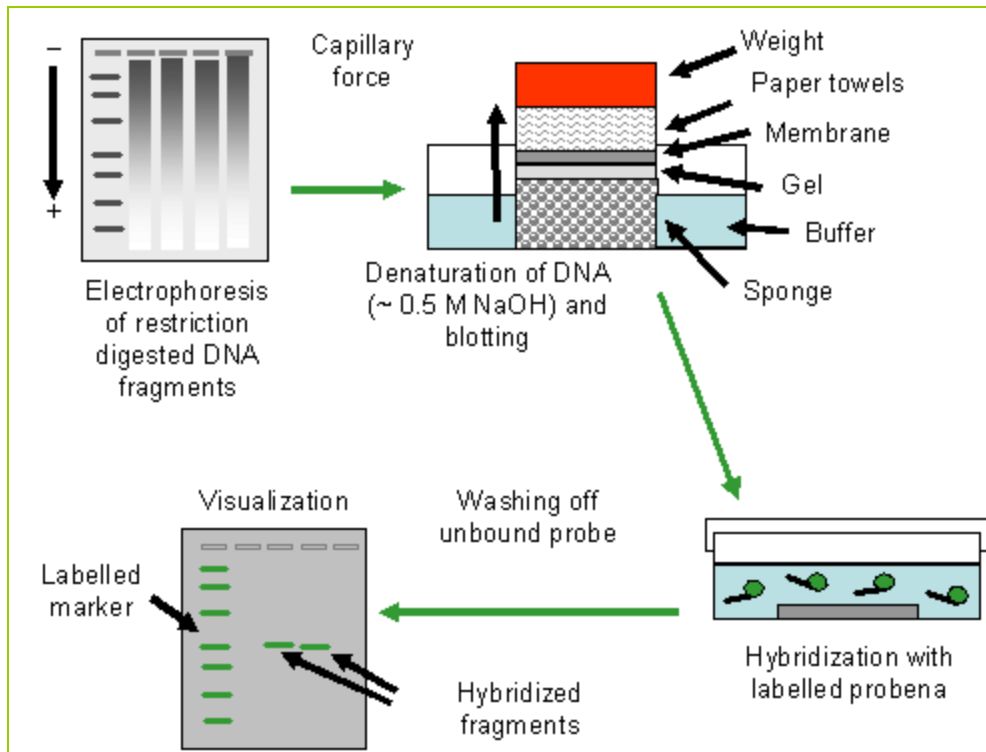
Molekulárně genetická diagnostika FSHD:



Genomic map of the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus region containing 4qA-defined and 4qB-defined 4qter subteleromeres.



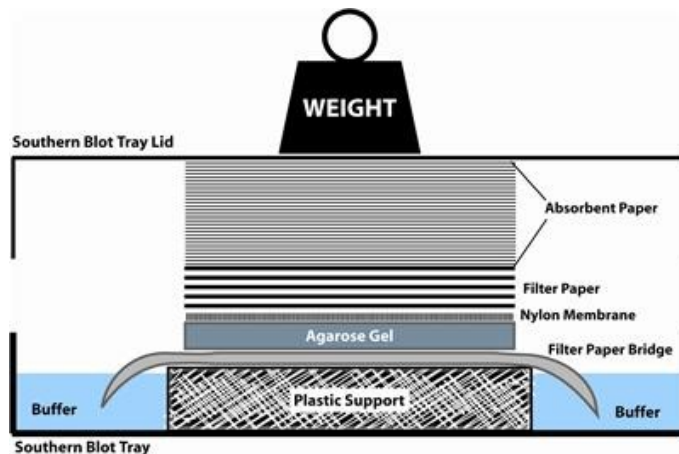
- **Pacienti s FSHD:**
detekce fragmentu < 38kb (< 10 repetice)
- **Kontrola:**
detekce fragmentu > 38kb (11-100 repetice)

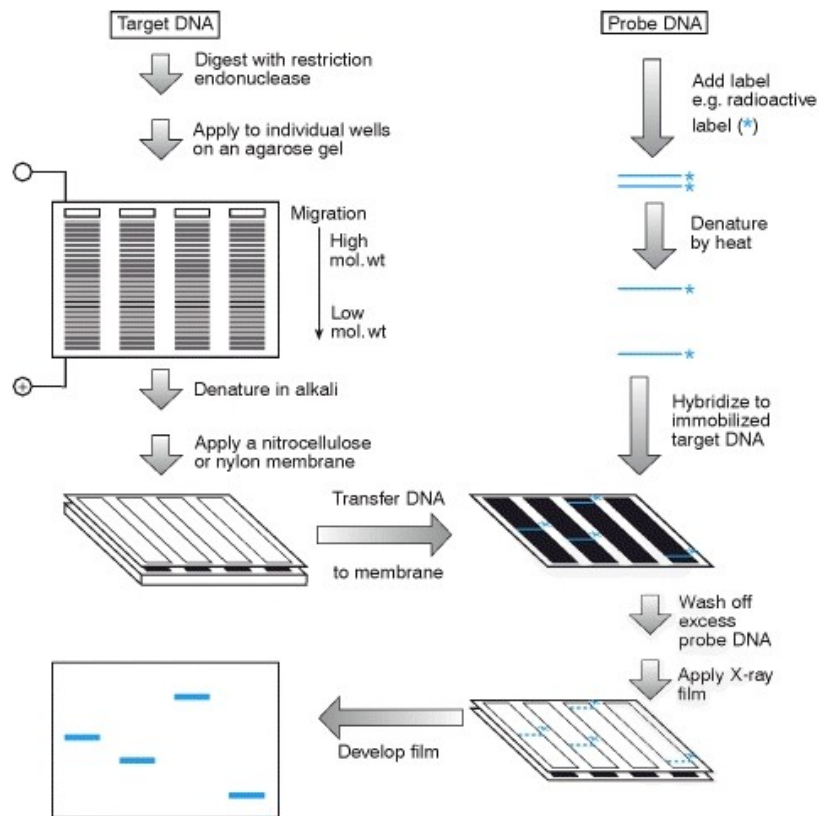


- Restrikční štěpení vysokomolekulární DNA.
- Elektroforetické rozdělení naštěpené DNA v agarózovém gelu na základě velikosti DNA fragmentů.

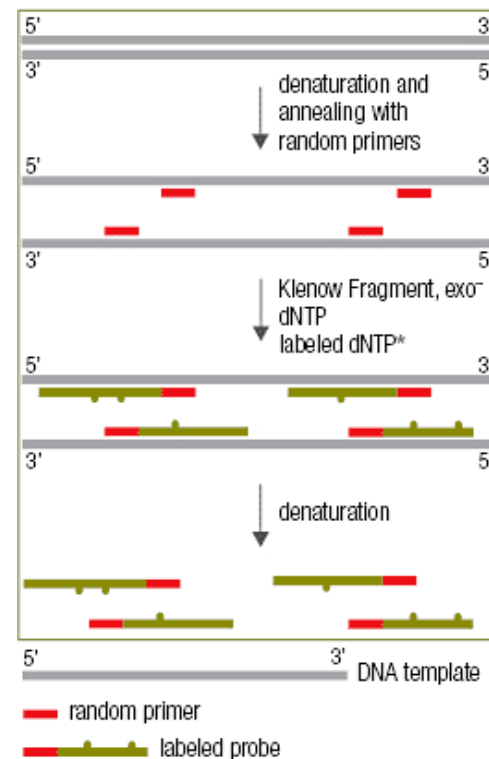
Southern blot:

- Depurinace v 0,25 M HCl (v případě fragmentů DNA větších než 15 kb).
- Denaturace a fragmentace DNA (v místě depurinace) 0,5 M NaOH.
- Alkalický přenos DNA na membránu v 0.5 M NaOH (vazba negativně nabitě DNA k pozitivně nabitě membráně) - *různé možnosti.*



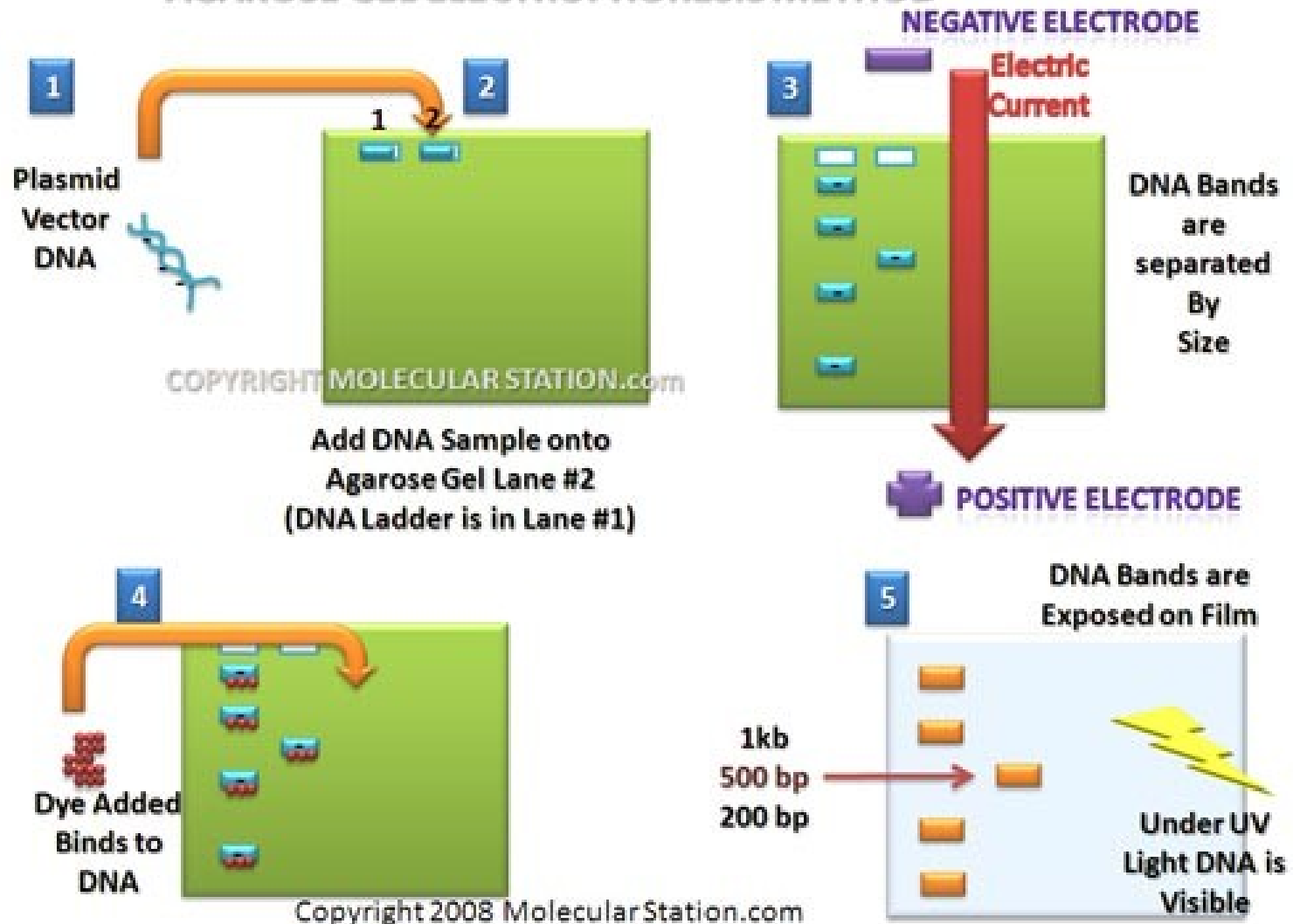


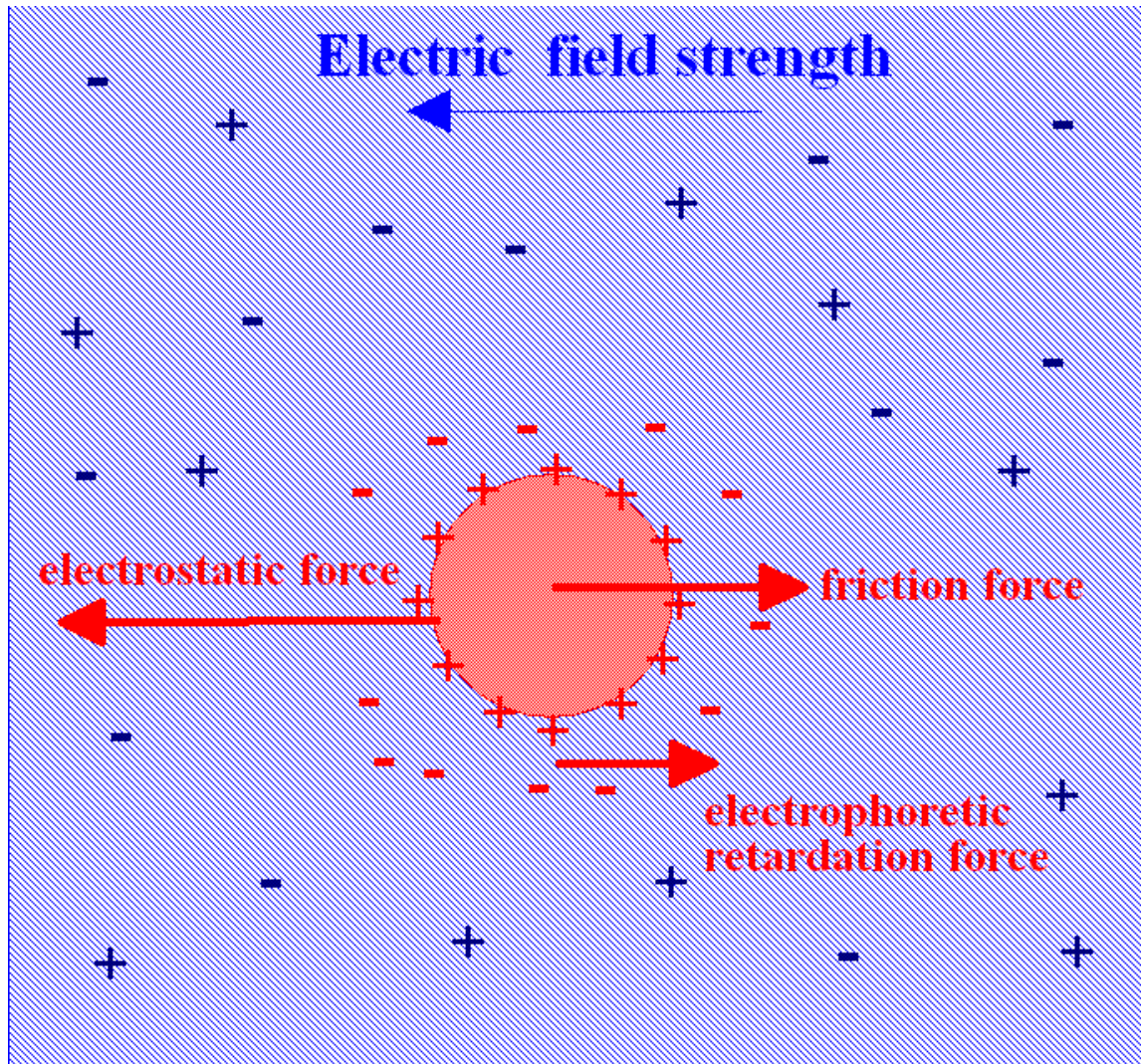
Radioaktivní značení sondy



- Radioaktivní značení hybridizační sondy (fragment DNA, jehož sekvence je komplementární s analyzovanou sekvencí na membráně).
- Hybridizace značené sondy s DNA na membráně – vhodná teplota, zajištění specificity pro vazbu próby (salmon sperm DNA – blokování povrchu membrány a DNA, detergenty – redukce nespecifické vazby).
- Odmytí nenavázané próby.
- Autoradiografie.

AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS METHOD





Mobilita dělených částic závisí zejména na:

1) velikosti a tvaru částic

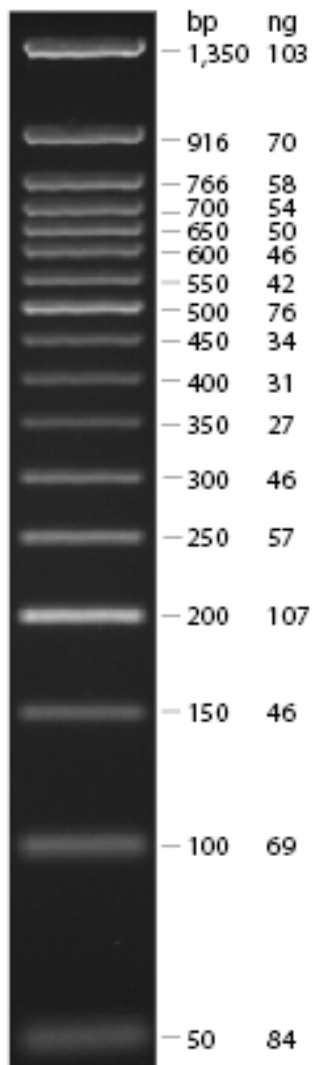
2) náboji částic

3) na prostředí – např. na hustotě / velikosti pórů prostředí (koncentrace agarózy, koncentrace a hustota zesíťování polyakrylamidu, na složení a koncentraci elfo pufry)

4) na potenciálu el. pole (napětí)

5) na teplotě

....



Rozlišení elfo lze regulovat volbou typu gelu (PAGE pro fragmenty do 1 kb, agaróza pro fragmenty od 100 bp do 20 kb), a jeho koncentrace (v případě PAGE též hustotou zesíťování, tj. poměrem AA:BIS).

1,8% agarose



Od určité velikosti částic se už přestává uplatňovat závislost mobility na velikosti částic, **všechny částice od této velikosti výše už putují stejně rychle/stejně daleko.**

V případě DNA dojde k jejímu zapletení do gelu a zastavení

(např. u 1% agarózy je tento limit asi 20 kb, u 0,6% agarózy asi 30 kb) – tzv. **kompresní zóna.**

Jak separovat molekuly DNA o velikosti >30kb ?

PULSNÍ ELFO

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis **David C. Schwartz and Charles R. Cantor**
Cell, [Volume 37, Issue 1](#), 67-75, 1984.

Idea: změnou směru elektrického pole umožnit DNA zapletené do vláken agarózy přeorientovat se ve směru nového pole a znovu popojet.

Různé typy pulsní elfo, dnes nejčastější je **hexagonální uspořádání elektrod.**

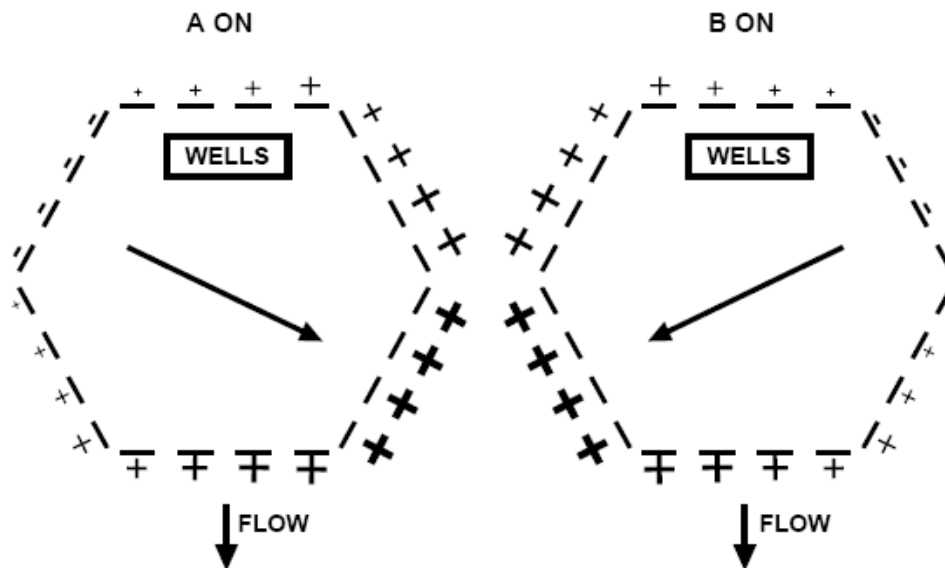
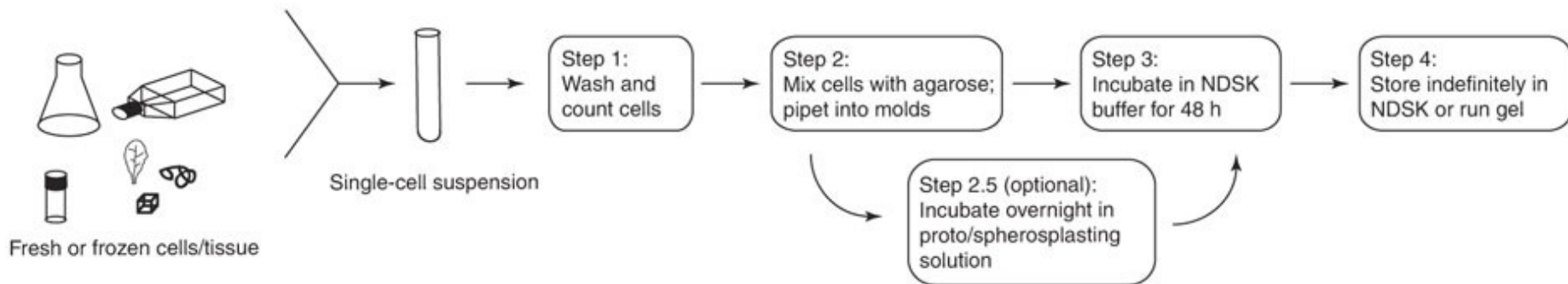
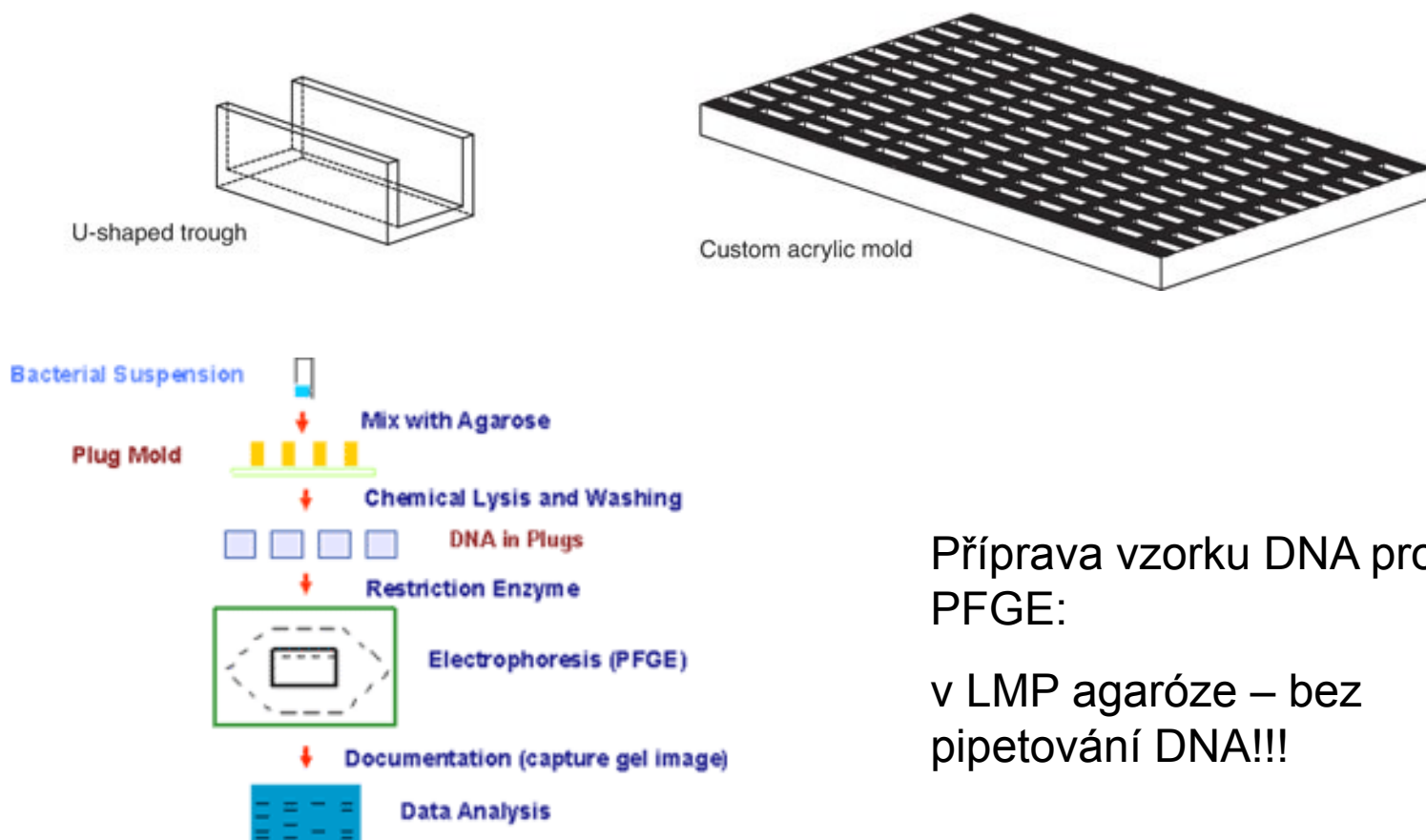


Fig. 1.1. Voltage Clamping by the CHEF-DR II system. **A.** Relative electrode potentials when the $+ 60^\circ$ field vector is activated. **B.** Relative electrode potentials when the $- 60^\circ$ field vector is activated.

a**b**

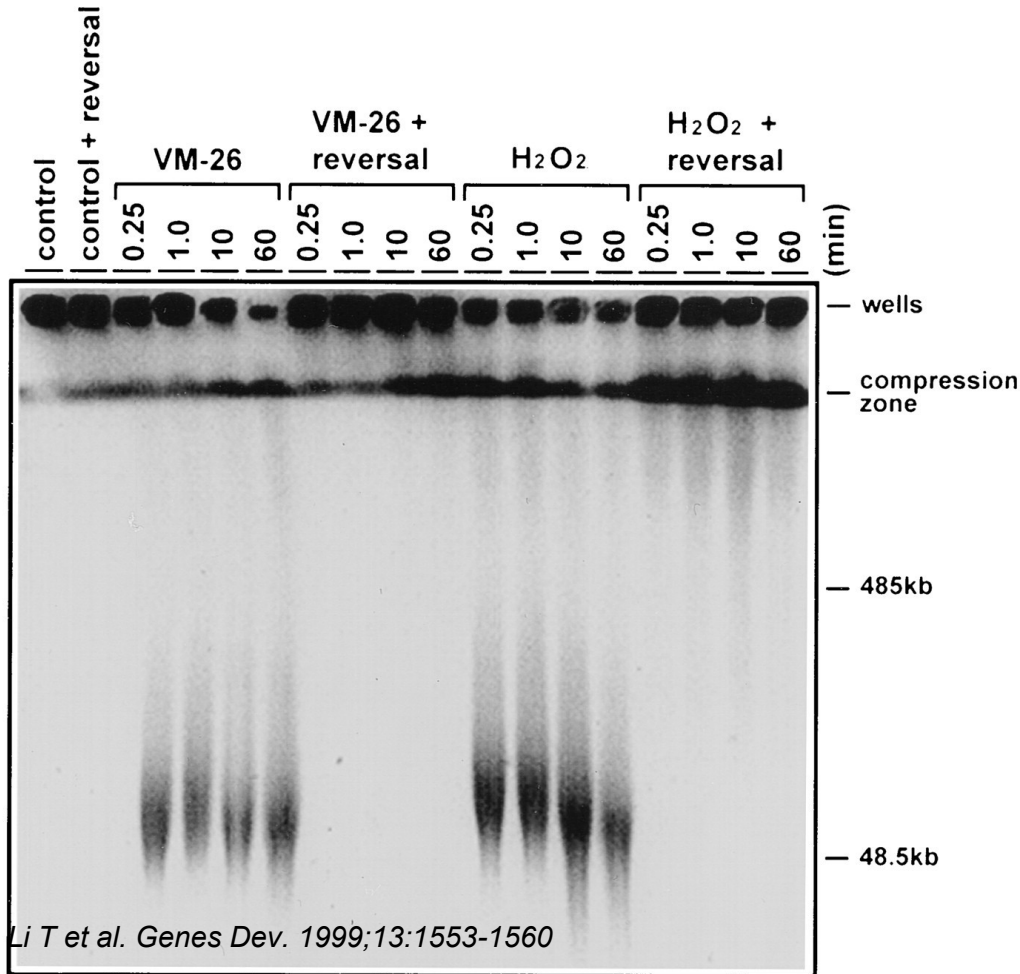
Příprava vzorku DNA pro PFGE:

v LMP agaróze – bez pipetování DNA!!!

I při PFGE dochází ke vzniku kompresní zóny – tj. i PFGE má limit rozlišení

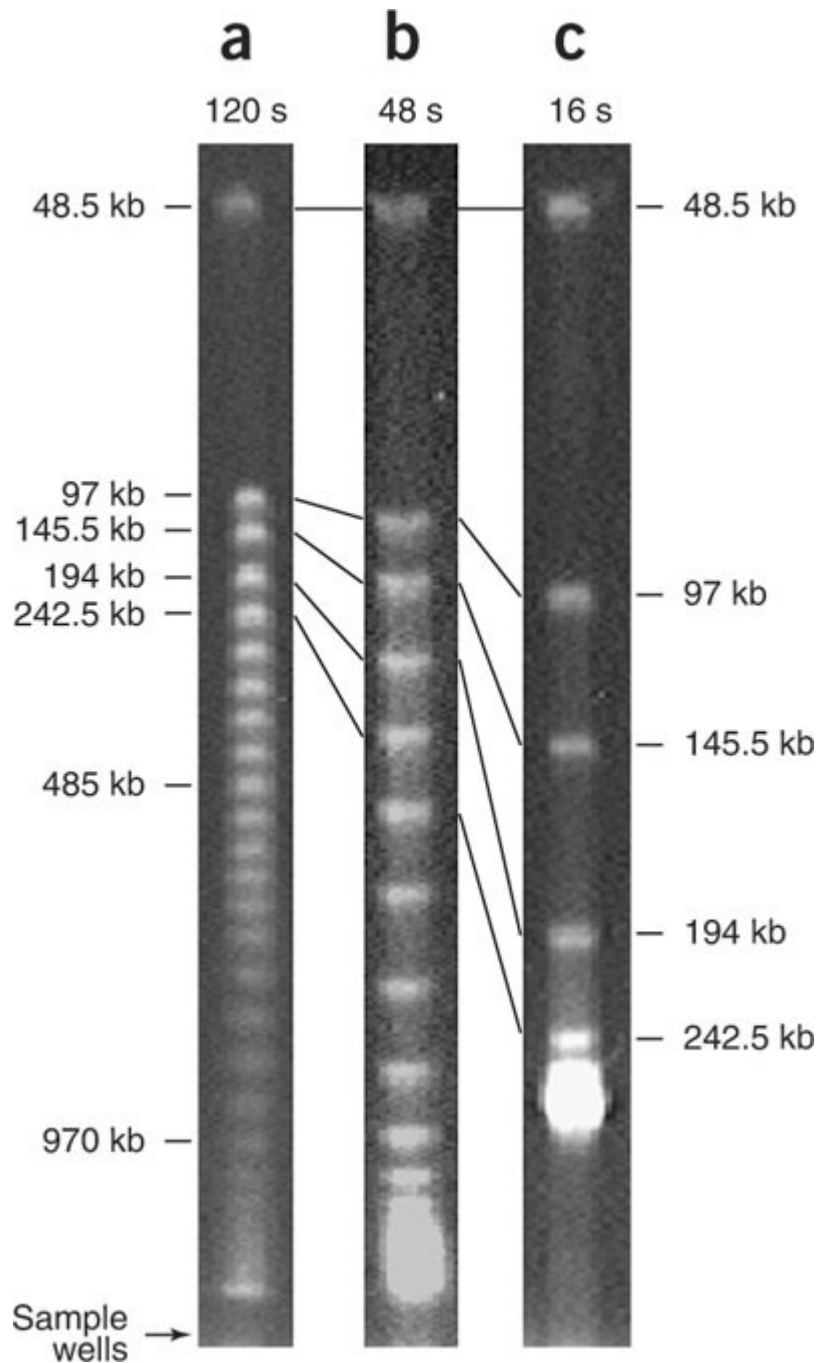
Rapid and reversible fragmentation of chromosomal DNA into HMW DNA fragments in U937 cells treated with VM-26 and H₂O₂.

A



B





Na čem závisí rozlišení PFGE:

1) **délka pulsu** – čím delší puls, tím větší molekuly se stihnou přeorientovat a mohou se pohybovat. Většinou se pracuje s několika různými délkami pulsu nebo s jejich gradientem během doby elfo.

- 1) úhel mezi vektory intenzity pole
- 2) napětí (čím větší napětí, tím rychlejší přeorientování molekul)
- 3) teplota
- 4) koncentrace a EEO agarózy (0,8-1,2%)
- 5) koncentrace a volba pufru (TBE, TAE)

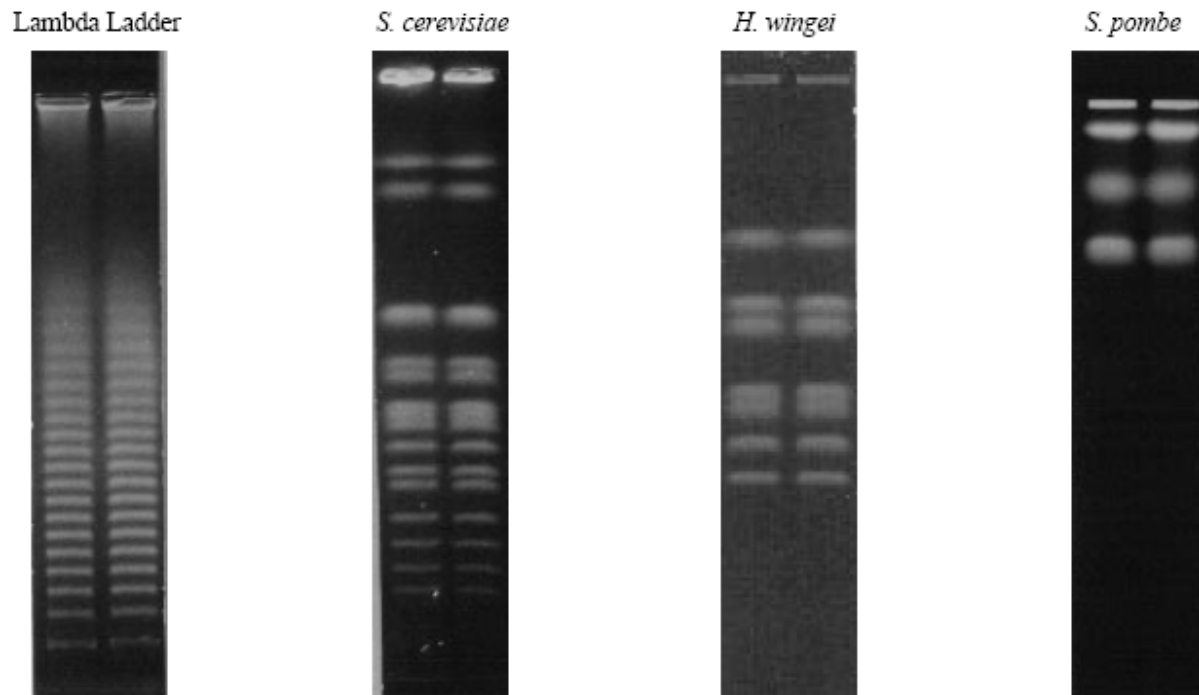


Fig. 4.2. A. Lambda ladder (catalog number 170-3635) was separated on a 1.0% Molecular Biology Certified Agarose (catalog number 162-0133) gel in 0.5x TBE, recirculated at 14 °C. The run time was 22 hours at 6 V/cm with a 50 to 90 second switch time ramp.

B. *Saccharomyces cerevisiae* Strain YNN295. (Catalog number 170-3605). Chromosomes were separated on a 1.0% Pulsed Field Certified Agarose (catalog number 162-0137) gel in 0.5x TBE, recirculated at 14 °C. The run time was 24 hours at 6 V/cm with a 60 to 120 second switch time ramp.

C. *Hansenula wingei* Strain YB-4662-VIA. (Catalog number 170-3667). Chromosomes were separated on a 0.8% Molecular Biology Certified Agarose gel in 1.0x TAE, recirculated at 14 °C. The run time was 50 hours at 3 V/cm with a 250 to 900 second switch time ramp.

D. *Schizosaccharomyces pombe* Strain 972 h-. (Catalog number 170-3633). Chromosomes were separated on a 0.6% Chromosomal Grade Agarose (catalog number 162-0135) gel in 1.0x TAE, recirculated at 14 °C. The run time was 72 hours at 2 V/cm with a 20 to 30 minute switch time ramp.

Výsledky molekulárně genetické diagnostiky FSHD:

- Počet pacientů s provedenou analýzou: **209**
- Počet pozitivních záchytů: **111 (53%)**

Nižší počet repetit D4Z4 → nižší věk nástupu onemocnění
fenotypová variabilita v rámci jedné rodiny

