

# Molekulární problematika a diagnostika vrozených nemocí



**Lenka Fajkusová**

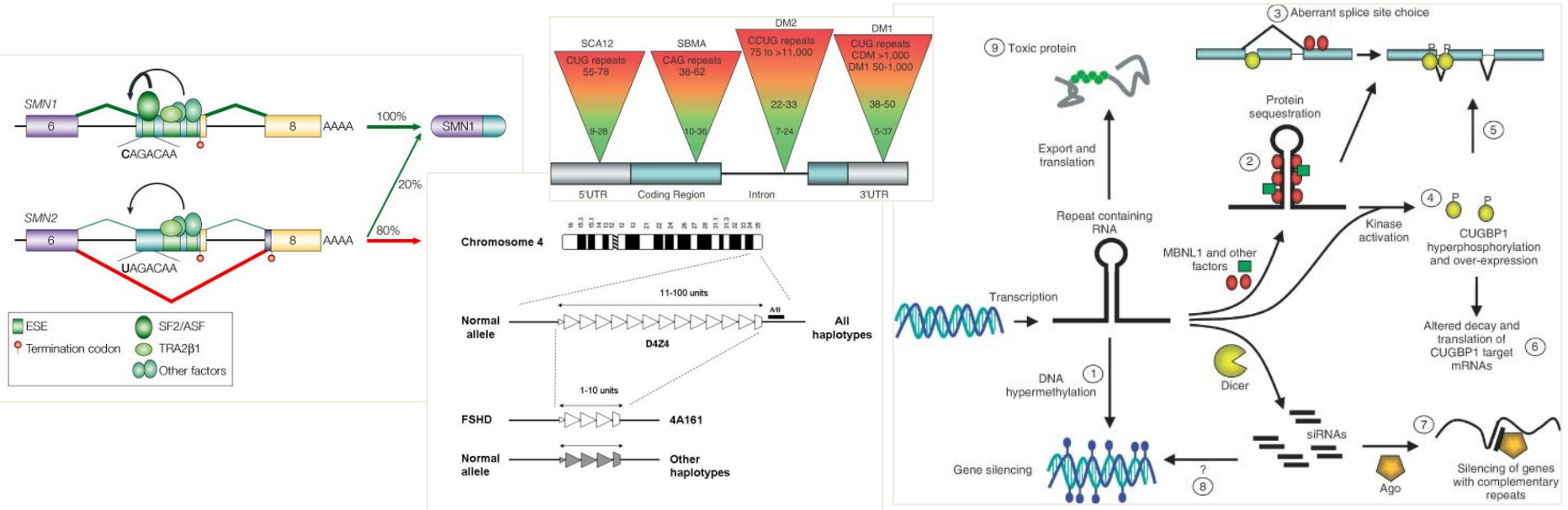


**Centrum molekulární biologie a genové terapie**  
Fakultní nemocnice Brno  
Černopolní 9, 613 00 Brno  
Fajkusova.Lenka@fnbrno.cz

# Molekulární problematika a diagnostika

- neuromuskulárních nemocí
- metabolických nemocí
- kožních nemocí a nemocí pojivové tkáně
- mentálních retardací

## Analýza patogenity identifikovaných sekvenčních změn



**Onemocnění ..... asociovaný gen .....**

**kódovaný protein ..... funkce proteinu ..... vliv**

**mutace na funkci proteinu ..... molekulární**

**podstata onemocnění ..... klinické projevy**

**onemocnění ..... používané metody DNA**

**diagnostiky**

# Vybrané neuromuskulárních nemoci

<i>Disease</i>	<i>Gene, protein</i>
<b>Duchenne muscular dystrophy</b>	<b><i>DMD</i></b> , Dystrophin
<b>Spinal muscular atrophy</b>	<b><i>SMN1</i></b> , Survival motor neuron protein 1
<b>Myotonic dystrophy, type 1</b> <b>Myotonic dystrophy, type 2</b>	<b><i>DMPK</i></b> , Dystrophia myotonia protein kinase <b><i>CNBP1</i></b> , Cellular retroviral nucleic acid-binding protein
<b>Limb girdle muscular dystrophy, type 2A</b>	<b><i>CAPN3</i></b> , Calpain-3
<b>Facioscapulohumeral muscular dystrophy</b>	Deletion of D4Z4 repeat, 4q35

# Neuromuskulární nemoci (NMD)

➤ NMD narušují funkci svalu a to buď přímo v důsledku patologie svalu nebo nepřímo v důsledku patologie nervů a neuromuskulárních spojení.

- **780 typů NMD**
- **417 genů**
- **16 skupin NMD**

[1. Muscular dystrophies](#)

[2. Congenital muscular dystrophies](#)

[3. Congenital myopathies](#)

[4. Distal myopathies](#)

[5. Other myopathies](#)

[6. Myotonic syndromes](#)

[7. Ion channel muscle diseases](#)

[8. Malignant hyperthermia](#)

[9. Metabolic myopathies](#)

[10. Hereditary cardiomyopathies](#)

[11. Congenital myasthenic syndromes](#)

[12. Motor neuron diseases](#)

[13. Hereditary ataxias](#)

[14. Hereditary motor and sensory neuropathies](#)

[15. Hereditary paraplegias](#)

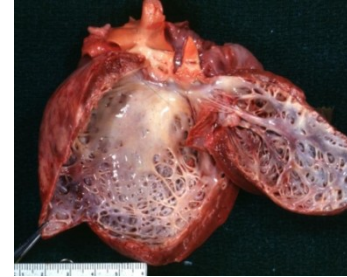
[16. Other neuromuscular disorders](#)

# NMD, klinická heterogenita

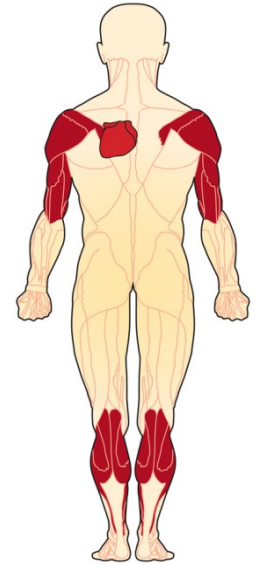
- **Mutace v 1 genu způsobují několik typů NMD; př. *LMNA*, lamin A/C**  
(tvorba jaderné laminy - síťovitá vrstva proteinů přiléhající na vnitřní stěnu vnitřní jaderné membrány).

## *Diseases*

1. **Cardiomyopathy, dilated, 1A**
2. **Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B1**
3. **Emery-Dreifuss muscular dystrophy 2, AD**
4. **Emery-Dreifuss muscular dystrophy 3, AR**
5. **Hutchinson-Gilford progeria**
6. **Heart-hand syndrome, Slovenian type**
7. **Lipodystrophy, familial partial, 2**
8. **Malouf syndrome**
9. **Mandibuloacral dysplasia**
10. **Muscular dystrophy, congenital**
11. **Muscular dystrophy, limb-girdle, type 1B**
12. **Restrictive dermopathy, lethal**



[www.wikidoc.org/index.php/Dilated\\_cardiomyopathy](http://www.wikidoc.org/index.php/Dilated_cardiomyopathy)



<http://dxline.info/diseases/charcot-marie-tooth-disease>



<http://neuromuscular.wustl.edu/time/hmsn.html>

<http://scientia1.files.wordpress.com/2013/01/progeria.jpg>



## ➤ 1 nemoc je způsobena mutacemi v 1 z několika genů

### Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy – 25 genes

2A: Calpain-3 ;15q15

2B: Dysferlin; 2p13

2C:  $\gamma$ -Sarcoglycan; 13q12

2D:  $\alpha$ -Sarcoglycan; 17q21

2E:  $\beta$ -Sarcoglycan; 4q12

2F:  $\delta$ -Sarcoglycan; 5q33

2G: Telethonin; 17q12

2H: TRIM32; 9q33

2I (MDDGC5): FKRP; 19q13

2J: Titin; 2q24

2K (MDDGC1): POMT1; 9q34

2L: ANO5; 11p14

2M (MDDGC4): Fukutin; 9q31

2N (MDDGC2): POMT2; 14q24

2O (MDDGC3): POMGnT1; 1p32

2P (MDDGC9): DAG1; 3p21

2Q: Plectin 1f; 8q24

2R: Desmin; 2q35

2S: TRAPPC11; 4q35

2T: GMPPB; 3p21

2U (Cerebellum small): ISPD; 7p21

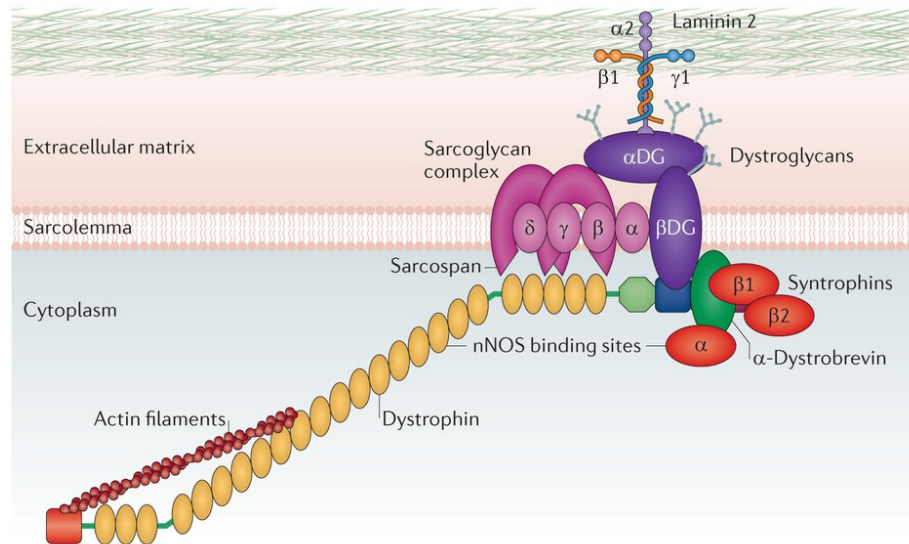
2V: GAA; 17q25

2W: LIMS2; 2q14

2X: POPDC1; 6q21

2Y: TOR1AIP1; 1q25

- Gen *DMD*, Xp21
- Dystrofin – protein membránového skeletu svalových buněk, stabilizace svalové membrány během kontrakce a dilatace svalu
  - DMD – *nonsense* mutace, delece a duplikace měnící *ORF*
  - BMD – delece a duplikace zachovávající *ORF* – mírnější forma nemoci



R.J. Fairclough, Nature Reviews Genetics 2013

## DNA diagnostika:

- Identifikace delecí/duplikací – MLPA (60% mutací)
- Identifikace mutací malého rozsahu – PCR, sekvenční analýza exonů



## ➤ Nutnost korelace mezi klinickými, patologickými a genetickými nálezy

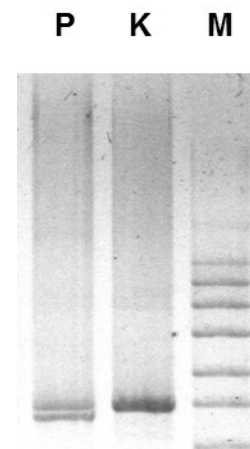
### Kazuistika pacienta 1

**Klinický náález: BMD**

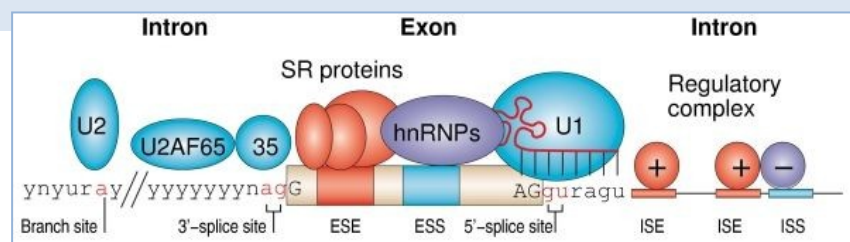
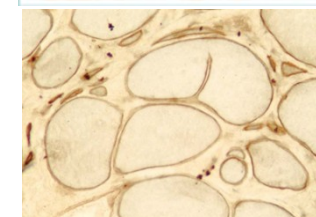
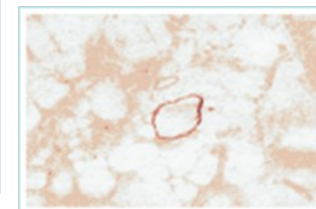
**Histopatologický náález: BMD**

**Genetický náález:**

- **Analýza DNA: nonsense mutace p.(Glu1110\*) v exonu 25**  
⇒ DMD ???
- **Analýza mRNA: identifikace dvou transkriptů**
  - transkript s mutací p.(Glu1110\*)
  - transkript s delecí exonu 25
- **Lokalizace mutace c.3536C>A v sekvenci ESE ⇒ změna sestřihu mRNA (delece exonu 25)**
- **Delece exonu 25 nemění ORF ⇒ vznik částečně funkčního proteinu**



Reverzní transkripce-PCR



Imunodetekce dystrofinu; kontrola, pacient s BMD (FNB, PAU, Hermanová M.)

## ➤ Nutnost spojení analýzy DNA a mRNA

### *Kazuistika pacienta 2*

**Klinický náález: DMD**

**Patologický náález: DMD**

**Genetický náález:**

- Analýza DNA: bez mutace
- Analýza mRNA: exon 65 – 53 nt. intronu 65 – exon 66
- Analýza DNA: c.9564-427T>G ⇒ inzerce pseudoexonu

agat cat at at tt gaat gtt gttt ast agagt at gat at t t t t c t t a c g g a g a t a a a c a t 9564-541  
 t t a t a t t c t a t a t t a t g t g t t a t g t g g c c t g a a g t a a t t a a t t t t c t t t c a t a a g g g g c 9564-481  
 a a t c t g a t g a a g a t c t g a g c a t t t a a g a g g g c t g a g c a g t t a g t t g c t g g t a a t t t t t t 9564-421  
 g y c t t c c a t g a c c a a a g t a g g t a a t t t g c t t t a g t a a c c a a a g t a g a t t g g t g a a g a t t a 9564-361  
 g t a a t t c t t c t g e t t a c c a a c t t a a a c c a a g g t g y c t t t c c a t a g g t g a a t a g a a t t t t t 9564-301

## 7 LGMD s AD typem dědičnosti (LGMD1A-G); 25 LGMD s AR typem dědičnosti (LGMD2A-S)

### Limb girdle dystrophies: **Dominant**

**1A:** Myotilin; 5q31; Dysarthria

**1B:** Lamin A/C; 1q21; + Cardiac

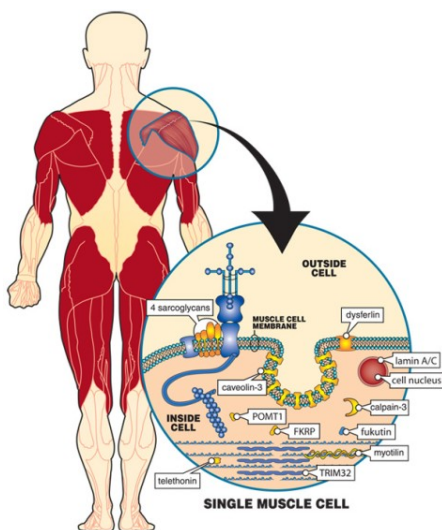
**1C:** Caveolin-3; 3p25; Child onset

**1D:** DNAJB6; 7q36

**1E:** Desmin; 2q35

**1F:** TNPO3; 7q32

**1G:** HNRPDL; 4q21



<http://mda.org/disease/limb-girdle-muscular-dystrophy/causes-inheritance>

### Limb girdle dystrophies: **Recessive**

**2A:** Calpain-3 ;15q15

**2B:** Dysferlin; 2p13

**2C:**  $\gamma$ -Sarcoglycan; 13q12

**2D:**  $\alpha$ -Sarcoglycan; 17q21

**2E:**  $\beta$ -Sarcoglycan; 4q12

**2F:**  $\delta$ -Sarcoglycan; 5q33

**2G:** Telethonin; 17q12

**2H:** TRIM32; 9q33

**2I (MDDGC5):** FKRP; 19q13

**2J:** Titin; 2q24

**2K (MDDGC1):** POMT1; 9q34

**2L:** ANO5; 11p14

**2M (MDDGC4):** Fukutin; 9q31

**2N (MDDGC2):** POMT2; 14q24

**2O (MDDGC3):** POMGnT1; 1p32

**2P (MDDGC9):** DAG1; 3p21

**2Q:** Plectin 1f; 8q24

**2R:** Desmin; 2q35

**2S:** TRAPPC11; 4q35

**2T:** GMPPB; 3p21

**2U (Cerebellum small):** ISPD; 7p21

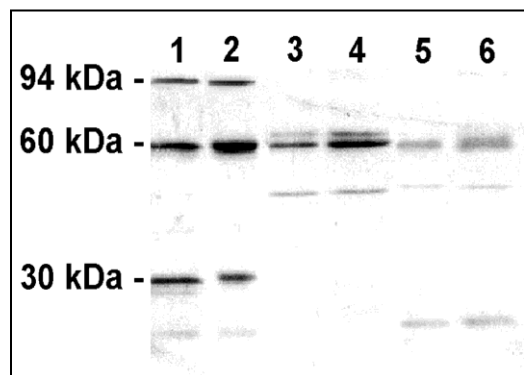
**2V:** GAA; 17q25

**2W:** LIMS2; 2q14

**2X:** POPDC1; 6q21

**2Y:** TOR1AIP1; 1q25

## Pacient s podezřením na LGMD2 – který gen analyzovat?



Western blot kalpainu-3; imunohistochemická detekce alfa-sarkoglycanu (kontrola, pacient s LGMD2D). (FNB, PAU, Hermanová M.)

## Výběr genů na základě četnosti výskytu mutací v jiných populacích?

### Počet pacientů s LGMD zaslaných k analýze 218

- **LGMD2A, CAPN3, calpain-3; počet pacientů s mutací: 71 (32,6%)**
- **LGMD2I, FKRP, fukutin related protein; počet pacientů s mutací: 9 (4,1%)**
- **LGMD2D, SGCA, alpha-sarcoglycan; počet pacientů s mutací: 6 (2,8%)**
- **LGMD2L, ANO5, anoctamin 5; počet pacientů s mutací: 3 (1,4%)**

**Diagnóza potvrzena u 40,8% pacientů.**

7 LGMD s AD typem dědičnosti (LGMD1A-G); 25 LGMD s AR typem dědičnosti (LGMD2A-S)

**Limb girdle dystrophies: Dominant**

1A: Myotilin; 5q31; Dysarthria

1B: Lamin A/C; 1q21; + Cardiac

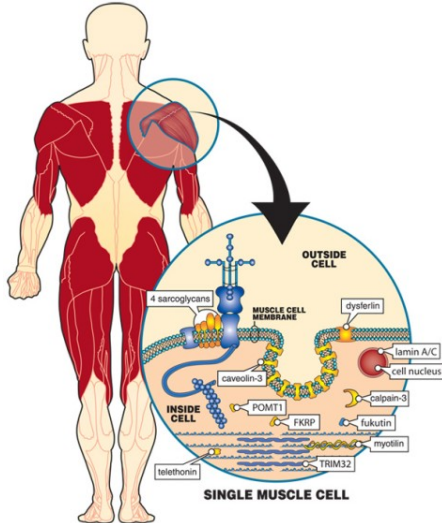
1C: Caveolin-3; 3p25; Child onset

1D: DNAJB6; 7q36

1E: Desmin; 2q35

1F: TNPO3; 7q32

1G: HNRPDL; 4q21



<http://mda.org/disease/limb-girdle-muscular-dystrophy/causes-inheritance>

**Limb girdle dystrophies: Recessive**

2A: Calpain-3 ;15q15

2B: Dysferlin; 2p13

2C:  $\gamma$ -Sarcoglycan; 13q12

2D:  $\alpha$ -Sarcoglycan; 17q21

2E:  $\beta$ -Sarcoglycan; 4q12

2F:  $\delta$ -Sarcoglycan; 5q33

2G: Telethonin; 17q12

2H: TRIM32; 9q33

2I (MDDGC5): FKRP; 19q13

2J: Titin; 2q24

2K (MDDGC1): POMT1; 9q34

2L: ANO5; 11p14

2M (MDDGC4): Fukutin; 9q31

2N (MDDGC2): POMT2; 14q24

2O (MDDGC3): POMGnT1; 1p32

2P (MDDGC9): DAG1; 3p21

2Q: Plectin 1f; 8q24

2R: Desmin; 2q35

2S: TRAPPC11; 4q35

2T: GMPPB; 3p21

2U (Cerebellum small): ISPD; 7p21

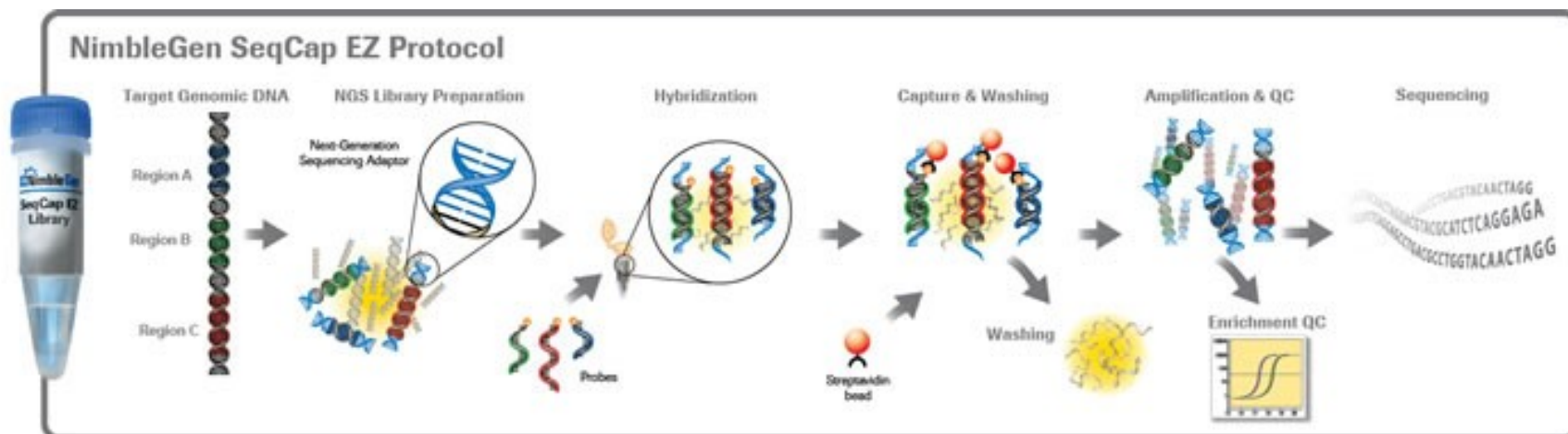
2V: GAA; 17q25

2W: LIMS2; 2q14

2X: POPDC1; 6q21

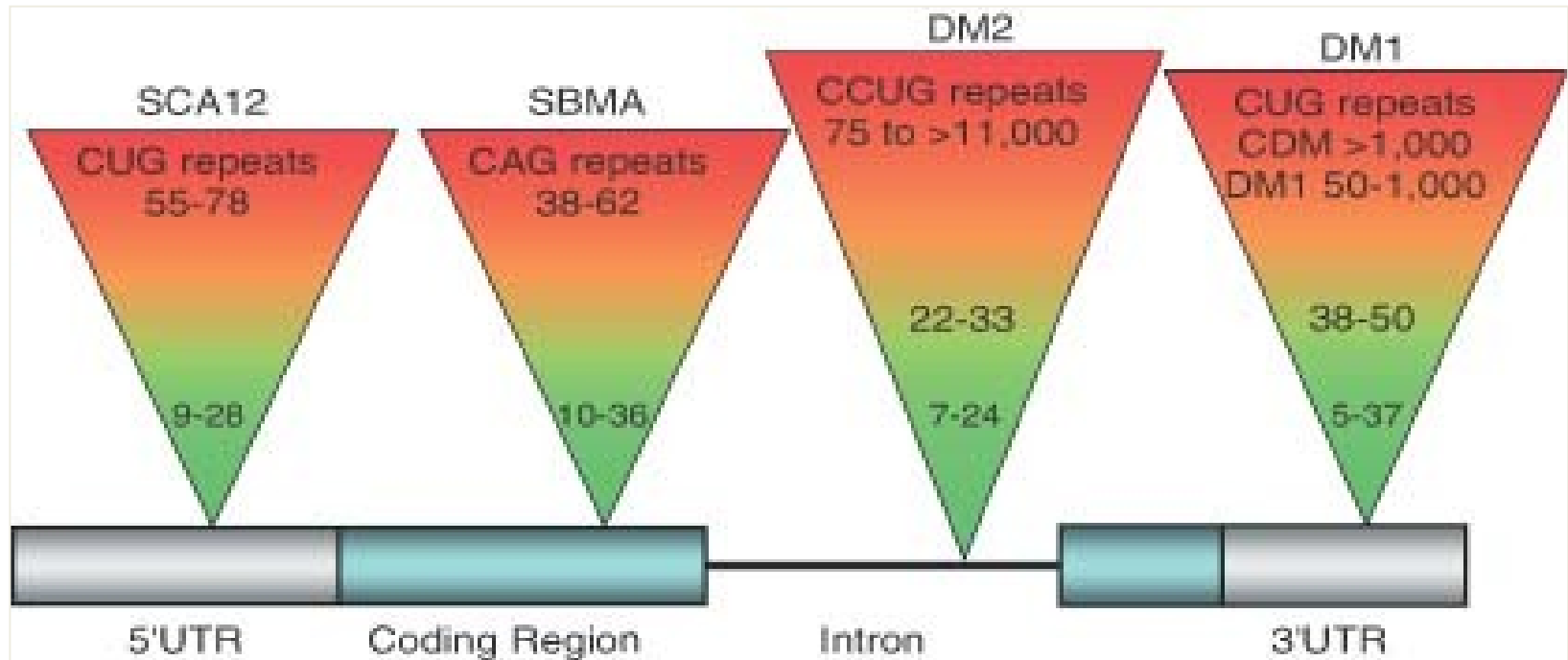
2Y: TOR1AIP1; 1q25

- *Sequence Capture (SeqCap EZ Choice Library; NimbleGen)*
- *Cílená sekvenace (MiSeq, NextSeq; Illumina)*



- Zadání cílových úseků, design sond
- Příprava knihovny - fragmentace DNA
- Hybridizace fragmentované DNA se sondami s navázaným biotinem
- Vychytání sond s navázaným fragmentem DNA pomocí magnetických kuliček s navázaným streptavidinem
- Amplifikace
- Sekvenace

# Nemoci způsobené expanzí mikrosatelitních repetic

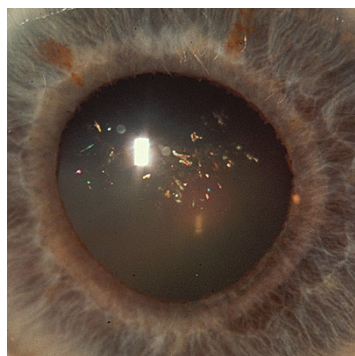


K. Usdin, Genome Res. 2008

**K expanzi mikrosatelitních repetic dochází v 5 netranslatovaných oblastech, exonech, intronech, 3 netranslatovaných oblastech.**

*Spinocerebellar ataxias (SCA12), Spinal Bulbar Muscular Atrophy (SBMA), myotonic dystrophy (DM)*

- Expanze CTG repetice v 3'UTR genu *DMPK* (19q13, *dystrophia myotonica protein kinase*); AD dědičnost
- 38-50 repetit: premutace, bez klinických projevů
- 50-150 repetit: mírná „*adult-onset*“ MD1 (katarakta, diabetes, mírná svalová slabost, myotonie)
- 100-1000 repetit: klasická MD1
- >1000 repetit: kongenitální MD1 (respirační selhání, svalová slabost, deformity nohou)
- **Dynamická mutace – počet repetit se může zvětšovat při přenosu do dalších generací.**



<http://neuromuscular.wustl.edu/musdist/pe-eom.html>



<http://cnx.org/content/m14898/latest/>

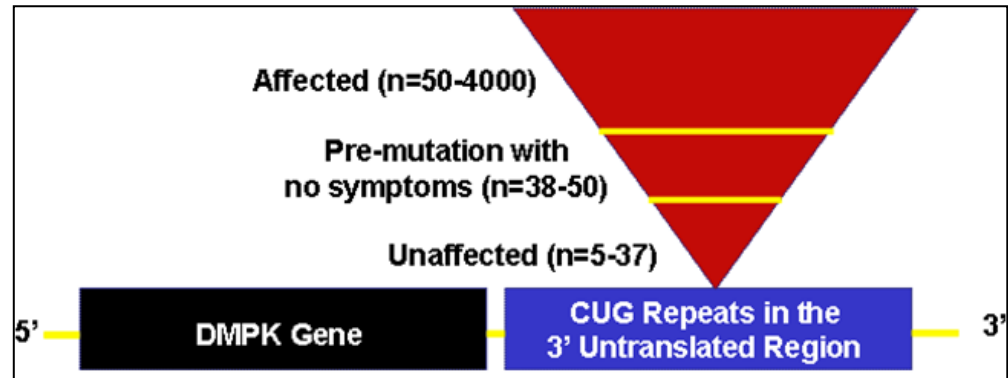


[http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/pages/myotonic\\_dystrophy.htm](http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/pages/myotonic_dystrophy.htm)



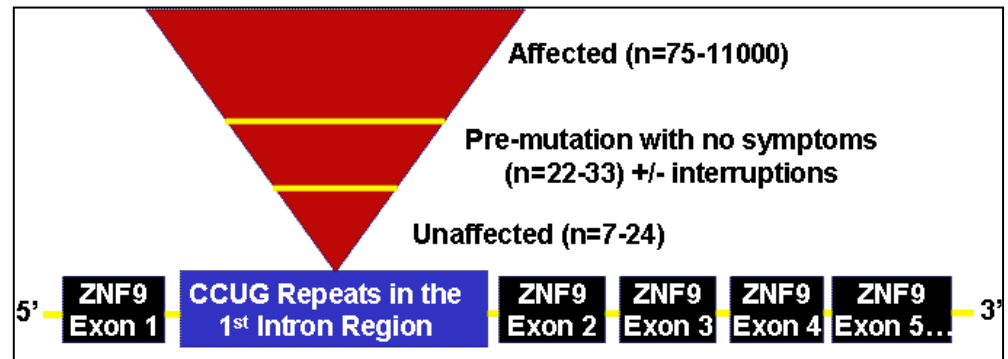
## ➤ MD1

- Expanze CTG repetice v 3'UTR genu *DMPK* (19q13, dystrophia myotonica protein kinase)
- AD dědičnost

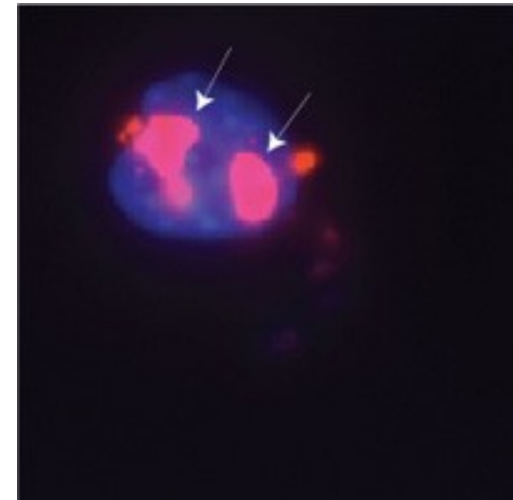
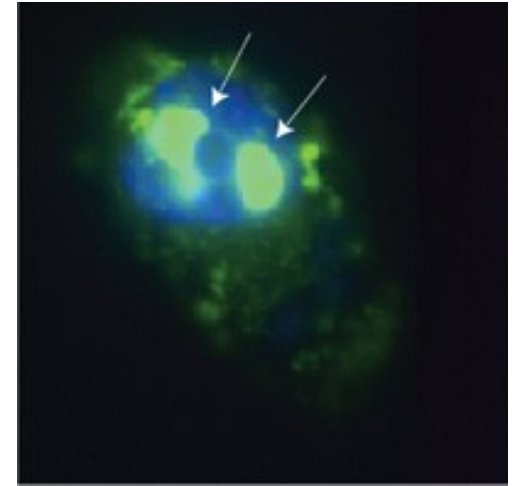


## ➤ MD2

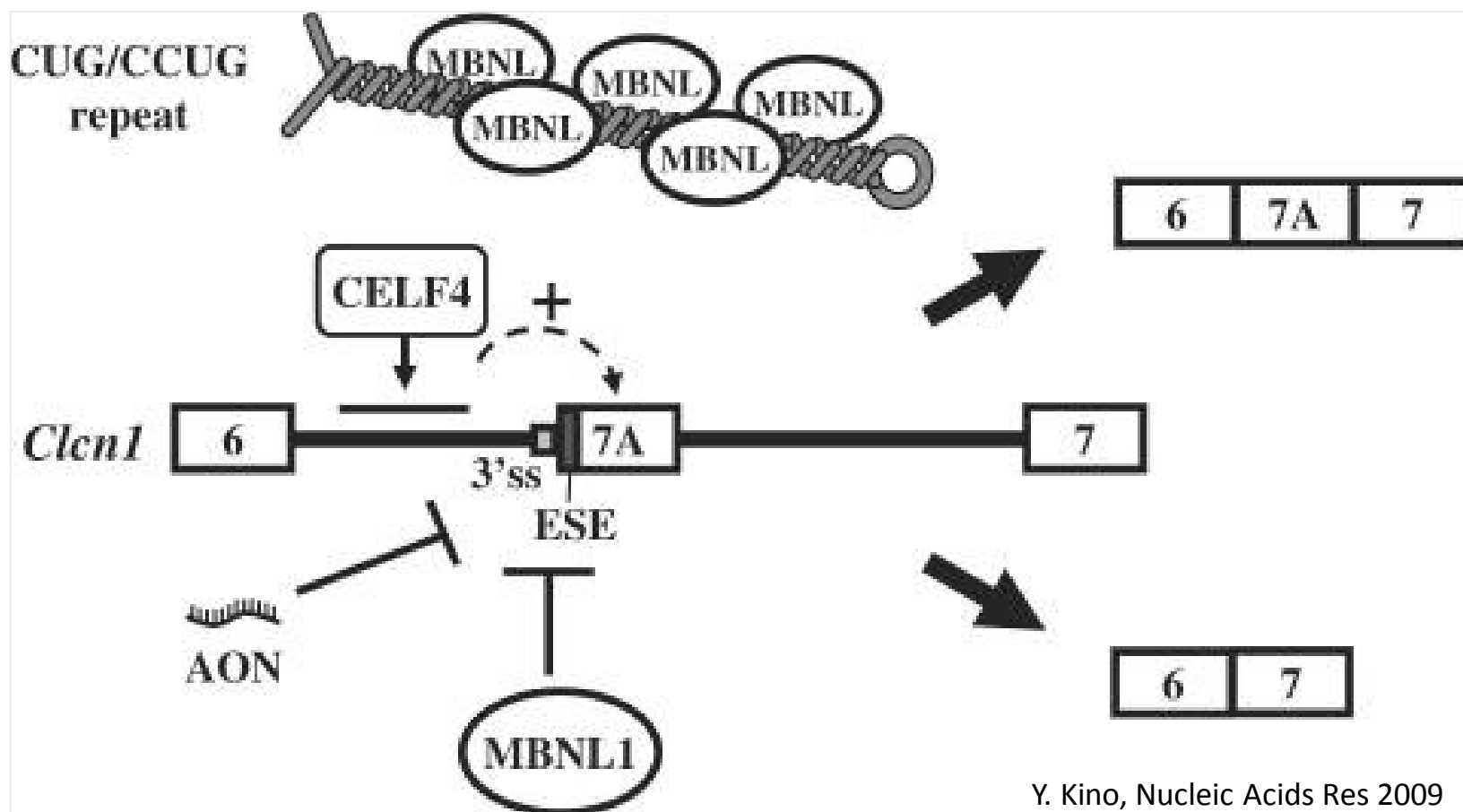
- Expanze CCTG repetice v 1. intronu genu *CNBP1* (3q21, Cellular retroviral nucleic acid-binding protein)
- AD dědičnost



- Pacienti s MD1/MD2  $\Rightarrow$  exprese genů s expanzemi CTG/CCTG
- **Tvorba jaderných struktur, které obsahují RNA s expanzemi CUG/CCUG  $\Rightarrow$  místo vazby RNA-vazebných proteinů (proteiny regulující sestřih mRNA – **MBNL1 protein**)  $\Rightarrow$  nedostatek RNA-vazebných proteinů v místech jejich fyziologické funkce**
- Změny sestřihu – chloridový kanál *CLCN1*,  
.....
- Změny sestřihu mRNA genu *CLCN1*  $\Rightarrow$  nedostatek proteinu *CLCN1*  $\Rightarrow$  myotonie



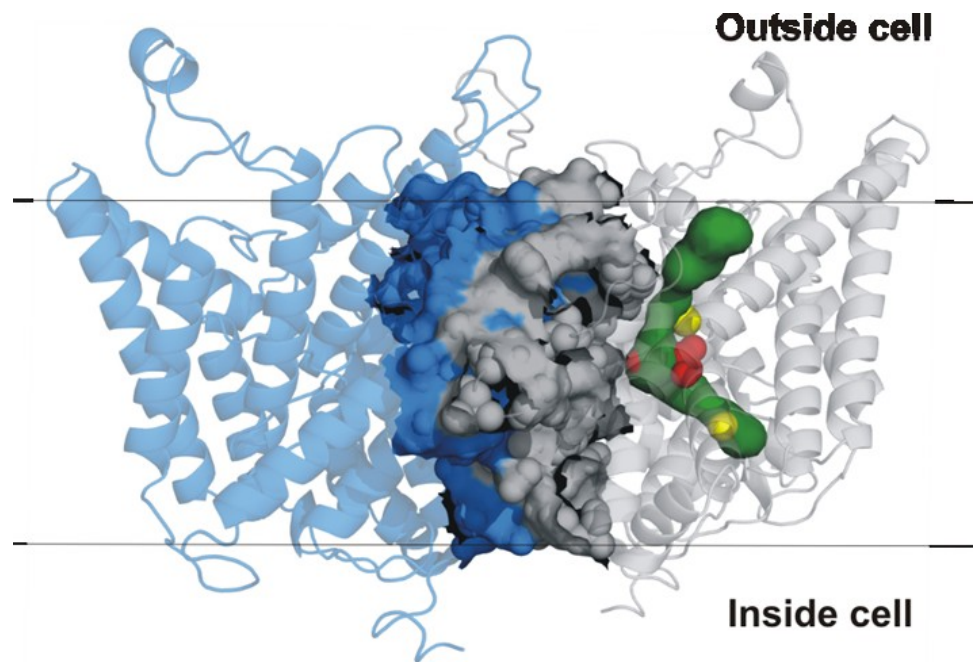
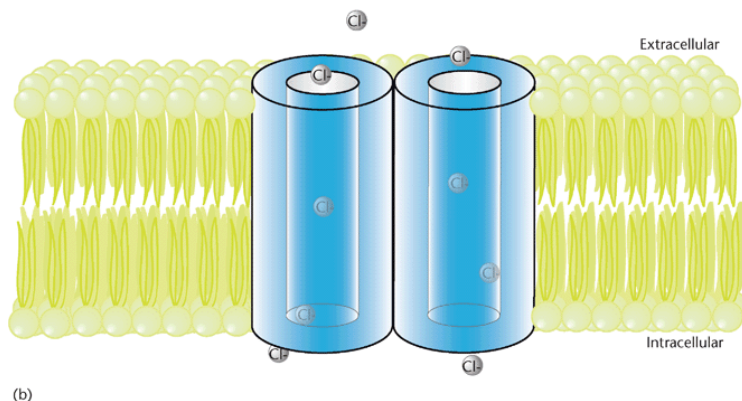
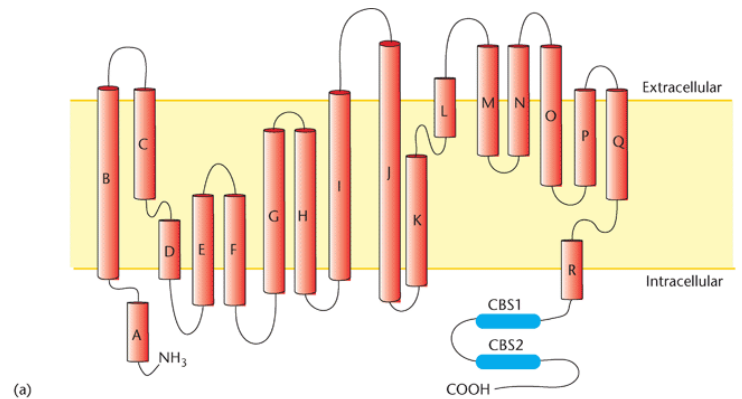
*Myotonic dystrophy is caused by the binding of a protein called Mbnl1 to abnormal RNA repeats. In these two images of the same muscle precursor cell, the top image shows the location of the Mbnl1 splicing factor (green) and the bottom image shows the location of RNA repeats (red) inside the cell nucleus (blue). The white arrows point to two large foci in the cell nucleus where Mbnl1 is sequestered with RNA. Photos by Hongqing Du*



Model regulace setřihu *CLCN1*: 5' konec exonu 7A – lokalizace sekvence *exon splicing enhancer* (ESE). MBNL1 se váže k ESE a potlačuje zařazení exonu 7A do mRNA. Přítomnost expanze CUG/CCUG vede k nedostatku MBNL1 a začlenění exonu 7A do mRNA. Exon 7A obsahuje předčasný terminační kodón ⇒ rozklad mRNA procesem *nonsense mediated mRNA decay*.

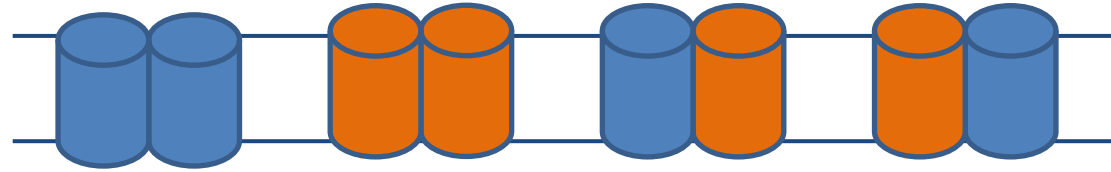
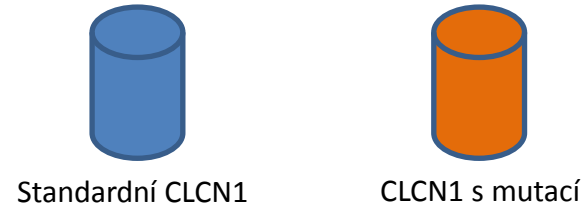
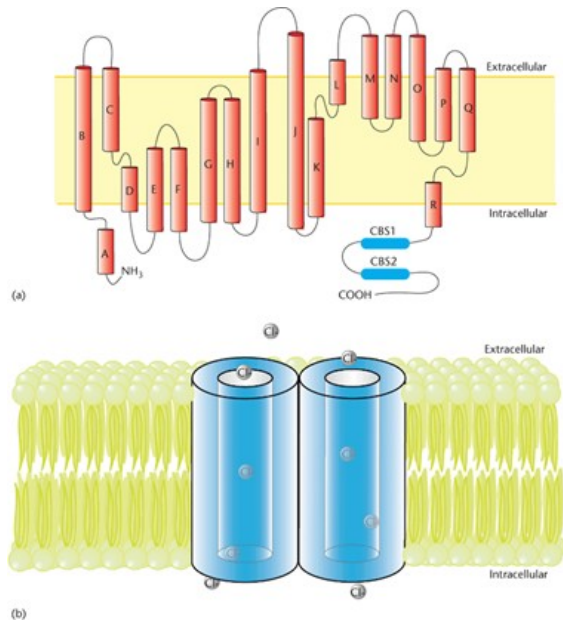
# Myotonia congenita, CLCN1

- Svalová ztuhlost a neschopnost relaxace svalu po kontrakci
- **Gen *CLCN1* (7q35), muscle chloride channel 1**
- **Mutace spojené s AR i AD typem dědičnosti**
- Funkční protein CLCN1– homodimer



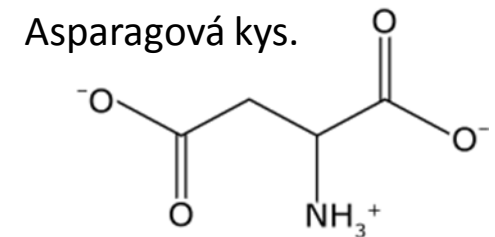
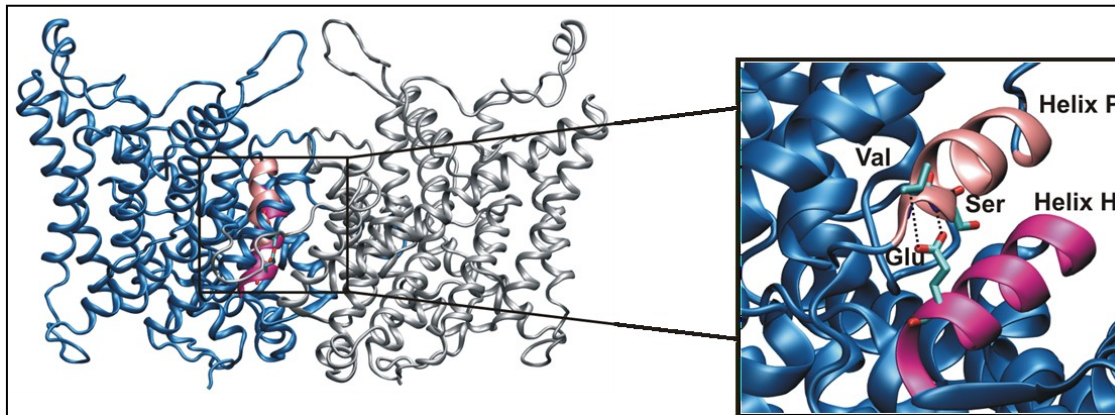
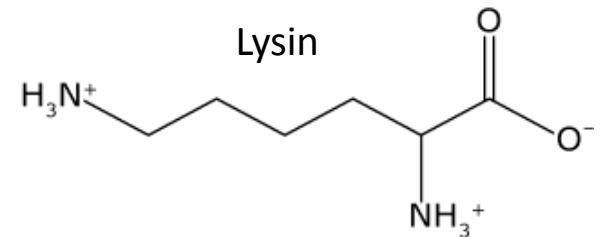
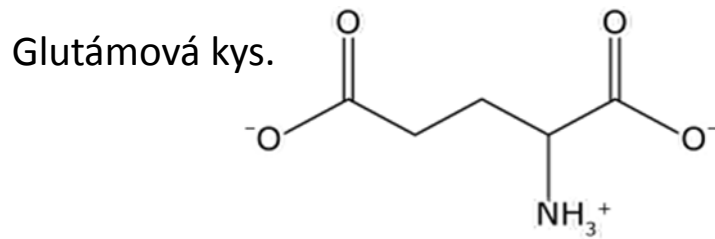
Réblová K., PLoS One 2013

➤ **CLCN1: homodimer**, každá podjednotka vytváří Cl<sup>-</sup> pór.

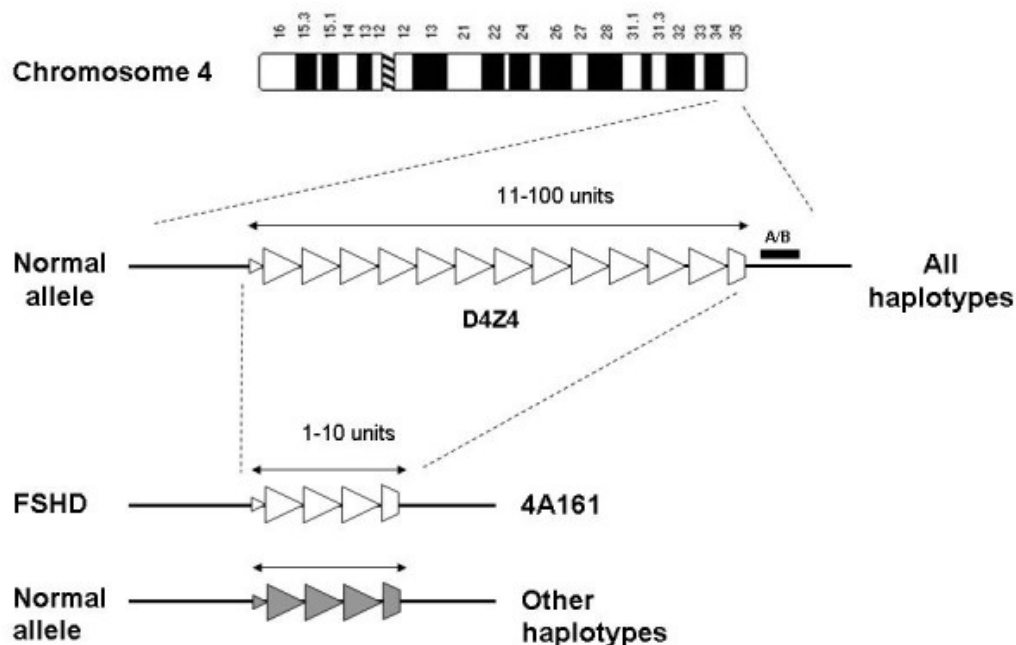
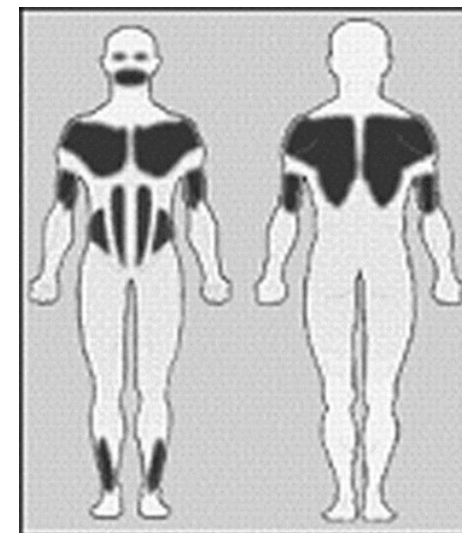


- Heterozygoti (1 standardní *CLCN1*/1 mutantní *CLCN1*) - 25% standardních kanálů, 25% kanálů obsahujících dvě mutantní podjednotky, **50% kanálů obsahujících jednu standardní a jednu mutantní podjednotku (heterodimer)**
- **Dominantní MC je způsobena dominantně-negativním efektem mutantní podjednotky vůči standardní v heterodimeru**

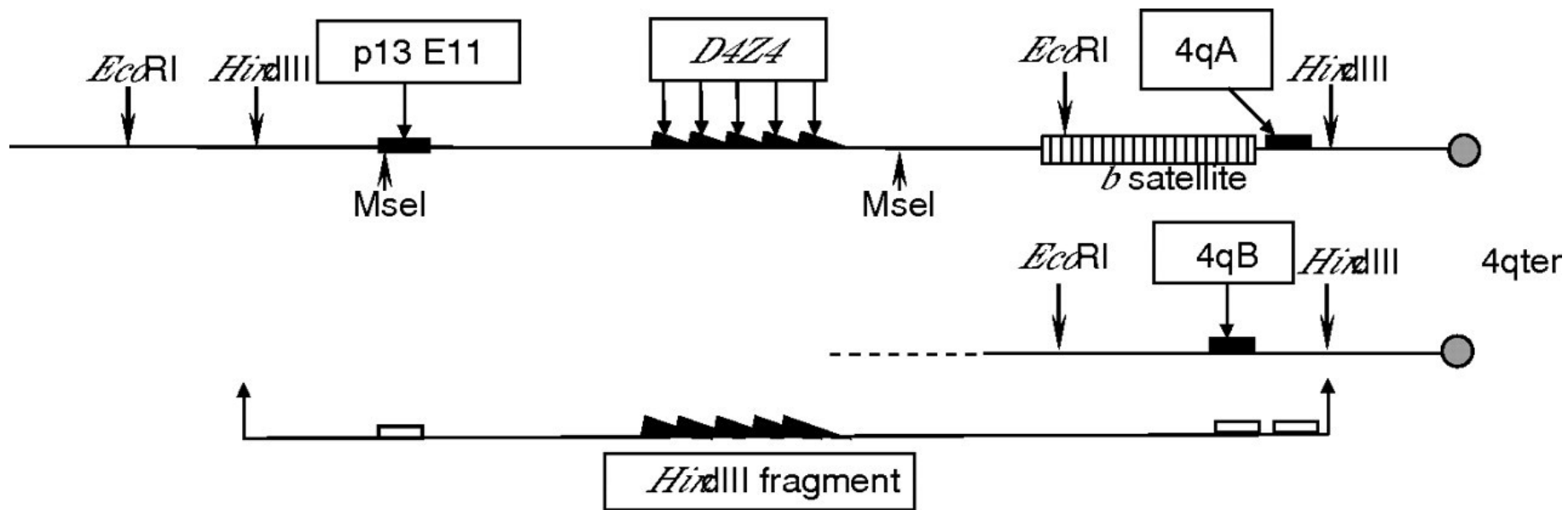
- PTC (předčasný terminační kodón) mutace – recesivní MC
- **Missense mutace – recesivní nebo dominantní MC – souvislost s lokalizací v CLCN1 dimerní struktuře**
- p.(Glu291Lys) – recesivní dědičnost; změna náboje – závažný efekt na strukturu proteinu  $\Rightarrow$  „misfolding“ a degradace proteinu
- p.(Glu291Asp) – dominantní dědičnost; zachování negativního náboje – mírný efekt na strukturu proteinu, tvorba dimeru, dominantně negativní efekt mutace v heterodimeru



- AD dědičnost
- Delece makrosatelitní repetice D4Z4 v subtelomerní oblasti 4q35
- Velikost repetice D4Z4: 3,3 kb



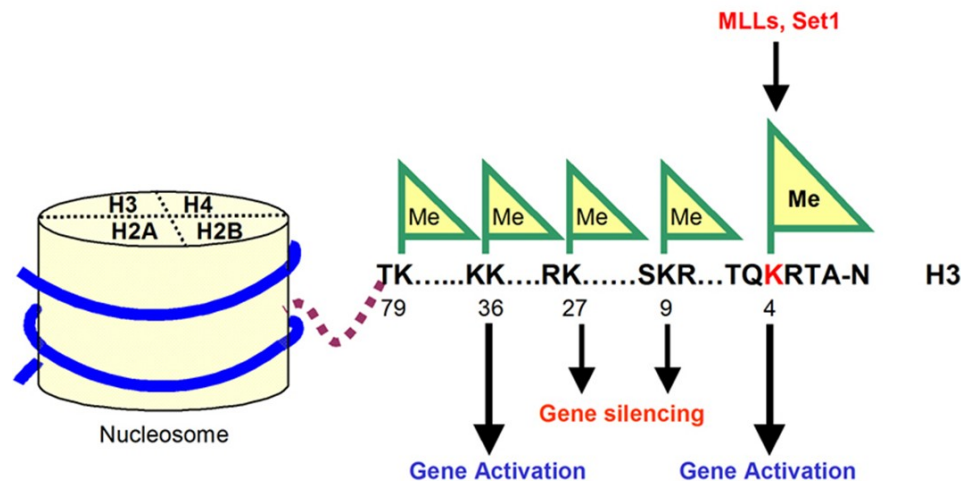
- **Standardní DNA:**  
**11-100 D4Z4**  
**(36-330 kb)**
- **Pacienti s FSHD:**  
**1-10 D4Z4**  
**(<33 kb)**

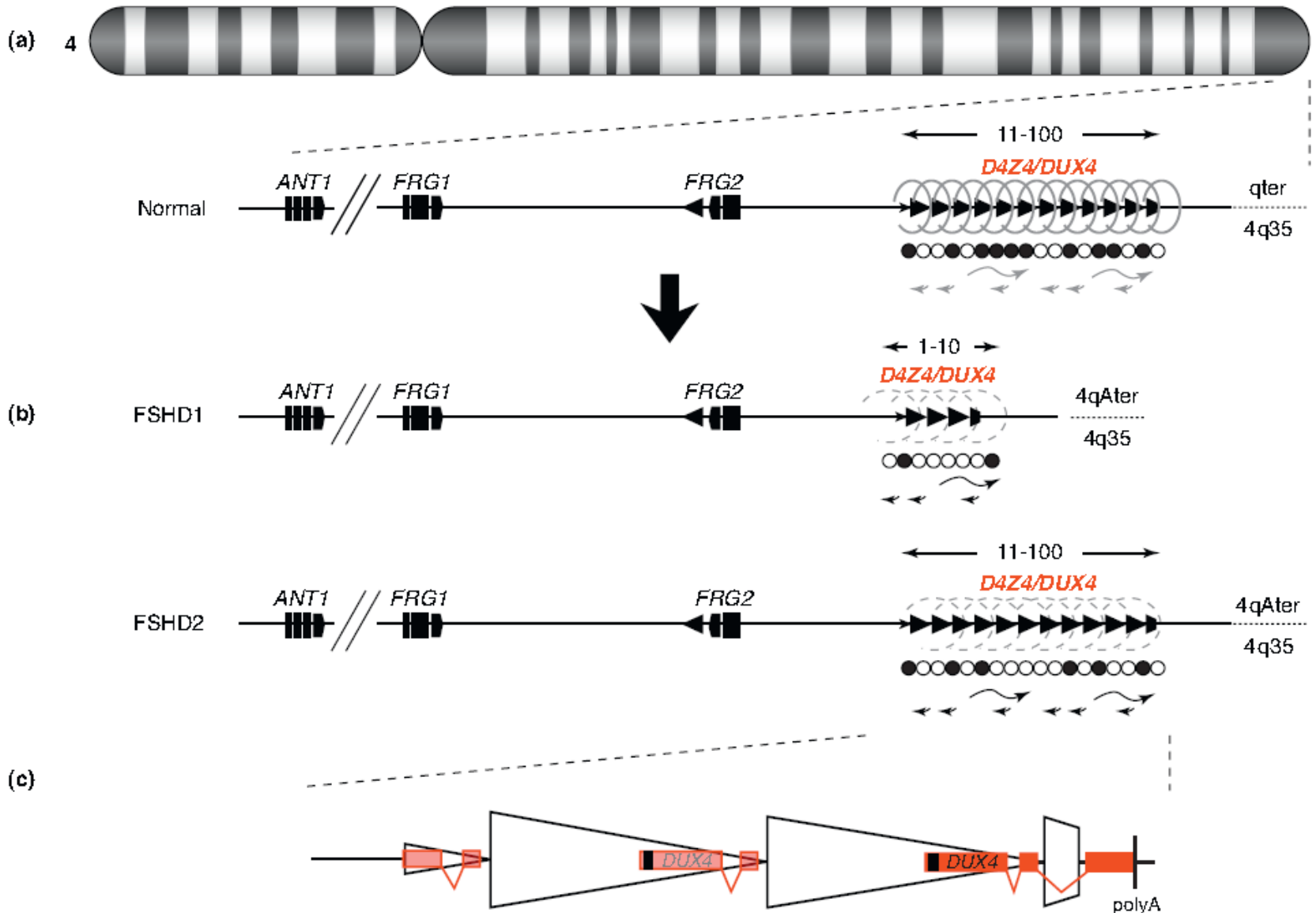


- Byly identifikovány dvě alelické varianty 4q35:  
**4qA and 4qB**
- **FSHD je spojena s delecí D4Z4 na chromozomu 4qA (FSHD)**



- **D4Z4 repetice, 290 CpG dinukleotidů** – potenciální kandidáti pro metylaci DNA (modifikace DNA asociovaná s kondenzací chromatinu a umlčením exprese)
- **FSHD je spojena se změnami metylace DNA a histonové modifikace repetice D4Z4.**
  - **Standardní alela: metylace DNA, H3K9me3 (heterochromatin)**
  - **FSHD alela: DNA hypometylace, H3K9me3 ↓ (modifikace jsou jen na alele 4q35 s delecí D4Z4)**





S.M. van der Maarel, Trends in Molecular Medicine 2011

TRENDS in Molecular Medicine

Repetice D4Z4 – gen *DUX4* (exon 1 a 2). FSHD chromozomy (delece D4Z4 na 4qA) – exprese *DUX4*; poslední repetice D4Z4 – přepis *DUX4* včetně polyadenylačního signálu (stabilizace mRNA) ⇒ protein DUX4 ⇒ apoptóza svalových buněk

- Pacienti s FSHD: detekce fragmentu < 10 repetit D4Z4 (<33 kb)

- Standardní DNA: detekce fragmentu > 11 repetit D4Z4 (36-330 kb)

