

Duchennova muskulárna dystrofia – diagnostika a štruktúra molekulárnogenetických patológií na Slovensku

Robert Petrovič, Mária Fischerová, Ján Chandoga

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky, Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava

Duchennova svalová dystrofia (DMD) je kauzálna spôsobená mutáciami v DMD géne, ktorý kóduje svalový proteín dystrofín. Gén DMD je lokalizovaný na chromozóme X a je to najdlhší gén v ľudskom genóme. V súčasnosti algoritmus molekulárnogenetického vyšetrenia zahŕňa v prvom kroku vyšetrenie metódou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), ktorá odhalí všetky delécie či duplikácie jedného alebo viacerých exónov. V prípade MLPA negatívneho výsledku sa pristupuje k vyhľadávaniu neznámych raritných bodových mutácií DNA sekvenčnou analýzou. Sekvenčnú analýzu génu DMD možno uskutočniť klasickým Sangerovým sekvenovaním alebo sekvenovaním novej generácie (NGS). V práci opisujeme spektrum molekulárnogenetických metód využívaných v minulosti aj aktuálne a prezentujeme DMD pacientov zachytených na našom pracovisku.

KLúčové slová: Duchennova svalová dystrofia, DMD, PCR, MLPA, sekvenovanie DNA

Duchenne muscular dystrophy - diagnostics and structure of molecular-genetics pathologies in Slovakia

Duchenne muscular dystrophy is caused by mutations in the DMD gene that encodes the muscular protein dystrophin. The DMD gene is located on the X chromosome and it is the longest gene in the human genome. Current molecular diagnostic approach includes in the first step the genetic screening algorithm which is performed by Multiplex Ligation- Probe dependent Amplification (MLPA). This method is capable to detect all deletions and duplications of one or more exons. In the case of MLPA negative results, search for unknown rare point mutations continues by DNA sequence analysis. Sequence analysis of the DMD gene can be performed by classical Sanger sequencing or next generation sequencing (NGS). In this work we describe the spectrum of molecular-genetic methods used in the past as well as actual techniques and we summarize the DMD patients diagnosed in our Institute.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy, DMD, PCR, MLPA, DNA sequencing

Neurológia 2020; 15 (1): 25-28

Úvod a klinická manifestácia ochorenia

Dystrofinopatie patria do skupiny zriedkavých geneticky podmienených myopatií charakterizovaných klinicky progredujúcou svalovou slabosťou a atrofiou. Duchennova svalová dystrofia (DMD, OMIM: 310200) a jej miernejšia forma Beckerova svalová dystrofia (BMD, OMIM: 300376) patria medzi najfrekvencovanejšie ochorenia s X-viazanou recesívnou dedičnosťou. Ochorenie postihuje približne 1 z 3 500 chlapcov v prípade DMD, 1 z 20 000 chlapcov v prípade BMD a je spôsobené mutáciami v géne *DMD*, ktorý kóduje svalový proteín dystrofín. Klinická manifestácia, hlavne vo forme kardiomyopatie, je opisovaná aj u časti žien – prenášačiek (10 – 20 %). Prvé klinické prejavy ochorenia sa obvykle objavujú okolo tretieho roka života, takmer vždy však zaznamenávame predtým miernu psychomotorickú retardáciu a neskorší začiatok samostatnej chôdze. Typickým prejavom je porucha chôdze, ktorá je nestabilná, kolísavá s tendenciou došľapovať na špičky. Časté sú problémy s chôdzou do schodov, s behom, so skákaním a pády. Jedným z klasických

príznakov je Gowersov manéver. Nápadná je pseudohypertrofia lýtok spôsobená náhradou svalovej hmoty tukovým väzivom. Intelekt je postihnutý asi u 1/3 pacientov. Najčastejšou príčinou úmrtia DMD pacientov býva srdcové alebo pľúcne zlyhanie.

Molekulárna podstata ochorenia

Gén *DMD* je lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu X v oblasti Xp21.1, má veľkosť približne 2,4 Mb (0,08 % genómu) a je to najdlhší gén v humánnom genóme. Gén *DMD* bol prvýkrát opísaný v roku 1987 a bol identifikovaný pozíčným klonovaním⁽¹⁾. Tento gén je zložený zo 79 exónov a 78 intrónov s variabilnou dĺžkou od 107 bp (intrón 14) až po viac ako 200 kbp (intrón 44), pričom exóny spolu predstavujú len 0,6 % génu a zvyšok tvoria dlhé intrónové sekvencie⁽²⁾. Gén *DMD* kóduje 7 rôznych izoform dystrofínu. Najdlhší transkript je prepisovaný do 16 kb dlhej mRNA, z ktorej vzniká proteín dystrofín s dĺžkou 3 685 aminokyselín, a molekulovej hmotnosti 427 kDa (označovaný ako Dp427). Expresia dystrofínu plnej dĺžky je tkanivovo

špecifická (mozog, svaly, Purkyněho bunky v kôre mozočka). Gén *DMD* obsahuje ďalšie štyri distálne umiestnené promotory podmieňujúce vznik kratších izoform dystrofínu, ktoré sú exprimované v retine (Dp260), mozgu (Dp140), vo Schwannových bunkách (Dp116) a ubikvitárne (Dp71).

Podiel mutácií v géne *DMD* spôsobujúcich ochorenie má podľa literárnych zdrojov nasledovné zastúpenie: 60 % pacientov má veľkú deléciu (zasahuje najmenej 1 exón), 10 % veľkú duplikáciu (1 a viac exónov) a 30 % pacientov má iné raritné mutácie (bodové mutácie typu missense a nonsense, inzerčno-delečné mutácie, zostrihové mutácie, malé inverzie a komplexné prestavby). Delécie a duplikácie sú združené do dvoch hot-spot oblastí. Prvá je lokalizovaná medzi exónmi 2 až 20, druhá medzi exónmi 44 až 53⁽³⁾. Rozsiahla veľkosť génu *DMD* zapríčiňuje jeho veľkú mutačnú rýchlosť pričom až 25 – 33 % zmien je vzniknutých *de novo*⁽⁴⁾. Z týchto prípadov je približne 10 % spôsobených gonádovým mozaicizmom u jedného z rodičov, čo predstavuje vážnu prekážku pri molekulárnej diagnostike, pretože nikdy nie sme schopní na 100 % zaručiť, že matka nie je prenášačkou *DMD/BMD*. Napriek tomu, že korelácia genotypu a závažnosti fenotypového prejavu nie je vždy jednoznačná, vo všeobecnosti platí, že rozlíšenie *DMD* a *BMD* je možné na základe pravidla, či mutácia zachová čítací rámec génu. V prípade, ak je porušený čítací rámec (frameshift mutácia), je pri prepise mRNA vytvorený predčasný terminačný kodón a syntetizovaný proteín je nefunkčný, čo vedie k závažnejšej forme ochorenia (*DMD*). V opačnom prípade, ak je zachovaný čítací rámec (in-frame mutácia), dochádza len k čiastočnej delécii v mRNA, čo vedie k syntéze kratšieho, ale parciálne funkčného dystrofínu (v závislosti od veľkosti a miesta delécie)⁽⁵⁾.

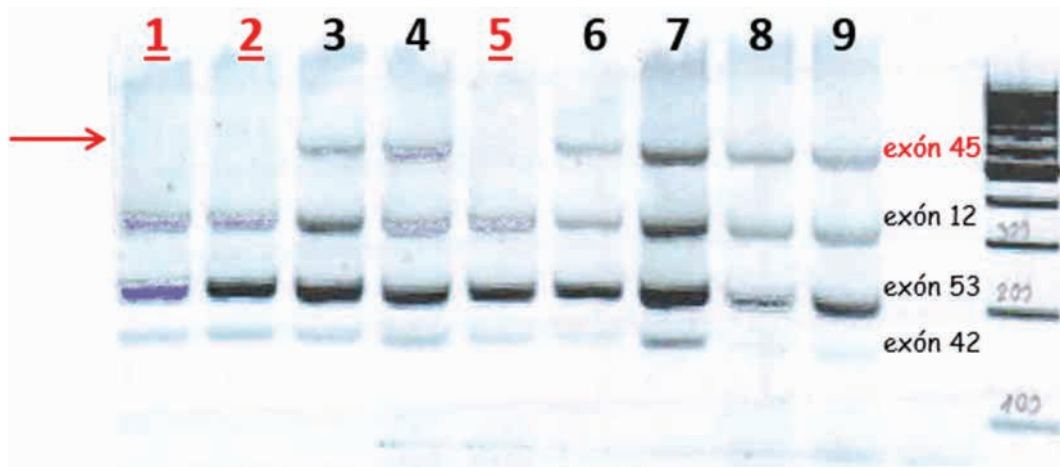
Laboratórna diagnostika

Biochemická diagnostika: Prvotná diagnostika je založená na klinickom obraze a laboratórnych výsledkoch. Biochemické vyšetrenie z krvi vykazuje zvýšené hodnoty transamináz AST, ALT (myogénneho pôvodu), svalových enzýmov (CK, LD) a myoglobínu. Najužitočnejšia je hodnota CK (kreatínkináza), ktorá je u *DMD* pacientov obvykle zvýšená 40- až 60-násobne nad hornú hranicu normy a väčšinou je elevovaná aj u

heterozygotných prenášačiek (približne 10-násobne). Hladina CK je vysoko zvýšená už v presymptomatickom štádiu, spravidla hneď po narodení. S progresiou *DMD* dochádza paradoxne k postupnému poklesu hladiny CK, lebo svalové vlákna progresívne atrofujú a sú nahradzané tukovým a väzivovým tkanivom.

Molekulárnogenetická diagnostika: Medzi vôbec prvé molekulové aplikácie v humánnej klinickej genetike patrila nepriama DNA analýza *DMD* génu pomocou rádioaktívne značeného Southern blotu, ktorá nasledovala po štiepení genómovej DNA pacienta reštrikčnými endonukleázami. Táto metóda umožňovala vykonať vyšetrenie v konkrétnej rodine (napr. prenatalnu diagnostiku, identifikáciu postihnutých a prenášačok), ale nebolo možné presne určiť typ konkrétnej kauzálnej mutácie. Zistenie, že väčšina delécií sa vyskytuje v oblasti 2 hotspotov, umožnila v 80. rokoch vyvinutie metódy multiplexnej PCR, keď analýza 18 exónov v 2 mixoch umožňovala až 98 % záchytnosť delécií⁽⁶⁾. Na Slovensku bol priekopníkom v molekulovej diagnostike *DMD* génu prof. Kádasi a kol.⁽⁷⁾ Modifikácia tejto metódy sa využívala dlhé roky aj na našom pracovisku (**obrázok 1**), výhodou bola rýchlosť a ekonomická nenáročnosť danej metódy, nevýhodou neschopnosť detegovať presné body zlomu zistených delécií. V súčasnosti sa daná metóda využíva len príležitostne, a to pri verifikácii niektorých MLPA nálezov (jednoexónových delécií). Metóda multiplexnej amplifikácie prób závislých od ligácie (MLPA – z angl. multiplex ligation-dependent probe amplification) v súčasnosti plne nahradila v minulosti využívanú multiplexnú PCR, ktorou nebolo možné identifikovať duplikácie či prenášačstvo delécie u žien heterozygotiek. MLPA je metóda schopná v jednej reakcii (v jednej skúmavke a vzorke) detegovať zmeny v počte kópií až v 50 rôznych nukleotidových sekvenciách. Metódou MLPA možno rýchlo identifikovať amplifikácie (duplikácie) a delécie veľkého počtu exónov použitím patientskej DNA. Princíp MLPA spočíva v multiplexnej amplifikácii až 50 špecifických nukleotidových sekvencií použitím jedného páru primerov, pričom jeden primer je fluorescenčne označený. Každá MLPA próba pozostáva z dvoch oligonukleotidov (dve hemipróby), pričom každý oligonukleotid obsahuje jednu zo sekvencií rozpoznávanú PCR primermi. Próba vznikne jedine za predpokladu hybridizácie dvoch oligonukleotidov (hemiprób)

Obrázok 1. Multiplexná PCR amplifikácia *DMD* génu umožňujúca detekciu frekventovaných delécií. Pacienti v dráhe číslo 1, 2 a 5 nemajú prítomný exón číslo 45 (vyznačené šípkou).



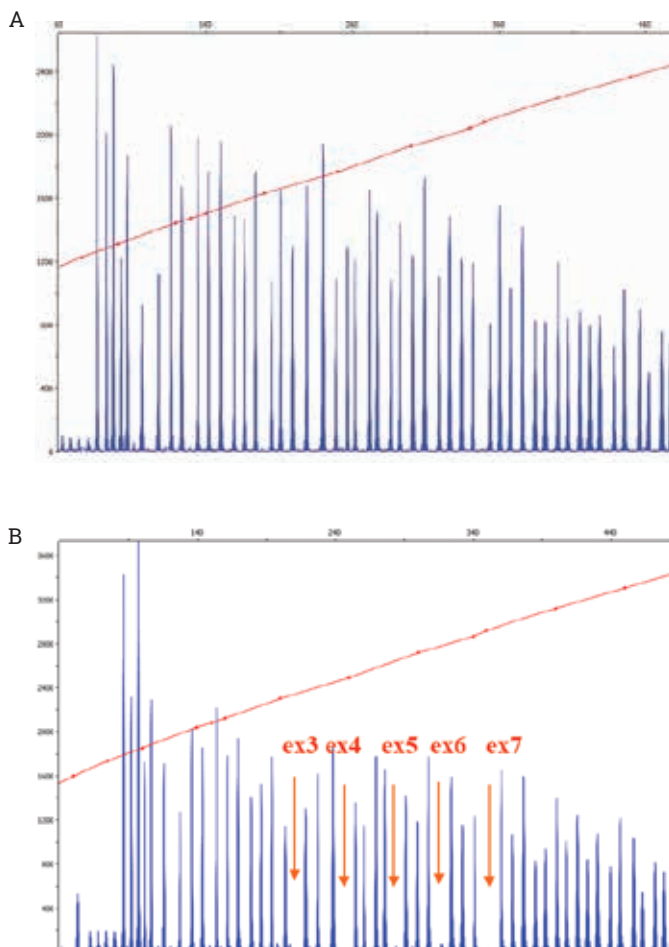
k cieľovej sekvencii (génu) a po ligácii enzýmom ligázou. Obidve ligované próby sú exponenciálne amplifikované. Množstvo ligovaných prôb teda závisí od množstva cieľových sekvencií v pôvodnej patientskej vzorke. Výsledné PCR produkty sú analyzované kapilárnou elektroforézou (fragmentačná analýza) a počítačovo vyhodnotené. Na **obrázku 2** je MLPA záznam pacienta s deléciou exónov 3-7 v *DMD* géne.

Aktuálne algoritmus molekulárno-genetického vyšetrenia zahŕňa v prvom kroku vyšetrenie metódou MLPA, ktorá spoľahlivo odhalí delécie či duplikácie jedného alebo viacerých exónov. V prípade MLPA negatívneho výsledku sa pristupuje k vyhľadávaniu neznámych raritných bodových mutácií DNA sekvenčnou analýzou. Sekvenčná analýza génu *DMD* sa uskutočňuje klasickým Sangerovým sekvenovaním alebo sekvenovaním novej generácie (Next-Generation Sequencing; NGS) (8). Príklad pacienta s bodovou mutáciou je znázornený na **obrázku 3**. Daný postup identifikuje prevažnú väčšinu patogénnych variantov v *DMD* géne, nezistených zostane len približne 0,3 % prípadov (zostrihové mutácie hlboko v intrónoch), ktoré možno vyšetriť

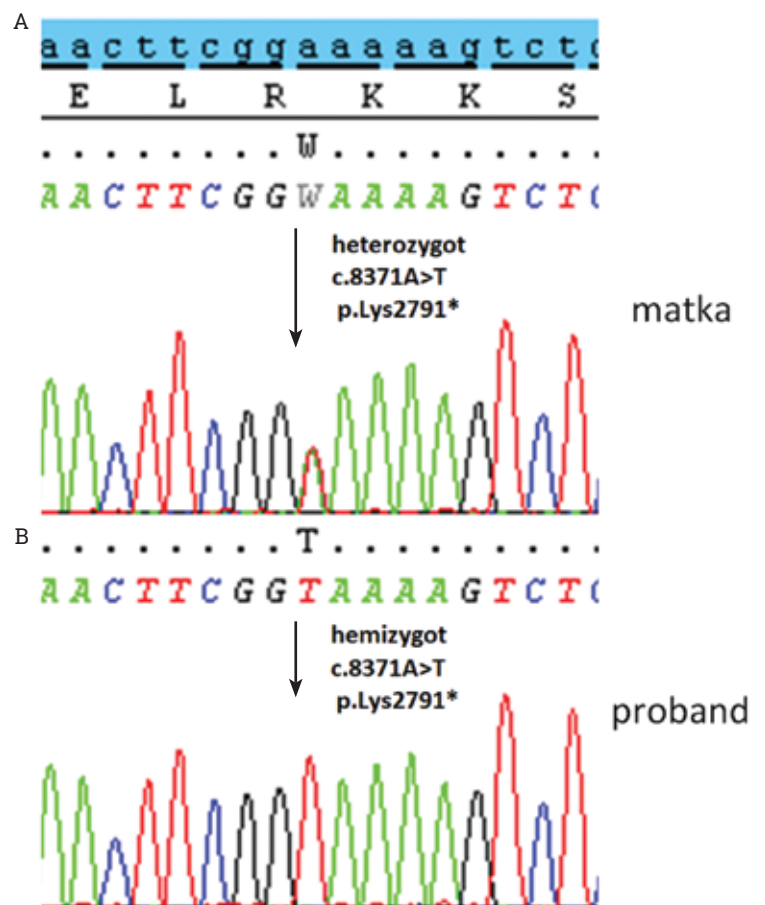
na úrovni mRNA alebo proteínu (detekcia dystrofínu metódou Western blot zo svalovej biopsie). Po molekulárno-genetického potvrdení, stanovení diagnózy DMD/BMD je odporúčané cieľné vyšetrenie ďalších rodinných príslušníkov s rizikom.

V Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB Bratislava je dostupné kompletne molekulárno-genetické vyšetrenie génu *DMD*. História vyšetrení siaha do roku 1994, keď sa zaviedla metóda multiplexnej PCR reakcie, ktorá bola schopná detegovať najfrekvencovanejšie delécie u pacientov mužského pohlavia. V roku 2008 sa pridala metóda MLPA, ktorá zachytí delécie aj duplikácie všetkých exónov u oboch pohlaví. Sekvenčná analýza detegujúca bodové mutácie sa začala klasickou Sangerovou metódou postupne vykonávať od roku 2010. V roku 2016 bola na pracovisku zavedená NGS technológia na analýzu tohto génu, čím sa zväčšila kapacita tohto vyšetrenia na pracovisku a výrazne skrátil čas diagnostiky. V priebehu tohto obdobia bolo na našom pracovisku diagnostikovaných 170 DMD/BMD pacientov mužského pohlavia a 62 pacientok prenášačiek, výsledky sú sumarizované v **tabuľke 1**.

Obrázok 2. Detekcia delécií a duplikácií v *DMD* géne analyzovaná metódou MLPA. V kontrolnej vzorke (A) sú prítomné všetky analyzované fragmenty, na rozdiel od DMD pacienta (B), u ktorého je zistená delécia exónov 3, 4, 5, 6 a 7 v *DMD* géne (znázornené šípkami).



Obrázok 3. Detekcia bodových mutácií klasickým Sangerovým sekvenovaním. Príklad nonsense mutácie c.8371A>T (p.Lys2791*) lokalizovanej v 57. exóne *DMD* génu. U pacienta probanda (B) je mutácia prítomná v hemizygotnom stave (znázornené šípkou) a u jeho matky prenášačky (A) je daný patogénny variant prítomný v heterozygotnom stave (znázornené šípkou).



Tabuľka 1. Molekulárno-geneticky diagnostikovaní pacienti s potvrdenou mutáciou v *DMD* géne v Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB

charakteristika patientskej kohorty	obdobie	metóda	typ mutácie	Počet potvrdených prípadov
DMD/BMD pacienti mužského pohlavia	2004 – 2010	PCR	veľká delécia	71
DMD/BMD pacienti mužského pohlavia	2010 – 2019	MLPA	veľká delécia	78
DMD/BMD pacienti mužského pohlavia	2010 – 2019	MLPA	veľká duplikácia	13
DMD/BMD pacienti mužského pohlavia	2016 – 2019	sekvenovanie	bodová mutácia	8
DMD/BMD pacientky/prenášačky ženského pohlavia	2010 – 2019	MLPA	veľká delécia	53
DMD/BMD pacientky/prenášačky ženského pohlavia	2010 – 2019	MLPA	veľká duplikácia	7
DMD/BMD pacientky/prenášačky ženského pohlavia	2016 – 2019	sekvenovanie	bodová mutácia	2

Záver

Presná a včasná diagnóza DMD hrá rozhodujúcu úlohu v efektívnom manažmente pacientov a potenciálne môže viesť ku skoršiemu terapeutickému zásahu. Znalosť mutácie (genotypu pacienta) umožňuje liečbu pomocou mutačne špecifických terapií, prípadne vhodné zaradenie pacienta do prebiehajúcich alebo budúcich klinických skúšok^(9,10). Pre špecifický typ molekulárnej patológie (bodová mutácia typu nonsense – predčasný terminačný kodón bez posunu čítacieho rámca) je už dnes dostupné farmakoterapeutické ovplyvnenie ochorenia schválené EMA (European Medicines Agency). Pri tomto type mutácie sa terapeuticky využíva preparát Ataluren, pričom účinok tejto

malej molekuly umožňuje prekonať molekulárnu patológiu (terminačný kodón) a v konečnom dôsledku zmierniť fenotypové prejavy ochorenia.

Vyhlásenie o bezkonfliktnosti: nemáme potenciálny konflikt záujmov.

Adresa pre korešpondenciu:

RNDr. Robert Petrovič, PhD.
 Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB,
 oddelenie molekulovej a biochemickej genetiky
 Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava
 email: robert.petrovic@fmed.uniba.sk

Literatúra

- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987; 50(3): 509-17.
- Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*. 1993; 3(4): 283-91.
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet*. 1989; 45(6): 835-47.
- Tuffery-Giraud S, Bérout C, Leturcq F, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 2009; 30(6): 934-945.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989; 45(4): 498-506.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(23): 11141-56.
- Kádasi L, Gécz J, Saksová L. Frequency and distribution of deletions in dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients from an east-European Slavonic population. *Gene Geogr*. 1991; 5(3): 137-40.
- Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016; 53(3): 145-51.
- Aartsma-Rus A, Hegde M, Ben-Omran T, et al. Evidence-Based Consensus and Systematic Review on Reducing the Time to Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Pediatr*. 2019; 204: 305-313.
- Nakamura A. Mutation-Based Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: From Genetic Diagnosis to Therapy. *J Pers Med*. 2019; 9(1): E16.