Postępy Psychiatrii i Neurologii, 1997, 6, 43–48

Analiza DNA w diagnostyce dystrofii mięśniowej Duchenne'a-Beckera

DNA analysis in diagnostics of the Duchenne-Becker muscular dystrophy

JANUSZ ZIMOWSKI

Z Zakładu Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

STRESZCZENIE. *W artykule omówiono genetyczne podłoże dystrofii mięśniowej Duchenne'a-Beckera. Przedstawiono sposób dziedziczenia tych postaci dystrofii i rolę mutacji w ich genezie. Ukazano również możliwości analizy genetycznej rodzin z tą chorobą i przydatność badania prenatalnego. (red.)*

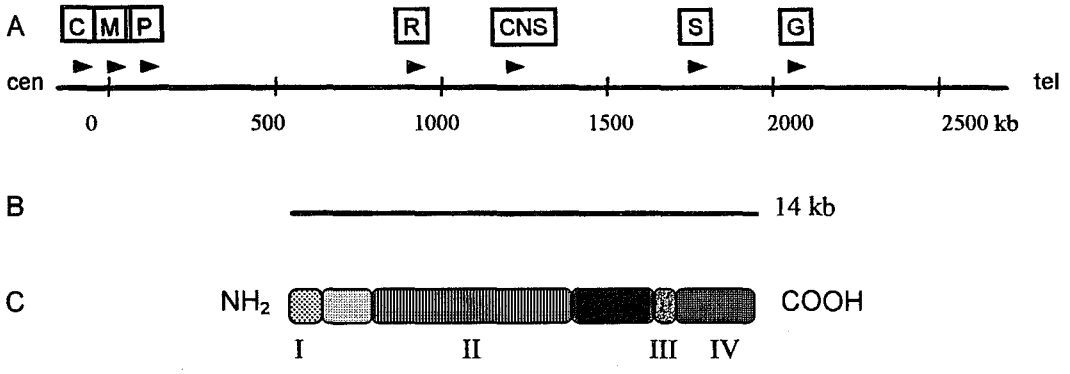
SUMMARY. *Genetic factors underlying the Duchenne-Becker muscular dystrophy are overviewed. The way of inheriting these types of dystrophy, as well as the role of mutations in their origin, are discussed. Moreover, possibilities of a genetic analysis of families suffering from the disease, and usefulness of prenatal examinations are shown (ed.).*

Słowa kluczowe: dystrofia mięśniowa Duchenne'a-Beckera / analiza DNA
Key words: Duchenne-Becker muscular dystrophy / DNA analysis

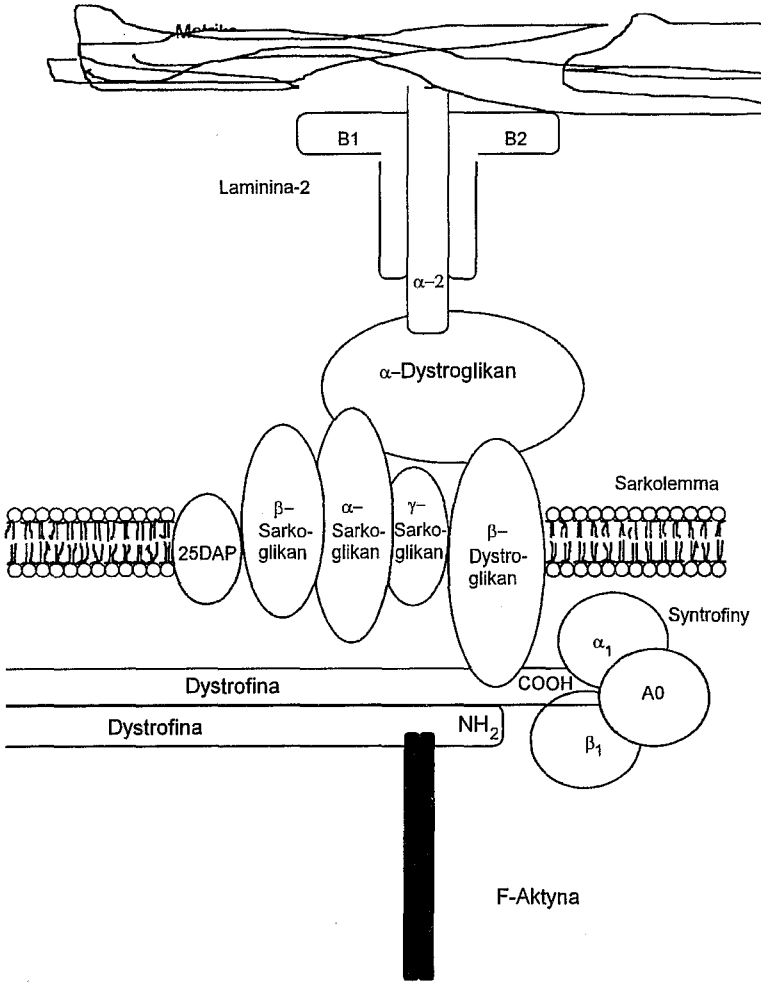
PODŁOŻE MOLEKULARNE

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest ciężkim, postępującym, nieodwracalnym zanikiem mięśni dotykającym chłopców. Początkowe objawy chorobowe obserwuje się u kilkuletnich dzieci. Są to kłopoty z wstawaniem, chodzeniem po schodach, bieganiem, niekiedy towarzyszy im upośledzenie umysłowe. Pacjenci przestają chodzić w wieku 8–12 lat, a śmierć wywołana niewydolnością krążenia lub/i oddechową następuje pod koniec drugiej dekady życia. Choroba wywoływana jest mutacją dziedziczoną w sposób recesywny, sprzężony z płcią (2/3 przypadków) lub mutacją nowopowstałą (1/3 przypadków). Częstość zachorowań określa się jako 1 na 3 500 żywo urodzonych chłopców. Znana jest rzadsza, alleliczna postać choroby nazwana dystrofią mięśniową Beckera (BMD), objawiająca się łagodniejszym i wolniejszym przebiegiem niż DMD. Niektórzy chorzy dotknięci BMD przez wiele lat zachowują zdolność do samodzielnego chodzenia i dożywają sędziwego wieku [1].

Podłożem molekularnym obu postaci choroby jest uszkodzenie genu dystrofiny. Ten największy z dotychczas poznanych ludzkich genów, długości 2,5 mln nukleotydów, położony jest na chromosomie X w cytogenetycznym prążku p21. Składa się on z 79 egzonów, których łączna długość wynosi 14 tysięcy nukleotydów. Dotychczas poznano trzy tkankowo specyficzne promotory poprzedzające gen: kory mózgowej (C), mięśniowy (M) i komórek Purkinjego (P) oraz cztery promotory wewnątrzgenowe: siatkówki oka (R), centralnego układu nerwowego (CNS), komórek Schwanna (S) i komórek gleju (G) (rys. 1) [2]. Białkowy produkt genu – dystrofina pełnej długości o ciężarze cząsteczkowym 427 kD występuje we wszystkich włóknach mięśniowych. Jest ona połączona z kompleksem glikoprotein błonowych (*dystrophin glicoprotein complex*, DGC) tworząc strukturalno-funkcjonalny pomost pomiędzy cytoszkieletem



Rysunek 1. Schemat budowy genu dystrofiny, dojrzałego transkryptu oraz produktu translacji



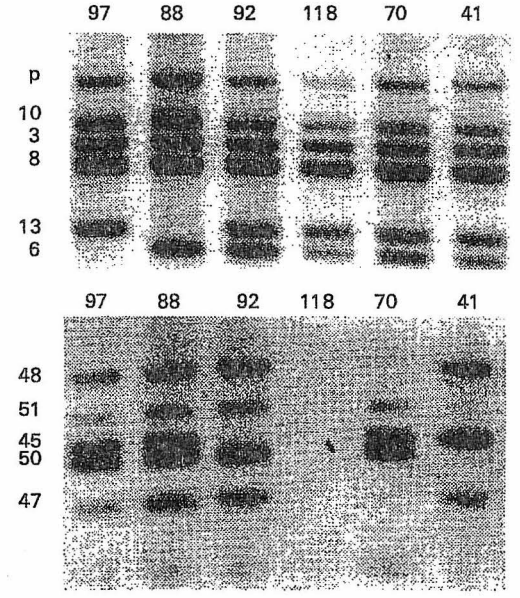
Rysunek 2. Schemat organizacji kompleksu DGC

komórki a matriks zewnątrzkomórkową (rys. 2) [3]. Immunochemiczne barwienie skrawków włókien mięśniowych ujawnia całkowity brak dystrofiny u chorych z DMD i znacznie zmniejszoną jej ilość u chorych z BMD.

Wykryte w genie dystrofiny mutacje to w 60–65% przypadków delecje, w 5–10% duplikacje i w około 30% mutacje punktowe. Występują one zarówno w DMD, jak i BMD. Dokładniejsza analiza zakresu delecji wykazała, że nawet podobne mogą wywoływać ostrą i łagodną postać choroby. Obserwację tę tłumaczy hipoteza Monaco, która mówi, że mutacje naruszające fazę odczytu powodują całkowity brak białka (pojawienie się kodonu stop za miejscem delecji lub powstanie białka o zupełnie zmienionej sekwencji), zaś mutacje zachowujące fazę odczytu – powstanie uszkodzonego białka (ang. *truncated*), pozbawionego jedynie tej części, która odpowiada zakresowi delecji. Uszkodzone białko może nadal, przynajmniej częściowo, pełnić swoją funkcję we włóknie mięśniowym. Hipoteza Monaco znajduje potwierdzenie w 95% przypadków [4].

Znanych jest szereg chorób o podobnym przebiegu klinicznym, wywołanych recesywnymi mutacjami autosomalnych genów kodujących białka kompleksu DGC. Są to: ostra dziecięca autosomalna recesywna dystrofia mięśniowa (SCARMD), wrodzona dystrofia mięśniowa (CMD) i dystrofia mięśniowa kończynowo-obręczowa (LGMD), których podłożem molekularnym jest uszkodzenie kompleksu DGC [5]. Postawienie jednoznacznej diagnozy, zwłaszcza u pacjentów w wieku kilku lat lub starszych z łagodnym przebiegiem choroby, nastręcza wiele trudności. Molekularna weryfikacja rozpoznania jest możliwa albo poprzez badanie białka, albo DNA genu. Materiałem do immunochemicznego badania białka musi być wycinek mięśnia, na co nie wszyscy pacjenci wyrażają zgodę, zaś materiałem do analizy DNA może być każda tkanka, np. łatwo dostępna krew. Analiza DNA może również służyć ustalaniu nosicielstwa zmutowanego genu i diagnostyce prenatalnej.

Jak wspomniano wyżej, w DMD/BMD najczęstszymi mutacjami są delecje w genie dystrofiny. Obejmują one różnej wielkości fragmenty, od pojedynczych egzonów do całego genu. Stwierdzono, że rozkład ubytków nie jest losowy i grupują się one w dwóch „gorących" miejscach, co ułatwia ich poszukiwanie. Wykrycie delecji jest jednoznacznym potwierdzeniem wcześniejszego rozpoznania, zaś jej niewykrycie nie zaprzecza wcześniejszej diagnozie. Sugeruje to możliwość występowania innego rodzaju uszkodzenia w genie dystrofiny lub możliwość mutacji w innym genie również uszkadzającej mięsień. Poszukiwanie mutacji punktowych w tak ogromnym genie, jakim jest gen dystrofiny, choć możliwe, jest niezwykle pracochłonne i stosowane rzadko, stąd potrzeba uzupełniających badań immunochemicznych rozstrzygających w przypadku braku delecji. Nie poszukuje się delecji u kobiet – ewentualnych nosicielek, gdyż prawidłowy allel obecny na drugim chromosomie X maskuje uszkodzoną kopię genu. Na rys. 3



Rysunek 3. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji 6 i 5 egzonów u 6 pacjentów z DMD. Liczby powyżej elektroforogramów oznaczają numery próbek DNA, liczby z boku – numery amplifikowanych egzonów

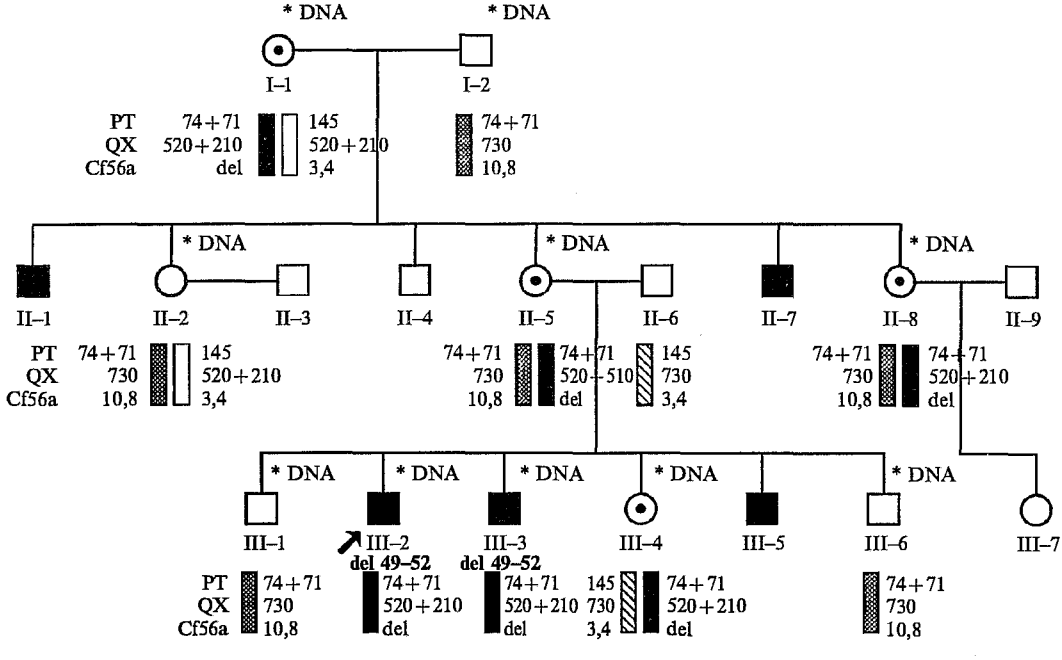
zamieszczono przykładowy autoradiogram po hybrydyzacji z sondą Cf56a i zastosowaniu enzymu PstI oraz zdjęcie z elektroforetycznego rozdziału produktów reakcji PCR-*multiplex*. Badanie wykonano dla grupy chorych z podejrzeniem DMD/BMD wykrywając różnej wielkości delecje.

Poznana jest pełna sekwencja genu dystrofiny i jej rozdział na poszczególne egzony. Umożliwia to, przy precyzyjnym określeniu zakresu delecji, stwierdzenie, czy narusza ona fazę odczytu, czy zachowuje, a co za tym idzie, daje możliwość przewidywania z wysokim prawdopodobieństwem ostrości przebiegu choroby. Pamiętać jednak trzeba o możliwych wyjątkach, które mają miejsce u 5% przypadków.

ANALIZA PRZYPADKÓW RODZINNYCH

Za przypadek rodzinny wystąpienia DMD/BMD należy uważać sytuację, gdy kobieta ma więcej niż jednego chorego syna lub poza chorym synem miała chorego brata lub kuzyna, ale tylko w rodzinie swojej matki. Pozostałe kobiety w takiej rodzinie mają 50% ryzyko przenoszenia uszkodzonego genu dystrofiny. Analiza dziedziczenia poszczególnych alleli tego genu z zastosowaniem technik genetyki molekularnej (RFLP, dziedziczenie się sekwencji mikrosatelitarnych) u wszystkich członków rodziny daje możliwość określenia nosicielstwa z prawdopodobieństwem bliskim 100% lub, w szczególnych przypadkach, z całkowitą pewnością.

W celu określenia nosicielstwa uszkodzonego genu u siostry chorego konieczne jest dysponowanie DNA zainteresowanej, jej matki, ojca i chorego brata, o ile jest to możliwe również zdrowego brata (w celu wykluczenia możliwej rekombinacji). W celu określenia nosicielstwa zmutowanej kopii genu u siostry matki chorego konieczne jest dysponowanie DNA rodziców obu kobiet i chorego chłopca. Niepotrzebne jest DNA obu mężów zainteresowanych kobiet. Istnieją przypadki całkowitej pewności dziedzi-



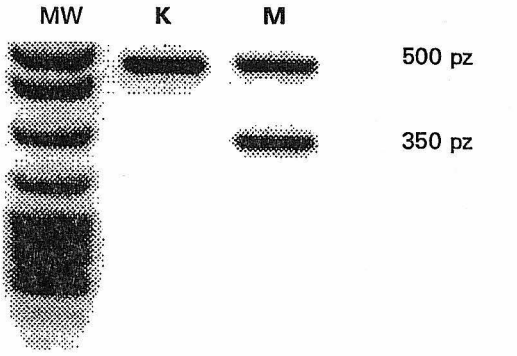
Rysunek 4. Przykładowa analiza dziedziczenia alleli genu dystrofiny w rodzinie dotkniętej DMD

czenia wykrytej w rodzinie delecji (nieprzekazywanie córce przez matkę posiadanego miejsca restrykcyjnego, tj. przekazywanie delecji) lub pewnego wykluczenia nosicielstwa (heterozygotyczność w miejscu delecji wykrytej u chorego). Schemat analizy sposobu dziedziczenia się dystrofii mięśniowej Duchenne'a w trzypokoleniowej rodzinie przedstawiono na rys. 4.

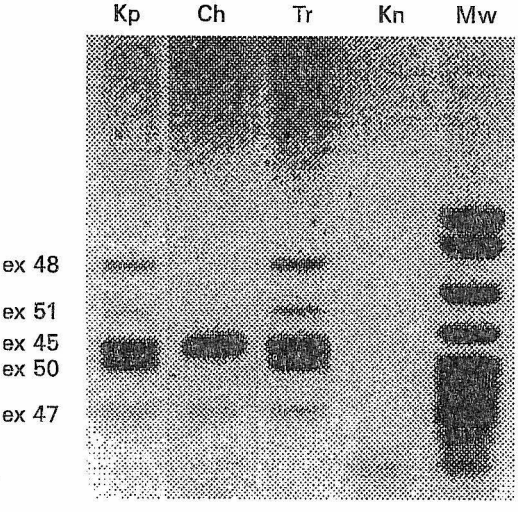
Wystąpienie pojedynczego przypadku DMD/BMD w rodzinie nie oznacza jego izolowanego pojawienia się, gdyż jedynie 1/3 wszystkich zachorowań to przypadki wywołane nowopowstałą mutacją, a wiele kobiet nosicielek nie rodzi następnego chorego syna i przekazuje mutację córce. W przypadku posiadania przez kobietę jednego chorego syna i co najmniej jednego zdrowego, gdy obaj dziedziczą ten sam allel (scharakteryzowany miejscami restrykcyjnymi i sekwencjami mikrosatelitarnymi) można uważać, że mutacja wywołująca chorobę zaszła jedynie u chorego chłopca i kobieta nie jest nosicielką. Istnieje jednak niewielka grupa kobiet, które somatycznie nie są nosicielkami, lecz w linii komórek rozrodczych posiadają klon niosący mutację. Stwierdzenie przypadku mozaicyzmu germinalnego ma miejsce niestety jedynie w przypadku urodzenia kolejnego chorego syna wbrew przewidywaniom opartym na analizie DNA. Wykluczenie nosicielstwa zmutowanego allelu u matki jednego chorego chłopca nożе być obarczone wspomnianym błędem. Badaniem uzupełniającym, nie dającym pewności, jest oznaczenie poziomu aktywności kinazy kreatyny (CK) w krwi pacjentki. U większości kobiet nosicielek mutacji obserwuje się podwyższony poziom tego enzymu.

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Analiza DNA służy również diagnostyce prenatalnej. Zastosowanie reakcji PCR umożliwia w przeciągu kilku godzin ustalenie płci płodu. Stosuje się w tym celu amplifikację fragmentu genu amelogeniny znajdującego się w chromosomie X, którego defektywna kopia obecna jest w chromosomie Y. Namnożone fragmenty pochodzące z prawidłowej (chr. X) i defektywnej (chr. Y) kopii genu są odpowiednio wielkości 500 pz i 350 pz. Obecność obu produktów wskazuje płeć męską i jest sygnałem do dalszych badań (rys. 5). Poszukuje się wtedy w DNA płodu wykrytej wcześniej delecji w genie dystrofiny (rys. 6), jej stwierdzenie



Rysunek 5. Obraz elektroforezy produktów amplifikacji fragmentów genu amelogeniny



Rysunek 6. Obraz elektroforezy produktów PCR fragmentu genu dystrofiny z obszaru delecji. Analiza wykonana z użyciem DNA zdrowego mężczyzny (Kp, kontrola pozytywna), chorego członka rodziny (Ch), płodu (Tr) i bez DNA (Kn, kontrola negatywna)

oznacza prenatalną diagnozę DMD/BMD. Ponieważ w około 40% przypadków w genie dystrofiny nie wykrywa się delecji, pozostaje technika analizy dziedziczenia się miejsc restrykcyjnych (RFLP) lub wysokozmiennych sekwencji mikrosatelitarnych służąca ustaleniu, który z dwóch matczynych alleli odziedziczył płód. Tak jak w przypadku wykrycia delecji, stwierdzenie odziedziczenia tego samego allelu przez chorego chłopca i płód oznacza przedurodzeniowe rozpoznanie DMD/BMD. Zarówno poszukiwanie delecji, jak i analiza RFLP są czasochłonne. Wskazane jest wcześniejsze zgłaszanie się rodzin w celu wykonania molekularnej weryfikacji diagnozy klinicznej, ustalenia ewentualnych nosicielek i przygotowania się do diagnozy prenatalnej.

PIŚMIENNICTWO

1. Hausmanowa-Petrusewicz I.: Choroby mięśni. Wyd. III zm. Wyd. Nauk. PWN, 1993.
2. D'Souza V.N., thi Man N., Morris G.E., Karges W., Pillers D.M., Ray P.N.: A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. Hum. Mol. Genet. 1995, 4, 837–842.
3. Suzuki A., Yoshida M., Hayashi K., Mizuno Y., Hagiwara Y., Ozawa E.: Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Eur. J. Biochem. 1994, 220, 283–292.
4. Monaco A.P., Bertelson C.J., Liechti-Gallati S., Moser H., Kunkel L.M.: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. Genomics 1988, 2, 90–95.
5. Campbell K.P.: Three muscular dystrophies. Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. Cell 1995, 80, 675–679.

Adres: Dr Janusz Zimowski, Zakład Genetyki IPiN, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa