

Témavezető neve: Dr.KarcagiVeronika

A téma cím: Izomdystrophiák differenciál-diagnosztikai vizsgálata molekuláris genetikai, valamint immunhisztokémiai és immunoblot analízisek segítségével

A kutatás időtartama: 2002-2005

### **Vizsgálataink célja:**

A munkacsoport célkitűzése a különböző típusú izomdystrophiában szenvedő betegek differenciál-diagnosztikai vizsgálata, a pontos diagnózis megállapítása molekuláris DNS és fehérjeanalízisekkel. A mutációs analíziseket a Duchenne/Becker izomdystrophiában (**DMD/BMD**), valamint a facioscapulohumerális izomdystrophiában (**FSHD**) diagnosztizálásában kívánjuk bevezetni, amely célokat a pályázat első két évében terveztük megvalósítani. A végtagövi izomdystrophiák (**LGMD**), továbbá a DMD/BMD esetében a különböző izomfehérjék kimutatására alkalmas immunhisztokémiai és western-blot analízisekkel lehetővé válik a betegek pontos diagnosztizálása nemzetközi standardoknak megfelelően. A protein szintű vizsgálatokat a pályázat a 2004.-2005. évben kívánja megvalósítani. A molekuláris vizsgálatok előfeltétele a betegek megelőző klinikai kivizsgálása elektrofiziológiai paraméterek alapján. A genetikai diagnózis birtokában az érintett családok megfelelő genetikai tanácsadása, a lehetőség szerint prenatális vizsgálatok elvégzése szintén klinikus kollégákkal történő szoros együttműködésen alapul.

### **Elért eredményeink:**

Az osztályunkra beérkező, a klinikusok által **Duchenne/Becker izomdystrophia (DMD/BMD)** betegséggel diagnosztizált betegek vérének limfocita frakciójából izoláljuk a DNS-t Wizard Genomic DNA Purification kittel (Promega). Az izolált DNS mintából első lépésként a dystrophin gén multiplex PCR reakciós analízisét végezzük el (Beggs és Chamberlain, 1989). A reakció során szimultán génamplifikációt végzünk, amelyben az izomspecifikus promoter, valamint 17 exon vizsgálatára van lehetőség. Ez a deléciós forrópontok mintegy 95%-át fogja át. A módszer beállítása óta (2001) összesen 120, a klinikusok által DMD/BMD betegséggel diagnosztizált fiú, ill. fiatal férfi betegben végeztük el a multiplex PCR reakciót és 72 (60%) esetben sikerült a dystrophin gén mutációját és ezzel a betegséget igazolni. Két esetben küldtek a neurológusok DMD gyanúval leányokat, akikben „manifesztálódó hordozó” diagnózist feltételeztek. Kvantitatív analízis hiányában nem tudtunk a vizsgált hot-spot régiókban deléciót kimutatni, így a feltételezett diagnózist ezzel a módszerrel nem tudtuk megerősíteni ill. elvetni. Prenatális vizsgálatra a négy év alatt 13 esetben kaptunk megkeresést; két esetben betegnek bizonyult a magzat, míg 11 esetében nem tudtunk kimutatni deléciót. A vizsgálat elvégzése után derült ki, hogy 4 esetben a magzat leánynak bizonyult, míg 7 esetben nem kaptunk információt a magzat nemére.

A pályázat első évében a DMD/BMD genetikai diagnosztizálásának korszerűsítése során a cDNS próbákkal történő kvantitatív Southern blot analízist vezettük be. Ezzel lehetővé vált a betegek deléciós spektrumának pontosabb

feltérképezése, amely lehetőséget ad az enyhébb vagy súlyosabb fenotípus elkülönítésére, valamint a hordozóság szűrésére. A hordozók kimutatása kópiaszám meghatározáson alapszik. A beteg személy dystrophin génjében deletált exonok megfelelője a rokon női hordozókban csökkent radioaktív intenzitással jelenik meg a többi exonhoz képest az autoradiogrammon. Az intenzitás különbségeket Instantimager (Packard) elektronikus autoradiograf készülékkel is megmértük, a számított intenzitás értékek jól korreláltak a filmen látható dózis értékekkel. Eddig összesen 89 női hozzátartozó esetében végezhetjük el a hordozósági analízist, 27 esetben igazoltuk a hordozósági státuszt. Ezekben az esetekben mindenképpen kötelező a következő terhesség esetén a prenatális vizsgálat felajánlása, hiszen az ismétlődési kockázat fiúmagzat esetén 50%. További 33 esetben ki tudtuk zárni a beteg anyjának vagy női rokonainak mutáció hordozóságát. Az anya esetében azonban mégsem mondható ki biztosan a de novo mutáció ténye, hiszen a dystrophin gén mutációk esetében mintegy 6% a germinális/szomatikus mozaikosság valószínűsége. Így a negatív eredmény ellenére is kötelező felajánlani a magzati vizsgálatot; ellenben a leánytestvérek ilyen esetekben mentesülnek az ismétlődési kockázat alól. További 29 női rokon vizsgálata még folyamatban van. A cDNS analízissel a deléciók méretére is pontosabb felvilágosítást kaphatunk, így a betegeket a női családtagok mellett szintén tovább vizsgáltuk. A 26 vizsgált betegből 9 esetben további deléciókra derült fény, így pontosítani tudtuk a deléciók kiterjedését.

A pályázat utolsó évében sor került egy újabb korszerű módszer bevezetésére, amely a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technikán (J.P. Schouten, 2002) alapszik. Az MLPA technika során egy specifikus ligálási lépést követően alkalmazunk PCR reakciót, a használt próbák mindegyikére egyaránt specifikus primerpárral. A PCR reakcióval az egyes exonokra specifikus, különböző méretű próbákat szaporítjuk fel. A keletkezett termékek ezután elektroforézissel választhatók el méret szerint; megfelelő fluoreszcens jelölést alkalmazva pedig mennyiségileg is detektálhatóak ABI-prism készülékkel. Az MLPA technika segítségével kvantitatív módon vizsgálható a dystrophin gén összes, azaz 79 exonja, így ritka deléciók is kimutathatóvá válnak. A mennyiségi analízis lehetővé teszi az esetek 5%-ában előforduló exon duplikációk -más módszerrel nem lehetséges- kimutatását, valamint a női családtagok hordozóságának hatékonyabb szűrését is.

Az újonnan bevezetett módszer segítségével eddig 36 női hozzátartozónál végeztük el a fluoreszcens MLPA analízist hordozóság szűrés céljából és a hordozósági státuszt 15 esetben igazoltuk. Az új MLPA módszerrel 16, a multiplex PCR technikával korábban már vizsgált beteg analízisét végeztük el és 11 betegben mutattunk ki exon deléciókat, ezek közül négy esetben az új módszerrel pontosítani tudtuk a deléciók kiterjedését a dystrophin génben. Egy betegben, aki negatívnak bizonyult a multiplex PCR analízissel, ritka exon deléciókra derült fény az MLPA analízis segítségével, amely hozzájárult ahhoz, hogy a beteg pontos genetikai diagnózist kapjon.

Két gyermek esetében a teljes dystrophin gén hiányát sikerült igazolnunk mind a multiplex PCR reakcióval, mind pedig az MLPA analízissel. Ezek a gyermekek rendkívül súlyos fenotípust mutattak, az izomdystrophia tüneteivel mentális retardáció ill. glycerolkináz deficiencia is társult. További molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a dystrophin gén teljes deléciója mellett a szomszédos gének is hiányoztak, így a GK (glycerol-kinase) gene (exon 19), NROB1 (Dax1) gene (Nuclear receptor subfamily O group B), valamint az IL1RAPL1 gene (Interleukin-1-receptor accessory protein-like1).

Ez a „continuous gene syndrome” jelenségre utalt és magyarázatot adott a társuló tünetekre. A deléciós töréspont meghatározására felvettük a kapcsolatot külföldi laboratóriummal, amely chip technikát fog alkalmazni. Mindkét beteg esetében az édesanyáknál sikerült igazolnunk a hordozósági státuszt; a teljes dystrophin gén csak egy-egy kópiában volt jelen. Ezekben az esetekben a súlyos kórkép ismétlődésének kockázata fiú magzatok esetében 50% minden következő terhességben, amelyre prenatalis vizsgálat felajánlásával hívtuk fel a figyelmet.

További tudományos érdekességként sikerült azonosítanunk a DMD tüneteket mutató két leánygyermek dystrophin génjében bizonyos exonok egy kópiában való jelenlétét. Ily módon igazolni tudtuk a klinikusok gyanúját és a két leány a rendkívül ritka, ún. manifesztálódó hordozó besorolásba került. A jelenségért feltehetőleg a nem-random X kromoszóma inaktiváció felelős, amelynek vizsgálata további célkitűzésünkben szerepel. A manifesztálódó hordozók azonosítása kizárólag csak a kvantitatív MLPA módszerrel volt lehetséges. A következőkben még három, hasonló klinikai gyanúval hozzánk beküldött leány vizsgálatát végezzük el.

Az MLPA módszerrel vizsgált összesített eredményeink külföldi folyóiratban történő publikációja folyamatban van. Ugyancsak közlésre készítjük elő a két, teljes dystrophin gén deléciót mutató gyermek genetikai analízisét, a klinikum teljes leírásával együtt.

**A végtagövi izomdystrophiák (LGMD)** heterogén, progresszív izomdystrophiával járó betegségcsoport, amely néhány fontos szempontban eltér a DMD/BMD betegségtől, így a tünetek megjelenésének idejében, a lassúbb progresszióban, valamint, hogy a betegség nőkben is előfordulhat. A kissé enyhébb lefolyású autoszómális domináns öröklődésű formák háttérben eddig 4 gén és 2 génlókusz defektusa igazolódott (LGMD1A-F), az autoszómális recesszív öröklődésű formáknak a háttérben pedig ez idáig 10 különböző gén defektusát írták le (LGMD2A-J), melyek igen változatos súlyosságú klinikai tünetekkel járnak. E betegségcsoport háttérben az izomrost dystrophin-asszociált glycoprotein komplex valamely strukturális fehérje tagjának defektusa áll, így megszakad a sarcolemma és az extracelluláris matrix közötti összeköttetés, izomrost degenerációt vonva maga után. A recesszív formák háttérben leggyakrabban a calpain3 és a dysferlin proteinek defektusa áll, s újabb eredmények arra utalnak, hogy legalább is a közép- és nyugat-európai populációban az FKRP (fukutin related protein, egy feltételezett glycosyltransferase) protein defektusa szintén nagy gyakorisággal fordul elő. A klinikailag limb-girdle eloszlású izomdystrophiák kb. 30-40%-ában azonban még az eddig leírt összes protein vizsgálata során sem található meg a kórokozó géndefektus. Az ilyen esetek további kutatása várhatóan újabb fehérjék szerepét fogja igazolni. A congenitalis izomdystrophiák csoportja (CMD) klinikailag és genetikailag is újabb heterogén csoportot alkot, amelyben elsősorban a merosin fehérje hiánya, valamint az  $\alpha$ -dystroglycan glikozilációjában résztvevő enzimek defektusai szerepelnek. Az említett izomdystrophiák differenciál-diagnosztikája a hasonló klinikai tünetek és a genetikai heterogenitás miatt először mindig a kóros fehérjék immunhisztokémiai-, valamint Western blottal történő azonosításán alapszik, amelyet azután a kódoló gén mutáció analízise követhet.

Osztályunkra eddig összesen, 122, végtagövi izomdystrophia (LGMD), nem-specifikus myopathia, valamint CMD betegség tüneteivel érintett személy izom- ill. vérmintája érkezett feldolgozásra. A morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok az OPNI Neurobiopsziás Központjában, valamint külföldi együttműködés keretében a müncheni LMU Egyetem Friedrich-Bauer-Institut Neurológiai Klinikáján készültek, prof. H. Lochmüller közreműködésével. A western blot analíziseket részben az OKK-OKI Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztályán, részben pedig a müncheni intézet segítségével végeztük el. Az eddig elvégzett vizsgálatok alapján a különböző izomdystrophia ill myopathia gyanúval diagnosztizált betegek közül 38 esetben detektáltuk valamely cytoskeletális izomfehérje hiányát vagy csökkenését, míg a kiegészítő western blot analízis 14 esetben azonosította a kóros fehérje molekulát. További 18 esetben nem találtunk kóros eltérést az immunhisztokémiai analízis alapján.

Az immunhisztokémia módszerrel, valamint western blot analízissel azonosított fehérjedefektusok egy részét DNS szinten is kimutattuk a fehérjét kódoló gén patogén mutációjának azonosításával; eddig összesen 14 beteg esetében találtuk meg a genetikai defektust. Ezeket a mutációkat az általunk kiküldött DNS mintákban német molekuláris genetikai laboratóriumok azonosították DNS szekvenálás segítségével: A calpain-3 fehérjét kódoló CAPN3 génben Arg355Trp/550delA compound heterozigóta mutációt – LGMD2A betegséget okozva (4 fő); a lamin A/C LMNA génben homozigóta R453W mutációt – AD Emery-Dreifuss izomdystrophiát okozva (1 fő); az FKRP génben homozigóta W231C mutációt – LGMD2I vagy MD1C1 típusú CMD betegséget okozva (1 fő); valamint szintén az FKRP génben compound heterozigóta formában egy gyakori 826C>A (Leu276Ile), valamint egy eddig még ismeretlen 1475delC (Tyr492ArgfsX28) mutációt, LGMD2I betegséget okozva (1 fő, valamint 3 fő hordozó családtag). A desmin kódoló génben a desminopathiát okozó R406W mutációt (1 fő), az aktint kódoló génben pedig egy stop kodon mutációt TAG>TAT (1 fő) mutattunk ki, amely nemalin myopathiát okozott. További két betegben a  $\gamma$ -sarcoglycan génben C283Y, a roma populációra jellemző alapító mutációt azonosítottunk, amely LGMD2C típust okozott.

Az újonnan leírt mutációk nemzetközi folyóiratban történő publikációjára előkészítés alatt áll.

**A facioscapulohumeralis izomdystrophia (FSHD)** a harmadik leggyakrabban előforduló izomdystrophia, autoszómális dominánsan öröklődő progresszív betegség. Az FSHD pathomechanizmusában szerepet játszó gént még nem azonosították. A betegség kialakulásáért a 4q35 kromoszómális régióban elhelyezkedő, 3,3 kb nagyságú, ún. D4Z4 szekvenciák számának csökkenése felelős. Molekuláris diagnosztika során Southern blot analízissel a 4q35 kromoszómális régióból eredő *EcoRI* fragment méretét vizsgáljuk. A patogén fragmentek  $\leq 38$  kb méretűek. A diagnosztikai munkát nehezíti, hogy a hibridizáláshoz használt p13E-11 próba nemcsak a 4q35-ös régiót jelöli, hanem a homológ 10q26 régiót is és az ott detektálható DNS fragmentek mérete átfed a 4q35 régióból származó fragmentek méretével. Betegséget csak a 4q35 régióban elhelyezkedő 38 kb-nál kisebb fragmentek okoznak. A 4q35 eredetű D4Z4 szekvenciák restriktív polimorfizmus alapján (*BlnI* hasítási helyek) megkülönböztethetők a 10q26 eredetű D4Z4 szekvenciáktól. A molekuláris DNS diagnosztikát tovább nehezíti hogy a fent említett homológ lokuszok között rekombinációs és transzlokációs események történhetnek. Ezen események detektálása pulsed field gélelektroforézissel vagy az úgynevezett dózis teszt

alkalmazásával történik, amikor a 4q35-ös és a 10q26-os régióból származó D4Z4 szekvenciák arányát állapítjuk meg normál gélelektroforézis után.

Laboratóriumunk 2002. óta végez molekuláris DNS diagnosztikai vizsgálatot FSHD betegségben Southern-blot analízissel, a p13E-11 próba felhasználásával. 2002. és 2005. között összesen 54 családból 142 egyén vizsgálatát végeztük el. A beérkezett minták 90 betegtől és 46 tünetmentes hozzátartozótól származtak. Vizsgálataink alapján 54 esetben erősítettük meg az FSHD diagnózisát a betegek mintáiból, így a családok részére pontos genetikai tanácsot tudtunk biztosítani. A tünetmentes hozzátartozók mintáiban egy mozaikos és egy pozitív esetet detektáltunk. A 2003. és 2006-ig terjedő időszakban 6 prenatális vizsgálatot végeztünk a korábban már molekuláris vizsgálattal megerősített FSHD családokban. Két esetben a magzat örökölte a patogén méretű fragmentet, míg négy esetben nem. A kóros terhességeket a szülők kérésére megszakították.

Minden beérkezett mintában meghatároztuk a 4-es illetve 10-es kromoszómális eredetű D4Z4 szekvenciák arányát és meghatároztuk a 4-es és 10-es kromoszóma homológ régiói között előforduló transzlokációs gyakoriságot. Az általunk mért transzlokációs gyakoriság nem tért el az irodalomban közölt, európai populációra jellemző, FSHD betegekben és egészséges egyéneknél azonos transzlokációs gyakoriságtól. A vizsgált DNS minták 13%-ában találtunk 4-es kromoszómáról transzlokációt a 10-es kromoszómára, 7%-ában találtunk transzlokációt 10-es kromoszómáról a 4-esre míg a minták 35%-ában egynél több transzlokációs eseményt detektáltunk. A minták 77%-ában nem detektáltunk transzlokációs eseményt.

Az öröklődő betegségek kialakulásában egyre gyakrabban epigenetikus tényezők szerepére derül fény, amelyek emlősökben fontos szerepet játszanak a fejlődésben, a sejtdifferenciációban és a sejt szaporodásban. Az epigenetikus változások kulcsfontosságú eleme a DNS metilációja, amelynek normál állapottól eltérő mintázata transzkripció deregulálódást okoz. Az FSHD kialakulásában, a legújabb irodalmi adatok szerint, epigenetikus tényezők is szerepet játszhatnak. A betegség pathomechanizmusában a D4Z4 szekvenciáktól proximálisan elhelyezkedő gének megváltozott transzkripciójának van szerepe. Kimutatták, hogy FSHD betegek mintáiban a 4q35-ös régióhoz legproximálisabban elhelyezkedő FRG1, FRG2 (FSHD régió génje 1 és 2) és ANT1 (adenine nucleotid transzlokáz 1 típus) génekről nagyobb mennyiségű RNS detektálható mint egészséges egyének mintáiban. Ezt alátámasztja az a kísérletsorozat, amelyben a normál állapotnál nagyobb mennyiségű Frg1 RNS-t termelő egérben több Frg1 fehérjetermék detektálódik és ez az FSHD klinikai tüneteinek megjelenéséhez vezet (Gabellini et al, Nature. 2006;439:973-7). Így az Frg1 fehérjét túltermelő egér a betegség állatmodelljeként szerepel. Humán minták vizsgálata során megállapították, hogy transzkripció deregulációját a D4Z4 szekvenciák metilációs állapotának megváltozása, hipometilációja okozza. Az FSHD betegség esetében a p13E-11 próba kötőhelyének közelében található D4Z4 szekvencia metilációs állapota *Bsa*I és *Fse*I metiláció érzékeny endonukleázok segítségével vizsgálható. A restrikciós emésztés után Southern-blot analízist végzünk radioaktívan jelölt p13E-11 próbával. Így három különböző méretű fragmentet detektálunk; a metilált 4q35 fragmentet és a hipometilált (*Bsa*I és *Fse*I által kihalászott) két fragmentet. Elektronikus autoradiográffal összehasonlítjuk a három különböző fragment intenzitását. Az FSHD betegek DNS mintáiban hipometiláltak a D4Z4 szekvenciák a kontroll egyének-, illetve más izomdisztrófiában szenvedő betegek

mintáihoz hasonlítva. A fentiekben ismertetett módszerrel, kutatási célból megvizsgáltuk a laboratóriumunkba beérkezett mintákban a D4Z4 szekvenciák metilációs állapotát. Eddig összesen 15 FSHD beteg, 10 egyéb izomdystrophiában szenvedő egyén és 10 egészséges hozzátartozó esetében végeztük el a metilációs vizsgálatot. Eredményeink az irodalmi adatokkal egyezően azt mutatják, hogy a vizsgált DNS szakasz az FSHD egyének mintáiban hipometilált a másik két csoport mintáival összehasonlítva.

Ezeknek az új eredményeknek a közlését nemzetközi folyóiratban tervezzük, miután az összes FSHD pozitívnak azonosított beteg D4Z4 metilációs mintázatát a megfelelő kontroll mintákkal összehasonlítva analizáltuk.

A hazánkban általunk bevezetett és eddig végzett munka folytatásaként szeretnénk továbbfejleszteni a molekuláris diagnosztikai tevékenységet a pulsed field gélelektroforézis módszerének bevezetésével. Az új módszer lehetőséget nyújt a transzlokációs események, különös tekintettel a kevert 4q35 és 10q26 D4Z4 repeatek kimutatására. Ennek megvalósítása érdekében a pályázat egyik résztvevője 2006. évben továbbképzésen vesz részt a hollandiai Univ. of Leiden, Clinical Medical Center FSHD munkacsoportjánál.

A pályázat eredményeit **összefoglalva** elmondható, hogy mindhárom betegcsoportban jelentős eredményeket értünk el az eddig nem azonosított izomdystrophiában szenvedő betegek kivizsgálásában, a pontos genetikai diagnózis kialakításában. Számos új mutációra, (LGMD betegségekben), ritka genetikai eseményre (DMD betegségekben), valamint transzlokációs eseményre ill. az epigenetikus tényezők szerepére derült fény (FSHD betegségekben), amelyek segítséget nyújtanak a regulációs folyamatok megértéséhez, a geno-és fenotípus korrelációk felállításához, ill. a pathomechanizmus tisztázásához. A tudományos eredményeken túl nem elhanyagolható szempont, hogy a tisztázott genetikai betegség esetében az érintett család számára pontos ismétlődési kockázat és ilymódon genetikai tanács adható. Kiemelkedő eredménynek tartjuk, hogy számos DMD/BMD, valamint FSHD betegségekben szenvedő család részére biztosítottunk prenatális diagnosztikai vizsgálatot a pályázati támogatás segítségével, megteremtve ezzel a szekunder prevenció lehetőségét.

Mivel a projekt során a legjelentősebb eredmények nagy része az utolsó évben született, az eredmények további közlését az elkövetkező két éven belül tervezzük. Kérjük ezért, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, a jövőben megjelent közlemények figyelembevételével.