

Małgorzata W. Dorobek

**ANALIZA
HETEROGENNOŚCI GENETYCZNEJ I KLINICZNEJ
DYSTROFII TYPU OBRĘCZOWO - KOŃCZYNOWEGO.**

Praca na stopień doktora nauk medycznych wykonana w
Instytucie Centrum Medycyny Doświadczalnej i
Klinicznej Polskiej Akademii Nauk.

Promotor:

Prof. dr hab. med. Irena Hausmanowa - Petrusiewicz



25 194 (dublet)
H3070

Warszawa 1998 rok

Pani Profesor Irenie Hausmanowej - Petruszewicz, Promotorowi pracy dziękuję za pomoc w wyborze tematu, wszechstronną pomoc w opracowaniu pracy, opiekę naukową i okazaną życzliwość.

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy, a w szczególności Pani Profesor Annie Fidziańskiej - Dolot i Pani Profesor Irenie Niebrój - Dobosz oraz kolegom z Zakładu Genetyki, Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Spis treści.....str.

Skróty używane w tekście.....

1. Wstęp.....1

Niejednorodność kliniczna i genetyczna dystrofii obręczowo - kończynowej.....1

Dystrofie obręczowo - kończynowe o dziedziczeniu autosomalnie
recesywnym.....6

Charakterystyka typu LGMD2A, LGMD2B, LGMD2G.....8

Glikoproteinowy kompleks dystrofiny i dystrofie mięśniowe z deficytem
komponentów kompleksu dystrofiny LGMD2C, 2D, 2E, 2F.....18

Korelacje kliniczno - genetyczne dystrofii obręczowo - kończynowej o
dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.....28

Dystrofie obręczowo - kończynowe o dziedziczeniu autosomalnie
dominującym.....30

Diagnostyka różnicowa dystrofii obręczowo - kończynowej, w oparciu o
molekularne badania genetyczne.....32

2. Cel pracy.....37

3. Materiał.....39

4. Metody.....41

4.1 Metody laboratoryjne zastosowane w pracy.....41

4.2 Wstęp do metod.....42

4.3 Opis poszczególnych metod zastosowanych w pracy.....44

4.31 Analiza haplotypów.....45

4.32 Analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA,
metoda heterodupleksów.....49

4.33 Sekwencjonowanie DNA.....53

4.34 Hybrydyzacja Southerna.....57

4.35 Klonowanie fragmentów DNA.....63

5. Wyniki	64
5.1 Wyniki kontrolnych badań klinicznych pacjentów i ich rodzin	64
5.2 Ujednoczenie grupy rodzin z rozpoznaniem LGMD	66
5.21 Wyłączenie dystrofinopatii	66
5.22 Wyłączenie przypadków FSHD	81
5.3 Rezultaty analizy DNA w ujednoczonej grupie pacjentów z LGMD	84
5.31 Wykazanie heterogenności locus LGMD w badanej grupie pacjentów na podstawie analizy haplotypów	85
5.32 Wyniki analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA, analizy heterodupleksów	102
5.33 Wyniki sekwencjonowania	116
5.34 Podsumowanie wyników analizy DNA w grupie pacjentów z prawdopodobnym typem 2A	122
5.4 Charakterystyka kliniczna grupy pacjentów z typem LGMD2A	124
6. Dyskusja	132
7. Podsumowanie	153
8. Piśmiennictwo	154
9. Streszczenie	168
10. Załączniki	173
11. Spis tabel i rycin	181

Skróty używane w tekście

Skróty używane w tekście:

- AD** - autosomalnie dominujący sposób dziedziczenia.
AMPs - nadsiarczan amonowy (ang: amonium persulphate).
AR - autosomalnie recesywny sposób dziedziczenia.
AT - temperatura asocjacji starterów.
bp - para zasad (ang: base pair).
BSA - albumina osocza krwi bydlęcej (ang: bovine serum albumine).
CANP3 - aktywowana wapniem neutralna proteaza 3, kalpaina 3 (ang: calcium - activated neutral protease 3) - synonimy - p94, nCL - 1.
CK - kinaza kreatyny (ang: creatine kinase).
cM - centymorgan (ang: centiMorgan).
CMD - dystrofia mięśniowa wrodzona (ang: congenital muscular dystrophy).
DAP - ang. dystrophin associated proteins; białka związane z dystrofiną.
DAG - glikoproteiny związane z dystrofiną (ang: dystrophin associated glycoprotein).
DGC - glikoproteinowy kompleks dystrofiny (ang: dystrophin glycoprotein complex).
DLMD - ang. Duchenne - like muscular dystrophy.
DMB - dystrofia mięśniowa Becker'a.
DMD - dystrofia mięśniowa Duchenne'a.
DMSO - dwumetylosulfotlenek (ang: dimethyl sulphoxide).
ECM - zewnątrzkomórkowa matryks (ang: extracellular matrix).
EDTA - wersenian dwusodowy.
EMG - badanie elektromiograficzne.
FSHD - dystrofia twarzowo - łopatkowo - ramieniowa (ang: Facioscapulohumeral muscular dystrophy).
HET - analiza heterodupleksów (ang: heteroduplex analysis).
II - iloraz inteligencji.
kb - tysiąc par zasad (ang: kilobase).
kD - kilodalton.
LGMD - dystrofia obręczowo - kończynowa (ang: Limb - girdle muscular dystrophy).
locus - miejsce.
Mb - milion par zasad (ang: megabase).
MDE - ang. mutation detection enhancement.
MM - miopatia Miyoshi (ang: Miyoshi myopathy).
PA - sekwencja sygnału poliadenylacji.
PIC - zawartość polimorficznej informacji (ang: polymorphic information content).
PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang: polymerase chain reaction).
PVP - poliwinylpyrrolidon.
RFLP - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang: restriction fragment length polymorphism).
SCARMD - ciężka dziecięca autosomalnie recesywnie dziedzicząca się dystrofia mięśniowa (ang: severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy).
s.d. - sterylna, destylowana.
s.k. - stężenie końcowe.

SSCP - analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (ang: single stranded conformational polymorphism).

STRs - krótkie tandemowe powtórzenia (ang: short tandem repeats).

λ - **Hind III** - DNA faga λ trawione enzymem restrykcyjnym Hind III.

Wstęp

Niejednorodność kliniczna i genetyczna dystrofii obręczowo - kończynowej.

Dystrofia obręczowo - kończynowa (limb girdle muscular dystrophy-LGMD) została po raz pierwszy zdefiniowana przez Waltona i Natrassa [Walton i Natrass 1954]. Terminem tym określano przypadki dystrofii głównie o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym, w których objawy postępującego osłabienia mięśni ksoonych (bez zajęcia mięśni twarzy) pojawiały się w drugiej lub trzeciej dekadzie życia i prowadziły do unieruchomienia chorego po upływie około 20 lat. Grupa ta, jest niejednorodna pod względem genetycznym jak i klinicznym, posiada jednak pewne wspólne cechy. Są to, podobne objawy kliniczne:

- osłabienie i zanik początkowo dotyczy mięśni ksoonych obręczy biodrowej, następnie lub równocześnie, obręczy barkowej. Zanik i osłabienie mięśni mogą być niesymetryczne.
- pogłębienie lordozy lędźwiowej,
- zniesienie odruchów przede wszystkim kolanowych,
- przykurcz ścięgien Achillesa; przykurcze w innych stawach oraz skrzywienie kręgosłupa pojawiają się najczęściej po unieruchomieniu chorego,
- prawidłowy rozwój umysłowy chorych.

Niejednorodność kliniczna wyraża się: różnym wiekiem występowania pierwszych objawów osłabienia mięśni oraz różnym przebiegiem procesu chorobowego, który może być względnie łagodny lub szybki i złośliwy. Kardiomiopatia może należeć do obrazu chorobowego, ale jest rzadka [van der Kooi i wsp. 1997, Fang i wsp. 1997, Ng i Lau 1997].

Dystrofia obręczowo - kończynowa została po raz pierwszy wyodrębniona w klasyfikacji Stevensona oraz Waltona i Natrassa [Stevenson 1953, Walton i Natrass 1954]. Już wtedy autorzy podkreślali prawdopodobną niejednorodność tej grupy miopatii. Początkowo LGMD dzielono na podstawie objawów klinicznych, wyróżniając postaci o przebiegu szybkim lub łagodnym, różnym wieku występowania pierwszych objawów. Analiza rodowodów umożliwiła wyłonienie przypadków o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym, obok rzadkich postaci o dziedziczeniu autosomalnie dominującym. Liczbę przypadków sporadycznych, w materiale warszawskim oceniano na około 60% [Stroińska - Kusiowa, Jędrzejowska, Kopeć 1966], natomiast w innych populacjach, na około 52% [Mahjneh i wsp. 1996b]. Częstość występowania zespołu LGMD uprzednio oceniano na 1×10^{-4} [Emery 1991]. Dane dotyczące częstości występowania, po uwzględnieniu przypadków potwierdzonych badaniami genetycznymi, nie zostały dotychczas opublikowane.

Rozpoznanie dystrofii obręczowo - kończynowej stawiane było na podstawie obrazu klinicznego oraz następujących kryteriów:

1. badań biochemicznych: aktywności kinazy kreatynowej, aldolazy i transaminaz w surowicy,
2. badań elektromiograficznych: celem wykazania zmian o charakterze pierwotnie mięśniowym,
3. biopsji mięśniowej: stwierdzenie zmian tzw: dystroficznych,
4. analizy rodowodu i oceny sposobu dziedziczenia.

Z uwagi na to, że przypadki miopatii metabolicznych, strukturalnych i zapalnych, także mogą przebiegać jako zespół obręczowo - kończynowy, wykonanie biopsji mięśniowej jest nieodzowne dla rozpoznania dystrofii obręczowo - kończynowej, [Bushby 1995].

Po identyfikacji genu dystrofiny i jego produktu [Hoffman, Brown i Kunkel 1987], z grupy LGMD zaczęły być eliminowane przypadki, należące do zupełnie innej grupy dystrofii, sprzężonej z chromosomem X. Obraz kliniczny w dystrofii obręczowo - kończynowej i w dystrofii mięśniowej Beckera/Duchenne'a (DMB/DMD) jest często podobny [Beyenburg i wsp. 1994, Ben Jelloun - Dellagi i wsp. 1990]. Wobec tego, sporadyczne przypadki DMB/DMD były czasem błędnie rozpoznawane jako LGMD [Arikawa i wsp. 1991, Norman, Coakley, Thomas, Harper 1989]. Dotyczy to także kobiet z zespołem obręczowo - kończynowym, które mogą być objawowymi nosicielkami dystrofii mięśniowej Duchenne'a [Bonilla i wsp. 1988, Hoffman i wsp. 1992, Minetti i wsp. 1991]. Dlatego ważnym elementem procedury diagnostycznej w LGMD, stało się wyłączenie mutacji genu dystrofiny i ocena dystrofiny mięśniowej.

W diagnostyce różnicowej LGMD, uwzględnia się także inne schorzenia o fenotypie zespołu obręczowo - kończynowego. Analiza DNA, umożliwia dokonanie molekularnej diagnostyki różnicowej pomiędzy LGMD i dystrofią twarzowo - łopatkowo - ramieniową (facioscapulohumeral muscular dystrophy-FSHD), szczególnie w przypadkach, ze znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej [Jardine i wsp. 1994, van der Kooi i wsp. 1996].

Postęp badań genetycznych umożliwił dalszą charakterystykę dystrofii obręczowo - kończynowej i pozwolił na wyjaśnienie heterogenności tej grupy miopatii. Wyraża się ona obecnością kilku miejsc genomowych, których mutacje powodują powstanie fenotypu LGMD. Analiza sprzężeń umożliwiła zlokalizowanie co najmniej siedmiu genów dla LGMD, dziedziczącej się w sposób autosomalnie recesywny [Bashir i wsp. 1994, Beckmann i wsp. 1991, Ben Othmane i wsp. 1995, Bonnemann i wsp. 1995, Lim i wsp. 1995, Noguchi i wsp. 1995, Passos - Bueno i wsp. 1996b, Moreira i wsp. 1997], oraz przynajmniej 2 *loci* dla LGMD, dziedziczącej się w sposób autosomalnie dominujący [Speer i wsp. 1992 i 1995, van der Kooi i wsp. 1997].

Na podstawie dostępnych danych molekularnych, opracowano nowe kryteria diagnostyczne oraz dokonano klasyfikacji dystrofii obręczowo - kończynowej [Bushby i Beckmann 1995].

(Nowa klasyfikacja przedstawiona jest w tabeli 1.1).

Klasyfikacja LGMD

gen	lokalizacja chromosomalna	produkt genu
AD:		
LGMD1A	5q22.3-31.3	?
LGMD1B	1q11-21	?
AR:		
LGMD2A	15q15.1-21.1	CANP3
LGMD2B	2p13	?
LGMD2C	13q12	γ – sarkoglikan
LGMD2D	17q12-21.33	α – sarkoglikan
LGMD2E	4q12	β – sarkoglikan
LGMD2F	5q33-34	δ – sarkoglikan
LGMD2G	17q11-12	?

Tabela 1.1 Klasyfikacja dystrofii obręczowo - kończynowej.
AD-dziedziczenie autosomalnie dominujące,
AR-dziedziczenie autosomalnie recesywne,
CANP3 - kalpaina 3.

Dystrofie obręczowo - kończynowe o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.

Dystrofia obręczowo - kończynowa przestała istnieć jako samodzielna jednostka chorobowa. Jest to wynikiem badań molekularnych, na podstawie których, wyłoniono z LGMD kilka postaci, w których wykryto określone defekty genetyczne.

Pierwsze dowody heterogenności locus w LGMD:

Pierwszym dowodem na obecność więcej niż jednego locus dla LGMD, były badania Passos - Buenos i wsp. [Passos - Buenos i wsp. 1993a]. Autorzy wykazali mapowanie LGMD do chromosomu 15q w niektórych brazylijskich rodzinach, a w innych wyłączyli. Niejednorodność locus została dowiedziona ponownie w badaniach Allamand i wsp. [Allamand i wsp. 1995a]. Wyłączono mapowanie do chromosomu 15q w rodzinach grupy Amish, osiadłymi w południowej Indianie. Rodziny te, spokrewnione były z rodzinami osiadłymi w północnej Indianie, u których uprzednio wykazano sprzężenie z miejscem na chromosomie 15 [Young i wsp. 1992, Allamand i wsp. 1995a]. Jak później dowiedziono, LGMD występująca w rodzinach z południowej Indiany, została zidentyfikowana jako wariant LGMD2E, a gen kodujący jeden z komponentów glikoproteinowego kompleksu dystrofiny (dystrophin glycoprotein complex - DGC) - β - sarkoglikan, zlokalizowano na chromosomie 4q i [Lim i wsp. 1995].

Dystrofie obręczowo - kończynowe o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym dzieli się na dwie grupy: te, w których ekspresja elementów DGC jest prawidłowa (LGMD2A, LGMD2B, LGMD2G) oraz postaci, w których stwierdza

się deficyt poszczególnych komponentów DGC (LGMD2C, LGMD2D, LGMD2E, LGMD2F).

Charakterystyka typu LGMD2A, LGMD2B i LGMD2G.

LGMD2A i CANP3:

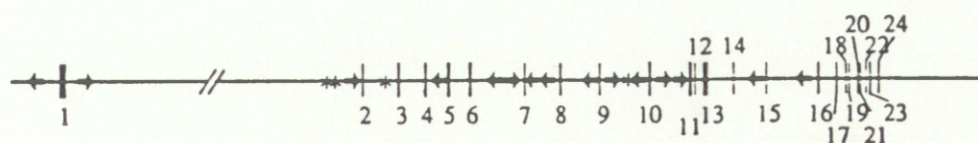
Mutacje genu kodującego aktywowaną wapniem neutralną proteazę 3 (calcium - activated neutral protease 3; CANP3), odpowiedzialne są za wariant LGMD2A. Jest to pierwszy przykład dystrofii, w której defekt genetyczny dotyczy zaburzenia funkcji enzymu, a nie białka strukturalnego.

Gen dla postaci LGMD2A, został przypisany do chromosomu 15 [Beckmann i wsp. 1991]. Badano wysoce wsobną populację, rodzin zamieszkujących wyspę La Reunion, która z powodu położenia geograficznego, uważana była za grupę genetycznie izolowaną. Wobec tego, sugerowano, że przypadki dystrofii obręczowo - kończynowej w tym regionie, prawdopodobnie pochodzą od wspólnych nosicieli, zmutowanych alleli nieznanego genu. Ze względu na genetyczną homogenność, populacja La Reunion, stanowiła szczególnie cenny obiekt badań dla analizy sprzężeń. Zastosowano metodę analizy sprzężeń, z markerami polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), co umożliwiło przypisanie genu do ramienia długiego, chromosomu 15. Mapowanie genu dla LGMD do chromosomu 15q, zostało następnie potwierdzone w badaniach populacji Amish z północnej Indiany [Young i wsp. 1992].

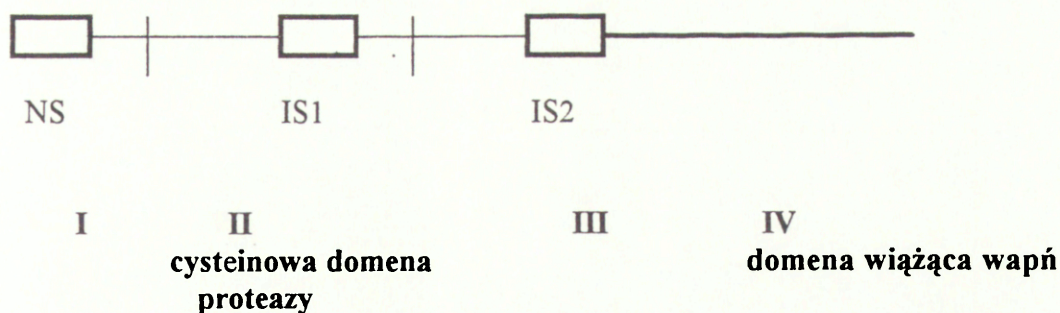
Wcześniej wykazano, że uprzednio sklonowany gen kalpainy 3 (CANP3) [Sorimachi i wsp. 1989], został przypisany do chromosomu 15 [Ohno i wsp. 1989]. Stał się on kandydatem dla LGMD, po zmapowaniu go do krytycznego regionu dla LGMD2A - 15q15.1 - q21.1 [Richard i wsp. 1994, Fougrousse i wsp. 1995, Allamand i wsp. 1995b] i po wykazaniu jego mięśniowo - swoistej ekspresji [Chiannikulchai i wsp. 1995]. W wyniku dalszych badań poznano

genomową organizację genu CANP3 i zidentyfikowano poszczególne mutacje u pacjentów z dystrofią obręczowo - kończynową, pochodzących z populacji La Reunion [Richard i wsp. 1995].

Gen kodujący aktywowaną wapniem neutralną proteazę (CANP3), ma ponad 40 kilozasad (kb). Składa się z 24 egzonów, o wielkości od 12 do 309 par zasad (bp). Rozmiary intronów wahają się pomiędzy 86 bp a 10 - 16 kb (ryc. 1.1). Trzy unikalne sekwencje: NS, IS1, IS2 i sygnał jądrowej translokacji (wewnątrz IS2) sąsiadują z intronami (ryc. 1.2). Zidentyfikowano cztery mikrosatelitarne sekwencje. Dwie z nich zlokalizowane są w pierwszym intronie i nie wykazują polimorfizmu. Trzecia mikrosatelitarna sekwencja, posiadająca tylko dwa allele, jest zlokalizowana w drugim intronie. Czwartą sekwencję mikrosatelitarną (o nieznanym polimorfizmie) stwierdzono w intronie dziewiątym. Ponadto zidentyfikowano jedną sekwencję MER2 i 14 z rodziny Alu (gęstość Alu - 1 element na 2.5 kb) [Richard i wsp. 1995].



Ryc. 1.1 Genomowa organizacja genu CANP3. Egzony zaznaczone są przez ponumerowane linie pionowe, wewnątrzgenowe sekwencje mikrosatelitarne przez gwiazdki. Strzałki wskazują orientację sekwencji Alu i MER2 (Richard i wsp. 1995)

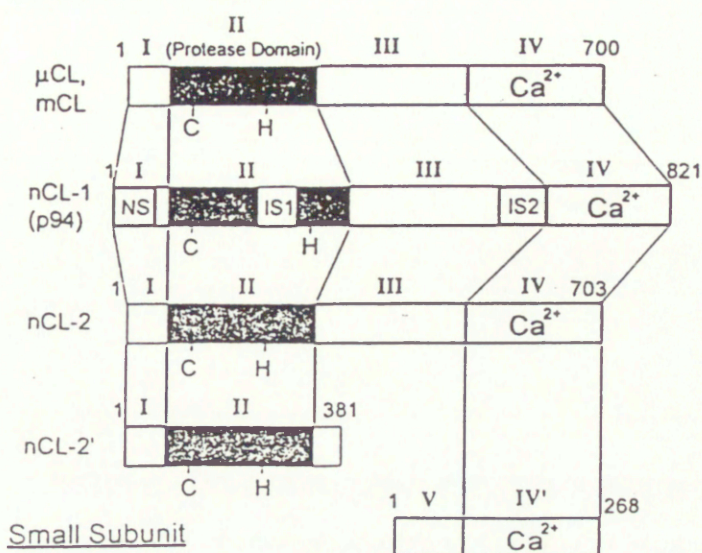


Ryc. 1.2 Schematyczne przedstawienie białka CANP3. (Richard i wsp. 1995) I, II, III, IV - domeny. NS, IS1, IS2 - sekwencje specyficzne dla mięśni.

CANP3, jest białkiem należącym do rodziny kalpain. Kalpainy podzielono w zależności od występowania na: tkankowo - swoiste i te, które występują w większości tkanek [Sorimachi i wsp. 1989, Sorimachi, Ishiura i Suzuki 1993, Sorimachi, Saido i Suzuki 1994]. Kalpainy są heterodimerami i składają się z podjednostek: dużej i małej (ryc. 1.3). Duża podjednostka ma cztery domeny. [Ohno i wsp. 1984]. Domena II podobna jest do innych proteaz cysteinowych, w miejscach aktywnych zawiera reszty histydynowe, cysteinowe i asparaginowe. Budowa domeny IV jest podobna do struktury kalmoduliny i zawiera cztery struktury EF (*hand structures-EF*), co sugeruje, że domena IV wiąże wapń i może być odpowiedzialna, za zależną od wapnia regulację funkcji kalpain. Domena I, podczas aktywacji ulega procesowi autokatalizy, co może wskazywać na to, że pełni ona funkcję w regulacji aktywności kalpainy. Funkcja domeny III pozostaje nadal nieznaną. Mała regulatorowa podjednostka zawiera następną, wiążącą wapń domenę i reguluje wrażliwość na wapń [Cong, Thompson i Goll 1993].

n - kalpaina 1 (nCL - 1, p94 lub CANP3), składa się także, z czterech domen (ryc. 1.2). W białku występują trzy unikalne regiony: NS (wewnątrz domeny I), IS1 (wewnątrz domeny II) i IS2 (wewnątrz domeny III). IS2 zawiera ponadto, sekwencję przypominającą jądrowy sygnał translokacji [Sorimachi i Suzuki 1992].

Large Subunit Family



Ryc. 1.3 Budowa izoenzymów kalpain (Saido, Sorimachi, Suzuki, The FASEB Journal 1994; 8: 814 - uaktualnione).

Regiony te mogą być odpowiedzialne za jej nieznaną jak dotychczas, swoistą dla mięśni funkcję. Mała podjednostka kalpain, pełniąca kluczową rolę w regulacji aktywności tych enzymów, nie łączy się z CANP3 [Sorimachi i wsp. 1995]. Natomiast, konektyna (tinina), białko, rozciągające się pomiędzy liniami M i Z mięśniowego sarkomeru [Trinick 1996], wiąże się z p94 poprzez region IS2 [Sorimachi i wsp. 1995]. Przyjmuje się, że konektyna może regulować aktywność CANP3. Jak już wspomniano, p94 występuje tylko w mięśniach szkieletowych, gdzie jej mRNA występuje w dużej ilości. Produkt translacji obecny jest natomiast w mięśniach, w ilości znacznie niższej. Uważa się, że wynika to z szybkiej, autolitycznej degradacji (okres półtrwania białka jest krótszy niż jedna godzina). Być może jest to związane z koniecznością precyzyjnej regulacji aktywności kalpains 3 [Sorimachi i wsp. 1993]. Tak krótki okres półtrwania, jest powodem

trudności w wykrywaniu CANP3 w mięśniach, dlatego też przeciwciała przeciwko CANP3, nie są jeszcze rutynowo stosowane w diagnostyce tej postaci dystrofii. Pojawiły się jednakże wstępne doniesienia, o próbach wykrywania CANP3 w tkance mięśniowej przy pomocy przeciwciał - wykazano brak CANP3 u trzech pacjentów z LGMD2A [Spencer i wsp. 1997].

Substraty dla CANP3 nie są znane. W ostatnim okresie ujawniono ekspresję kalpajny 3 w mięśniu serca, w okresie rozwoju embrionalnego [Beckmann 1997]. Biologiczne implikacje tego faktu, nie są znane, zwłaszcza że, pacjenci z LGMD2A, nie wykazują cech kardiomiopatii [Beckmann 1997].

Kalpajny są nielizosomalnymi, aktywowanymi wapniem, neutralnymi proteazami, [Suzuki i Ohno 1990] są receptorami dla sygnałów wapniowych w biologicznych systemach. Aktywacja kalpajny prowadzi do nieodwracalnej, ograniczonej, proteolitycznej przemiany białek będących ich substratami. Pełnią one funkcje regulatorowe [Saido, Sorimachi i Suzuki 1994]. Fizjologiczne konsekwencje aktywacji kalpajny są wynikiem modyfikacji substratu - białka przez proteolizę [Saido, Sorimachi i Suzuki 1994].

Zaproponowano dwie hipotezy, dotyczące funkcji CANP3 w mięśniach szkieletowych. Są one próbami wyjaśnienia patomechanizmu dystrofii typu LGMD2A . Sugerowano, że kalpajna 3 może aktywować enzym lub inne białko zaangażowane w metabolizmie mięśniowym. Wobec tego brak aktywności, powodowałby akumulację substratu i w wyniku tego, degenerację mięśni [Richard i wsp. 1995]. Druga hipoteza wykorzystuje obecność sekwencji, przypominającej jądrowy sygnał translokacyjny wewnątrz IS2. Sugeruje się, że CANP3 może pełnić rolę w okresie rozwoju mięśni, podczas ich różnicowania, co mogłoby

następować, poprzez modyfikację swoistych dla mięśni czynników transkrypcyjnych; takich jak te, należące do rodziny MyoD [Saïdo, Sorimachi i Suzuki 1994, Richard i wsp. 1995] . Tę hipotezę potwierdzałyby jądrowa lokalizacja CANP3 [Sorimachi i wsp. 1993].

Mutacje w genie CANP3, zostały zidentyfikowane przez grupę Beckmann`a przy użyciu metody heterodupleksów, bezpośredniego sekwencjonowania, a także nieuprawnionej transkrypcji z limfocytów krwi obwodowej. Znalaziono około 60 różnych mutacji [Richard i wsp. 1995, Richard i Beckmann 1995, Restagno i wsp. 1996, Beckmann i wsp. 1996, Beckmann 1997, Richard i wsp. 1997]. Początkowo wydawało się, że są one zlokalizowane głównie w egzonach kodujących domeny II i IV genu kalpiny [Richard i wsp. 1995], następnie jednak zidentyfikowano je także w pozostałych egzonach genu. Większość mutacji, to mutacje punktowe, które mogą powodować (ale nie zawsze) zmiany ramki odczytu, ponadto małe delecje lub insercje (przykłady podano w tabeli 1.2). Ocenia się, że około 50% zidentyfikowanych mutacji, to mutacje zmiany sensu [Beckmann i wsp. 1996].

Nieoczekiwana obecność różnych, niezależnych mutacji, we wsobnej populacji z wyspy Reunion, nazwana została „paradoksem Reunion”. W celu wyjaśnienia tego znaleziska zaproponowano dwugenowy model dziedziczenia [Richard i wsp. 1995]. Sugerowano, że istnieje drugi, nie zidentyfikowany gen, który może modyfikować fenotypową ekspresję mutacji genu kalpiny. Hipotetyzowano, że ten drugi *locus*, może być genem kodowanym przez DNA jądrowe lub mitochondrialne.

Obraz kliniczny dystrofii obręczowo - kończynowej typu LGMD2A [Jackson i Carey 1961, Passos - Bueno i wsp. 1991, Beckmann i wsp. 1991, Young i wsp. 1992, Fardeau i wsp. 1996a i 1996b, Restagno i wsp. 1996].

Przebieg schorzenia jest powoli postępujący, chociaż obserwuje się także przypadki przebiegające szybciej. Początek choroby przypada na ogół przed 20 rokiem życia. Utrata zdolności samodzielnego poruszania się następuje najczęściej po 10 - 20 latach od pojawienia się pierwszych objawów choroby. Osłabienie przeważa początkowo w mięśniach: pośladkowym większym, przywodzicielach stawu biodrowego, najszerszym grzbiecie i zębatym wielkim. Nie zaobserwowano zajęcia procesem chorobowym mięśnia serca. Przerost mięśni łydek występuje rzadko. Stwierdza się przykurcze, które we wczesnym okresie są ograniczone do ścięgien Achillesa. Obserwuje się wewnątrzrodzinną zmienność przebiegu [Richard i wsp. 1995, Fardeau i wsp. 1996a].

Obecnie wykonuje się już diagnostykę prenatalną w dystrofii obręczowo - kończynowej typu LGMD2A. Pierwszy przypadek takiej diagnostyki został opisany w 1996 roku [Restagno i wsp. 1996].

typ mutacji	zmiana nukleotydu	pozycja nukleotydu	efekt mutacji	egzon
zmiany sensu	CTG-CAG	545	Leu - Gln	4
zmiany sensu	GGG-GAG	701	Gly - Glu	5
zmiany sensu	GTG-GGG	1061	Val - Gly	8
zmiany sensu	CGG-TGG	1468	Arg - Trp	11
zmiany sensu	CGG-CAG	1715	Arg -Gln	13
zmiany sensu	AGC-GGC	2230	Ser -Gly	21
zmiany sensu	CGG-CAG	2306	Arg - Gln	22
nonsensowna	CGA-TGA	328	Arg - stop	2
nonsensowna	TGG-TAG	1079	Trp - stop	8
zerowa	CAA-CA	550	zmiana ramki odczytu	4
zerowa	CGG-CG	945	zmiana ramki odczytu	6
zerowa	G-A	946-1	nieprawidłowe składanie mRNA	6-7
zerowa	C-T	1872	nieprawidłowe składanie mRNA	16
zerowa	delecja AGAC	2313-2316	zmiana ramki odczytu	22
zerowa	AG-TCATCT	2362-2363	zmiana ramki odczytu	22

Tabela 1.2 Przykłady mutacji zidentyfikowanych w genie kodującym CANP3 (Richard i wsp. 1995).

LGMD2B

Drugie miejsce genomowe dla dystrofii obręczowo - kończynowej dziedziczącej się w sposób autosomalnie recesywny (LGMD2B), zostało zidentyfikowane przez Bashir i wsp. [Bashir i wsp. 1994], a następnie potwierdzone przez Passos - Bueno i wsp. [Passos - Bueno i wsp. 1995b]. Na podstawie dalszych badań region zawierający gen został zawężony do 2p13 [Bashir i wsp. 1996, Bushby i wsp. 1996]. Gen dla tej postaci dystrofii nie został do tej pory zidentyfikowany, ale na podstawie mapowania, do *locus* tego przypisano poszczególne rodziny i ustalono fenotyp pacjentów z LGMD2B. Przebieg tej dystrofii jest względnie łagodny [Mahjneh i wsp. 1996a]. Choroba ujawnia się na ogół w drugiej lub trzeciej dekadzie życia (pomiędzy 13 a 35 rokiem życia). Pierwsze objawy dotyczą zwykle mięśni ksobnych obręczy biodrowej. Najwcześniejszemu zanikowi ulegają mięśnie odwodziciele i mięśnie tylnej grupy uda. Aktywność kinazy kreatynowej jest podwyższona do 100 razy w stosunku do wartości prawidłowych.

Uważa się, że LGMD2B i inna postać dystrofii - miopatia Miyoshi (MM) mogą być allelicznymi wariantami mutacji tego samego genu [Bejaoui i wsp. 1995, Bashir i wsp. 1996]. Sugestie te wynikają z faktu zmapowania obu tych postaci dystrofii do tego samego regionu na chromosomie 2p13 [Bejaoui i wsp. 1995, Bashir i wsp. 1996]. Ponadto opisano współwystępowanie dwu postaci dystrofii: o fenotypie miopatii Miyoshi i dystrofii obręczowo - kończynowej, w jednej wysoce spokrewnionej rodzinie [Illarioshkin i wsp. 1996], a analiza sprzężeń wykazała mapowanie do *locus* 2B na chromosomie 2 [Illarioshkin i wsp. 1997]. Badania te potwierdzają sugestie, że obie formy dystrofii mogą

reprezentować alleliczne warianty mutacji w tym samym genie. Ponadto pomiędzy LGMD2B i MM istnieją pewne podobieństwa. Obie postaci dystrofii dziedziczą się w sposób autosomalnie recesywny, początek występuje nie wcześniej niż w drugiej dekadzie życia, aktywność kinazy kreatynowej jest wysoka. Jednak, w MM zanik i osłabienie mięśni obejmuje początkowo mięśnie odsiebne kończyn dolnych [Miyoshi i wsp. 1986, Meola i wsp. 1996], zaś w LGMD, mięśnie ksobne.

Analiza sprzężeń z użyciem mikrosatelitarnych markerów, jest metodą z wyboru, dla ustalania mapowania do chromosomu 2 w poszczególnych rodzinach. Umożliwia ona także, ustalenie zależności pomiędzy obiema tymi formami dystrofii mięśniowych postępujących.

Glikoproteinowy kompleks dystrofiny i dystrofie mięśniowe z deficytem komponentów kompleksu dystrofiny.

Glikoproteinowy kompleks dystrofiny.

Dystrofina, główne, wewnątrzkomórkowe białko strukturalne komórki mięśniowej [Koenig, Monaco i Kunkel 1988], jest produktem genu, mutacje którego, powodują DMD i jej alleliczny wariant, DMB [Hoffman, Brown i Kunkel 1987]. Badania błony komórkowej komórki mięśniowej umożliwiły poznanie innych, błonowych i z błoną komórkową związanych białek, które nazwano glikoproteinowym kompleksem dystrofiny (dystrophin glycoprotein complex - DGC, lub dystrophin associated proteins - DAP) [Campbell i Kahl 1989, Love i wsp. 1993].

Dystrofina jest zlokalizowana w sarkolemmie komórki mięśniowej [Zubrzycka - Gaarn i wsp. 1988] i stanowi około 5% jej białek [Ohlendieck i Campbell 1991]. Dystrofina jest ściśle związana z dużym, oligomerycznym kompleksem DAP. DAP składa się natomiast z: kompleksu dystroglikanowego (α - i β - dystroglikan) [Henry i Campbell 1996], sarkoglikanowego (α -, β -, γ -, δ - sarkoglikan), 25 DAP [Sunada i Campbell 1995] i syntrofin [Ahn i wsp. 1996] (ryc. 1.4). N - koniec dystrofiny łączy się z F - aktyną [Rybakowa, Amann, Ervasti 1996]. Triplet wewnątrzkomórkowych białek - syntrofiny, oraz homolog białka torpedo, dystrobrewina - α , [Helene i wsp. 1996], są związane z C - końcową domeną dystrofiny. Błonowy kompleks glikoproteinowy łączy się z domeną dystrofiny bogatą w cysteinę, przez śródbłonowy β - dystroglikan. Śródbłonowy kompleks glikoproteinowy łączy zewnątrzkomórkowo umiejscowiony α - dystroglikan z

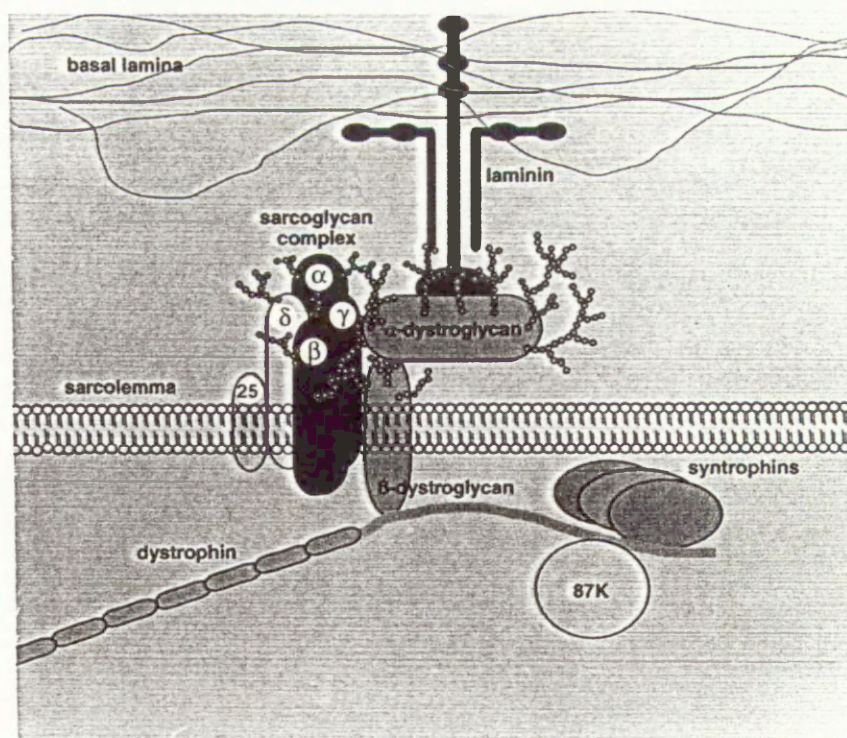
sarkolemmą i składa się z sześciu białek: β - dystroglikanu, α -, β -, γ -, δ - sarkoglikanów i 25 DAP. α - dystroglikan łączy się z zewnątrzkomórkowym białkiem, merozyną (lamininą -2). Komplex dystroglikanów razem ze śródbłonowymi sarkoglikanami tworzy pomost pomiędzy wnętrzem komórki i błoną podstawną.

Uważa się, że kompleks dystrofina - DGC - ECM (extracellular matrix - ECM) stabilizuje sarkolemmę i ochrania komórkę mięśniową przed urazami związanymi z jej skurczami [Michalak i Opas 1997]. Brak dystrofiny lub któregośkolwiek z elementów sarkoglikanowych może powodować destabilizację całego kompleksu doprowadzając do zerwania połączenia pomiędzy zewnątrz - i wewnątrzkomórkową przestrzenią. Wynikiem tego może być zwiększona wrażliwość sarkolemmy na uszkodzenia związane ze skurczem mięśni, co w efekcie prowadzi do nekrozy komórki.

Wykazano, że mutacje w niektórych genach kodujących białka należące do DGC/DAP są powodem różnych form dystrofii mięśniowych postępujących. Mutacje w genach kodujących α -, β -, γ - i δ - sarkoglikan, związane są z autosomalnie recesywnymi formami dystrofii obręczowo - kończynowej. Są to tzw: sarkoglikanopatie: LGMD2D, 2E, 2C, 2F [Roberds i wsp. 1994, Lim i wsp. 1995, Bonnemann i wsp. 1995, Nigro i wsp. 1996, Noguchi i wsp. 1995]. Brak merozyny, obserwuje się w niektórych przypadkach klasycznej dystrofii mięśniowej wrodzonej (congenital muscular dystrophy - CMD) [Tome i wsp. 1994]. Deficyt β - dystroglikanu opisano jak dotychczas u jednego pacjenta z osobną miopatią [Salih i wsp. 1996]. U pacjentów z DMD, którzy w wyniku rozległej delecji utracili dwie końcowe domeny dystrofiny (odcinek bogaty w

cysteinę oraz C - koniec), wszystkie komponenty kompleksu dystrofiny mogą być drastycznie zmniejszone. Ponadto, mutacje w którymkolwiek z genów kodujących sarkoglikany, mogą powodować nie tylko redukcję ilości określonego białka, ale także wtórny deficyt pozostałych komponentów, rzadziej zaś, dystrofiny [Ozawa i wsp. 1995].

Nie stwierdzono dotychczas, aby mutacje w genach kodujących inne białka DGC (tabela 1.3), były przyczyną schorzeń u ludzi. Można się jednak spodziewać, że niektóre z tych genów mogą być odpowiedzialne za inne formy dystrofii mięśniowych postępujących. Dlatego podjęte zostały poszukiwania mutacji w pozostałych genach DCG (*candidate gene approach*), u pacjentów z różnymi formami dystrofii mięśniowych postępujących.



Ryc. 1.4 Glikoproteinowy kompleks dystrofiny (Nigro i wsp. 1996).

Białko	Inne nazwy	Ciężar (kD)	lokalizacja genu
laminina α 2 łańcuch	merozyna	400	6q22
α - dystroglikan	156 DAG	156	3p21
β - dystroglikan	43 DAG	43	3p21
α - sarkoglikan	50 DAG, adhalina	50	17q21
β - sarkoglikan	43 DAG	43	4q12
γ - sarkoglikan	35 DAG	35	13q12
δ - sarkoglikan		35	5q33
25 DAP		25	
α - syntrofina	59 DAP1	58	20q11
β 1 - syntrofina	59 DAP2	59	16q23
β 2 - syntrofina	59 DAP3	60	8q23
dystrobrewina		87	18q12
dystrofina		427	Xp21

Tabela 1.3 Lokalizacja genów kodujących komponenty kompleksu DGC oraz wykaz białek należących do DGC (z Cell 1995; 60: 676, Campbell K. P. - uzupełnione, piśmiennictwo w tekście).

DAG - dystrophin associated glycoprotein,

DAP - dystrophin associated protein,

kD - kilodalton.

LGMD2C

Następny gen dla LGMD został przypisany do chromosomu 13 [Ben Othmane i wsp. 1992]. Mapowania dokonano w rodzinach tunezyjskich z dystrofią, o ciężkim przebiegu (Duchenne - like muscular dystrophy - DLMD).

DLMD jest także nazywana ciężką dziecięcą autosomalnie recesywnie dziedziczącą się dystrofią mięśniową (severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy - SCARMD). Występuje najczęściej w krajach, gdzie małżeństwa zawierane są wśród osób spokrewnionych: Tunezja, Algieria, Kuwejt [Ben Hamida, Fardeau, Attia 1983, Azibi i wsp. 1991, Farag i Teebi 1990]. DLMD w innych częściach świata jest względnie rzadka [Emery 1987]. Objawy kliniczne w DLMD i DMD są podobne. W przypadkach SCARMD jednak, kobiety i mężczyźni chorują równie często. W przeciwieństwie do DMD, gdzie dystrofina w mięśniach jest nieobecna [Hoffman i wsp. 1988] w przypadkach DLMD dystrofina mięśniowa jest prawidłowa [Ben Jelloun Dellagi i wsp. 1990]. W rodzinach o fenotypie SCARMD, w pierwszym etapie poszukiwania genu, wyłączono mapowanie do znanych już *loci*: na chromosomie 15 [Passos - Bueno i wsp. 1993c] i 6q (gen merozyny, tabela 1.3) [Azibi i wsp. 1991]. Mapowanie do chromosomu 13 zostało potwierdzone w badaniach El Kerch i wsp. [El Kerch i wsp. 1994]. Sugerowano więc genetyczną jednorodność SCARMD w północnej Afryce. Potwierdziły to dalsze badania [Ben Othmane i wsp. 1995], w których wykazano nierównowagę sprzężeń pomiędzy allelem o długości 122 par zasad markera D13S232 i badanym miejscem genomowym, co wskazywało na efekt założyciela w tym regionie geograficznym.

U pacjentów z DLMD, pochodzących z północnej Afryki wykazano deficyt 50 DAG (α - sarkoglikanu) [Matsumura i wsp. 1992 i Azibi i wsp. 1993], składnika DGC (ryc. 1.4, tabela 1.2). Początkowo uważano, że α - sarkoglikan może być produktem poszukiwanego genu [Azibi i wsp. 1993]. Jak później wykazano, gen kodujący α - sarkoglikan, przypisano do chromosomu 17 [Roberds i wsp. 1994] ostatecznie udawadniając, że deficyt α - sarkoglikanu, w wyżej wspomnianych rodzinach, był wtórny do destabilizacji kompleksu DGC, który nastąpił w wyniku mutacji w genie LGMD2C [Noguchi i wsp. 1995]. W innych badaniach wykazano genetyczną niejednorodność SCARM1. Stwierdzono, że fenotyp ten, może być wynikiem mutacji więcej niż jednego recesywnego genu [Passos-Bueno i wsp. 1993b].

Dystrofia przypisana do chromosomu 13 została nazwana LGMD2C [Bushby i Beckmann 1995] a produktem genu jest γ - sarkoglikan [Noguchi i wsp. 1995].

γ - sarkoglikan należy do białek śródbłonowych II typu. Składa się z trzech domen: śródbłonowej, cytoplazmatycznej i zewnątrzkomórkowej. Domena cytoplazmatyczna zawiera potencjalne miejsce fosforylacji dla kinazy II kazeiny, zewnątrzkomórkowa domena posiada miejsce glikozylacji [Noguchi i wsp. 1995].

mRNA γ - sarkoglikanu ulega ekspresji tylko w mięśniach szkieletowych poprzecznie prążkowanych i mięśniu serca [Noguchi i wsp. 1995].

Zidentyfikowane mutacje, to głównie mutacje punktowe i pojedyncze delecje kilkudziesięciu nukleotydów [Noguchi i wsp. 1995]. Opisano rodziny z potwierdzonymi badaniami genetycznymi typem LGMD2C i dokonano prób wstępnych korelacji kliniczno - genetycznych [Ben Hamida i wsp. 1996, Passos - Bueno i wsp. 1996a, McNally i wsp. 1996, Sewry i wsp. 1996].

LGMD2D

Gen dla LGMD2D, przypisano do chromosomu 17q12 - q21.33 [Roberds i wsp. 1994].

Produktem genu jest α - sarkoglikan, uprzednio nazywany adhaliną [Roberds i wsp. 1993, Roberds i wsp. 1994]. α - sarkoglikan jest strukturalnym białkiem śródbłonowym. Składa się z sekwencji hydrofobowej, domeny śródbłonowej, zawiera dwa potencjalne miejsca dla glikozylacji i jedno miejsce dla fosforylacji przez zależną od wapnia i kalmoduliny kinazę proteinową. Domena zewnątrzkomórkowa zawiera cztery reszty cysteinowe.

Długość genu wynosi około 12 kb. i zawiera przynajmniej 9 intronów [Roberds i wsp. 1994]. W intronie 6 zidentyfikowano polimorficzny mikrosatelitarny marker - dwunukleotydowe powtórzenia (CA)_n, wykorzystywany dla analizy sprzężeń. mRNA α - sarkoglikanu, obecne jest w mięśniach szkieletowych [Roberds i wsp. 1993, Roberds i wsp. 1994] i serca oraz w mniejszej ilości w tkance płucnej [Roberds i wsp. 1994]. Długość transkryptu wynosi około 1.5 kb., ale krótszy i w mniejszej ilości mRNA, także występuje w mięśniach szkieletowych. Uważa się, że mniejszy transkrypt powstaje w wyniku alternatywnego składania, użycia alternatywnych miejsc inicjacji transkrypcji lub poliadenylacji.

Dotychczas zidentyfikowano mutacje w następujących populacjach: europejskiej [Roberds i wsp. 1994, Piccolo i wsp. 1995, Eymard 1997], japońskiej [Akaike i Kawai 1997, Higuchi i wsp. 1997], północno - afrykańskiej [El. Kerch i wsp. 1994, Piccolo i wsp. 1995, Eymard 1997], brazylijskiej [Passos - Bueno i wsp. 1995a, Passos - Bueno i wsp. 1996a], argentyńskiej [Taratuto i wsp. 1996]. Większość mutacji, to mutacje punktowe: zmiany sensu, nonsensowne, mutacje

zaburzające składanie mRNA oraz małe duplikacje. Wielu chorych okazało się złożonymi heterozygotami.

Wśród pacjentów, u których rozpoznanie LGMD2D potwierdzono badaniami genetycznymi, obserwuje się przypadki tak o przebiegu ciężkim, o fenotypie SCARMD [Romero i wsp. 1994, Roberds i wsp. 1994, Piccolo i wsp. 1995, Akaike i Kawai 1997, Higuchi i wsp. 1997, Duggan i wsp. 1997], jak i łagodnym [Passos -Bueno i wsp. 1995a, Piccolo i wsp. 1995, Passos - Bueno i wsp. 1996a]. Początek objawów chorobowych przypada na pierwszą lub drugą dekadę życia. Uważa się, że najcięższy przebieg ma miejsce przy pełnym braku α - sarkoglikanu w komórkach mięśniowych oraz u pacjentów homozygotycznych w odniesieniu do mutacji, powodujących zmianę ramki odczytu i skrócenie powstającego produktu genu [Piccolo i wsp. 1995]. W przypadku mutacji zmiany sensu, przebieg schorzenia wydaje się być na ogół łagodniejszy [Passos - Bueno i wsp. 1995a].

LGMD2E

Gen dla LGMD2E został sklonowany i przypisany do ramienia długiego chromosomu 4q12 [Lim i wsp. 1995, Boonemann i wsp. 1995].

Produktem genu jest β - sarkoglikan, śródbłonowe białko składające się z 318 aminokwasów. N - koniec jest umiejscowiony wewnątrzkomórkowo, a C - koniec jest zewnątrzkomórkowy, ma trzy miejsca domniemanej glikozylacji [Lim i wsp. 1995, Bonnemann i wsp. 1995].

mRNA β - sarkoglikanu obecne jest we wszystkich tkankach. Ekspresja jest największa w mięśniach szkieletowych i serca, ale niższe poziomy mRNA wykrywane są w mózgu, łożysku, płucach, nerkach i śledzionie [Lim i wsp. 1995,

Bonnemann i wsp. 1995]. Główny transkrypt ma długość około 4.5 kb., chociaż wykrywa się także dwa mniejsze (3.0 kb, 1.35 kb.). Uważa się, że zarówno najdłuższy jak i najkrótszy transkrypt, powstają w wyniku alternatywnej poliadenylacji [Lim i wsp. 1995]. Koniec 5', regionu kodującego β - sarkoglikanu ulega alternatywnemu składaniu w różnych tkankach [Lim i wsp. 1995].

W rodzinach z dystrofią typu LGMD2E, zidentyfikowano różne mutacje: powodujące zmianę sensu, typu nonsense i małe duplikacje powodujące zmiany ramki odczytu [Bonnemann i wsp. 1995, Lim i wsp. 1995].

Również w tej postaci dystrofii obserwuje się przypadki o przebiegu łagodnym [Lim i wsp. 1995] jak i o fenotypie SCARMD [Bonnemann i wsp. 1995, Angelini i wsp. 1996, Duggan i wsp. 1997]. Opisano także przypadki o znacznej zmienności przebiegu klinicznego - mimo obecności tej samej mutacji u różnych pacjentów, obserwuje się różnie ciężki przebieg schorzenia. Przykładem jest dystrofia typu LGMD2E, w wysoce wsobnej populacji z południowej Indiany (USA), która jest homogenna pod względem genetycznym [Lim i wsp. 1995].

LGMD2F

Gen dla dystrofii obręczowo - kończynowej typu 2F przypisano do ramienia długiego chromosomu 5, w prążku 33-34 [Passos - Bueno i wsp. 1996b].

Produktem genu jest śródbłonowe białko, δ - sarkoglikan [Nigro i wsp. 1996], o budowie podobnej do innych sarkoglikanów. Składa się z: małej domeny wewnątrzkomórkowej, pojedynczej śródbłonowej domeny hydrofobowej i zewnątrzkomórkowego C - końca.

Gen LGMD2F składa się z 8 egzonów, pomiędzy którymi znajdują się długie sekwencje intronowe. Długość całego genu oszacowana jest na około 100 kb [Nigro i wsp. 1996].

Stwierdzono obecność dwóch transkryptów w tkankach: główny transkrypt o długości 8 kb. i drugi, występujący w mniejszej ilości, o długości 3.6 kb. mRNA obecne jest w największej ilości w mięśniach szkieletowych i w mięśniu serca, w mniejszej natomiast ilości, w mięśniach gładkich, mózgu i płucach [Nigro i wsp. 1996, Jung i wsp. 1996].

Obraz kliniczny dystrofii w rodzinach (dwóch), w których stwierdzono sprzężenie z *locus* LGMD2F, jest dość ciężki i przypomina SCARMD [Passos - Bueno i wsp. 1996a i 1996b].

Do tej pory, zidentyfikowano tylko jedną mutację (w stanie heterozygotycznym), u pacjenta z łagodną ksobną miopatią i podwyższeniem aktywności CK, jedynie trzokrotnym w stosunku do wartości prawidłowych [Nigro i wsp. 1996]. Ustalenie szczegółowego obrazu klinicznego LGMD2F, wymaga dalszych badań i obserwacji.

Korelacje kliniczno - genetyczne dystrofii obręczowo - kończynowej o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.

Obraz kliniczny różnych typów dystrofii obręczowo - kończynowych o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym jest podobny [Bushby 1996a]. Uważa się, że w poszczególnych przypadkach różnicowanie w obrębie tej grupy miopatii nie jest możliwe bez zastosowania badań genetycznych i immunohistochemicznych. Podjęte jednak zostały już próby ustalenia wstępnych korelacji kliniczno - genetycznych i klinicznej charakterystyki poszczególnych typów (tabela 1.4) [Fardeau i wsp. 1996a i 1996b, Mahjneh i wsp. 1996a, Ben Hamida i wsp. 1996]. Wydaje się, że dystrofie typu 2A i 2B przebiegają na ogół łagodniej niż dystrofie będące wynikiem mutacji genów kodujących komponenty kompleksu sarkoglikanowego, tzw: sarkoglikanopatie. Natomiast obraz kliniczny sarkoglikanopatii jest nie do odróżnienia od obrazu klinicznego dystrofinopatii [Duggan i Hoffman 1996].

Typ LGMD

Korelacje kliniczne

Prawidłowy kompleks sarkoglikanowy

LGMD2A

Początek 8 - 15 r.ż. Różnie szybki przebieg. Korelacja z rodzajem mutacji.

LGMD2B

Początek 16 - 25 r.ż. Przebieg zwykle powolny.

LGMD2G

Opisana tylko jedna rodzina.

Deficyt komponentów kompleksu

sarkoglikanowego

LGMD2C

Początek 2 - 10 r.ż. Przebieg szybki lub powolny.

LGMD2D

Początek w dzieciństwie lub w wieku dorosłym. Różnie szybki przebieg. Korelacja z rodzajem mutacji.

LGMD2E

Wstępne dane sugerujące zależność między ciężkością przebiegu a rodzajem mutacji.

LGMD2F

Tylko dwie rodziny opisane do tej pory.

Tabela 1.4 Korelacje kliniczne dystrofii obręczowo - kończynowej o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.
(zmodyfikowane z Bushby 1996a, Neuromuscular Disorders 6: 439)

LGMD o dziedziczeniu autosomalnie dominującym:

Postacie te stanowią od 10% [Bushby i Beckmann 1995], natomiast według innych autorów aż do 28% [van der Kooi i wsp. 1996], ogólnej liczby przypadków LGMD. Dotychczas opisano niewiele rodzin o tym sposobie dziedziczenia [Schneidermann i wsp. 1969, Bacon i Smith 1971, De Coster, De Reuck, Thiery 1974, Hastings, Groothuis, Vick 1980, Chutkow, Heffner, Kramer, Edwards 1986, Gilchrist, Pericak-Vance, Silverman, Roses 1988, Marconi i wsp. 1991, Marconi, Pizzi, Arimondi, Vannelli 1991, Somer i wsp. 1991, Miller, Beggs, Towfighi 1992, van der Kooi i wsp. 1996]. W poszczególnych rodzinach obraz kliniczny może być różny. Fenotypowo LGMD może przypominać dystrofię mięśniową typu Becker'a [Miller, Beggs, Towfighi 1992], objawom osłabienia mięśni może towarzyszyć kardiomiopatia [Fang i wsp. 1997, van der Kooi i wsp. 1997], lub dysartria [Speer i wsp. 1992]. W niektórych rodzinach w obrazie histopatologicznym mięśni, poza zmianami o charakterze pierwotnie mięśniowym, opisano obecność wodniczek kształtu nieregularnego lub okrągłego tzw. *rimmed vacuoles* [Marconi Pizzi, Arimondi, Vannelli 1991, Chutkow Heffner, Kramer, Edwards 1986].

W większości przypadków, początek jest późny; w 3 lub 4 dekadzie życia, przebieg względnie łagodny, a aktywność kinazy kreatynowej jest niższa niż w przypadkach o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.

Gen dla postaci, w której występuje osłabienie mięśni twarzy i dysartria oraz prawdopodobne zjawisko antycypacji, zmapowano do chromosomu 5q (LGMD1A) [Speer i wsp. 1992]; gen dla postaci, której towarzyszy

kardiomiopatia, [redacted]
wsp. 1997].

Diagnostyka różnicowa dystrofii obręczowo - kończynowej w oparciu o molekularne badania genetyczne.

Przed postawieniem rozpoznania dystrofii obręczowo - kończynowej, konieczne jest wyłączenie innych schorzeń mięśni, w których w obrazie klinicznym dominuje osobne osłabienie mięśni obręczy biodrowej i barkowej [Passos - Bueno i wsp. 1991, Arikawa i wsp. 1991, Hoffman i wsp. 1992, Hausmanowa - Petruszewicz 1993, Hausmanowa - Petruszewicz i wsp. 1995, Jardine 1994, van der Kooi 1996].

Po sklonowaniu genu dystrofiny i wprowadzeniu oceny dystrofiny mięśniowej przy pomocy przeciwciał, diagnostyka różnicowa pomiędzy dystrofinopatiami i LGMD stała się możliwa.

Bez zastosowania tych metod różnicowanie pomiędzy LGMD i sporadycznymi przypadkami dystrofii mięśniowej typu Beckera oraz w rodzinach, w których schorzeniem nie były dotknięte kobiety, było trudne. I tak, w autosomalnie recesywnej postaci ciężkiej dystrofii dziecięcej (SCARMD), obraz kliniczny może być podobny do dystrofii mięśniowej Duchenne'a, podczas gdy w łagodniejszych formach LGMD, obraz kliniczny może przypominać dystrofię mięśniową Beckera [Duggan i Hoffman 1996]. Również odwrotnie, chłopcy z SCARMD, przed erą diagnostyki molekularnej mogli być błędnie rozpoznani jako przypadki dystrofii mięśniowej Duchenne'a [Stec i wsp. 1995].

Chore kobiety z dystrofią mięśniową postępującą mogą być przypadkami LGMD lub objawowymi nosicielkami DMD [Bonilla i wsp. 1988, Cheveron i wsp. 1992, Clerk i wsp. 1991, Hoffman i wsp. 1992, Minetti i wsp. 1991], u których objawy kliniczne są wynikiem nierównej inaktywacji chromosomów X [Migeon 1994].

Opisano prawdziwą dystrofię typu Duchenne'a u kobiet z nieprawidłowościami chromosomalnymi. W przypadkach tych stwierdza się translokację części chromosomu X na autosom, z przełamaniem w miejscu lokalizacji genu dystrofiny [Boyd i wsp. 1986, Greenstein i wsp. 1980]. Ponadto pacjentki z nieprawidłową liczbą chromosomów, w przypadku defektywnego chromosomu X (z delecją w Xp21), np. chore z zespołem Turnera, mogą manifestować objawy dystrofii

Opisano także, rodzinę z dystrofią obręczowo - kończynową o fenotypie dystrofii mięśniowej Beckera, jednak z dziedziczeniem autosomalnie dominującym [Miller, Beggs, Towfighi 1992].

Z tego względu w przypadkach dystrofii przebiegającej z zespołem obręczowo - kończynowym podkreśla się obecnie konieczność wykonania badań mających na celu wyłączenie dystrofinopatii. Z punktu widzenia diagnostyki niezbędne są:

1. Badanie dystrofiny mięśniowej, metodą immunofluorescencyjną lub/i „western”.
2. Analiza DNA (multipleks PCR lub/i hybrydyzacji z odpowiednimi sondami molekularnymi), celem wyłączenia delecji części genu dystrofiny.
3. Badanie cytogenetyczne - w przypadkach chorych kobiet, u których stwierdza się nieprawidłową dystrofię.

Pacjenci z dystrofią twarzowo - łopatkowo - ramieniową (facioscapulohumeral muscular dystrophy FSHD) mają na ogół dość charakterystyczne objawy kliniczne, jednak ze względu na zmienną ekspresję genu, niektóre przypadki FSHD, mogą przypominać LGMD. Dlatego istnieje podejrzenie, że pacjenci z fenotypem LGMD i znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej, mogą okazać się przypadkami FSHD. Potwierdzono to na podstawie badań molekularnych [Jardine i wsp. 1994, van der Kooi i wsp. 1996].

FSHD jest dystrofią o dziedziczeniu autosomalnie dominującym [Deidda, Cacurri, Piazzo i Felicetti, 1996]. W dystrofii tej, osłabieniu mięśni kończyn towarzyszy osłabienie mięśni twarzy [Walton, Gardner - Medwin 1981, Dubowitz 1985, Padberg, Lunt, Koch i Fardeau 1991]. Gen odpowiedzialny za FSHD został przypisany do regionu q35, chromosomu 4 [Sarfarazi i wsp. 1992, Upadhyaya i wsp. 1992, Wijmenga i wsp. 1992a, Weiffenbach i wsp. 1992, Gilbert i wsp. 1992, Mathews i wsp. 1992, Mills i wsp. 1992] ale nie został do tej pory zidentyfikowany. Diagnostyka molekularna i potwierdzenie rozpoznania na podstawie badań genetycznych są mimo to możliwe dzięki obecności charakterystycznego dla FSHD polimorfizmu [Wijmenga i wsp. 1992b, van Deutekom i wsp. 1993, Wijmenga i wsp. 1994, Deidda i wsp. 1995] . Polimorfizm ten wykrywa się przy pomocy sondy molekularnej P13E - 11 po uprzednim, jednoczasowym trawieniu genomowego DNA dwoma enzymami restrykcyjnymi: EcoRI i BlnI. Umożliwia to wykrywanie defektu badanego *locus* (2 allele) a allele migrujące w żelu pochodzą z regionu 4q35. Jeśli chodzi o poradnictwo genetyczne, obecność „małego” fragmentu EcoRI/BlnI (10kb-35kb) dowodzi delecji w *locus* FSHD [Fisher i Upadhyaya 1997]. Podwójne trawienie ułatwia także, diagnostykę różnicową pomiędzy FSHD i LGMD, istotną w przypadkach dystrofii obręczowo - kończynowej ze znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej.

Różnicowanie pomiędzy poszczególnymi formami dystrofii obręczowo - kończynowej.

Jak powyżej opisano, LGMD jest niejednorodną grupą dystrofii, charakteryzującą się postępującym, symetrycznym osłabieniem mięśni ksobnych obręczy biodrowej i barkowej, o przebiegu łagodnym lub złośliwym. Poszczególne typy LGMD są fenotypowo do siebie podobne, co czyni przeważnie niemożliwym rozróżnienie ich bez wykonania: analizy sekwencyjnej DNA i oceny białek strukturalnych błony komórki mięśniowej.

1. Badania immunohistochemiczne białek komórki mięśniowej:

Identyfikacja sarkoglikanów i innych elementów DGC oraz produkcja monoklonalnych przeciwciał, specyficznie rozpoznających poszczególne glikoproteiny umożliwia różnicowanie pomiędzy formami LGMD z deficytem i bez deficytu sarkoglikanów [Love i wsp. 1993, Anderson 1996, Campbell 1995].

Trudności w wykrywaniu monoklonalnymi przeciwciałami CANP3, wynikają z krótkiego okresu półtrwania tego enzymu. Dlatego też metoda ta nie jest jeszcze rutynowo stosowana w diagnostyce LGMD [Sorimachi i wsp. 1993], chociaż próby takie zostały już podjęte [Spencer i wsp. 1997].

2. Analiza haplotypów stała się możliwa po identyfikacji nowych, wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych i stworzeniu genetycznych map (map sprzężeń) ludzkiego genomu [Weissenbach 1992, NIH/CEPH 1992]].

Obecnie wszystkie miejsca genowe mogą być analizowane przy pomocy ściśle sprzężonych markerów, także wewnątrzgenowych. Uzyskane rezultaty są uzależnione od liczebności rodziny. Genotypowanie umożliwia ocenę segregacji alleli w rodzinach i wyłączenie rodzin z poszczególnych *loci*. Pozwala to na

ograniczenie ilości genów, w których następnie poszukuje się mutacji u pacjentów z LGMD.

3. Poszukiwanie mutacji:

- analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA,
- analiza heterodupleksów,
- elektroforeza w żelu ze zmiennym gradientem denaturacji,
- nieuprawniona transkrypcja z limfocytów krwi obwodowej,
- sekwencjonowanie.

Wszystkie te metody, były zastosowane w celu poszukiwania mutacji u pacjentów z LGMD [Bonnemann i wsp. 1995, Fardeau i wsp. 1996a, Fardeau i wsp. 1996b, Lim i wsp. 1995, Noguchi i wsp. 1995, Passos - Bueno i wsp. 1995a, Richard i Beckmann 1995, Restagno i wsp. 1996, Richard i wsp. 1995, Roberds i wsp. 1994].

Metody omówione w punktach 1, 2, 3, zastosowane łącznie, umożliwiają analizowanie małych rodzin, a także przypadków sporadycznych.

Badania grupy pacjentów z LGMD, powinny obejmować:

Ustalenie obecności elementów DGC w biopsji mięśniowej, co umożliwia zidentyfikowanie rodzin z deficytem sarkoglikanów, gdzie analiza haplotypów i poszukiwanie mutacji może być ograniczone do czterech genów (LGMD2C, 2D, 2E, 2F) kodujących poszczególne sarkoglikany. W rodzinach z prawidłowym kompleksem DGC, badania genetyczne mogą być ograniczone do trzech *loci*: LGMD2A, LGMD2B i LGMD2G.

Cel pracy

2. Cel pracy

Celem pracy jest wykazanie heterogenności klinicznej i genetycznej u pacjentów z rozpoznaniem dystrofii obręczowo - kończynowej (LGMD). Rozpoznanie LGMD zostało postawione w analizowanej przez nas grupie chorych w latach 1980 - 1995, a więc w większości przypadków, przed wprowadzeniem do diagnostyki metod genetyki molekularnej. Można oczekiwać wobec tego, że w grupie tych pacjentów mogą być także przypadki innych dystrofii, mylnie rozpoznane jako LGMD.

Badania obejmują następujące etapy:

1. Ujednolicenie grupy chorych z rozpoznaniem LGMD i ewentualne wyłączenie przypadków dystrofinopatii oraz innych typów dystrofii w oparciu o badania obecności dystrofiny mięśniowej i analizę DNA.
2. Wykazanie niejednorodności genetycznej (heterogenności *locus*), w grupie zebranych rodzin, już po uprzednim ujednoliceniu grupy.
3. Określenie występowania ewentualnych mutacji u pacjentów na przykładzie genu kodującego CANP3. Wybrano jeden gen, ze względu na znaczną niejednorodność genetyczną dystrofii obręczowo - kończynowej (siedem genów, mutacje których powodują powstanie fenotypu LGMD). Wybór ten, jest uzasadniony faktem zidentyfikowania przypadków z typem LGMD2A w centralnej Europie i stosunkowo częstym występowaniem tego wariantu w

ogólnej populacji pacjentów z LGMD. Ze względu na wielkość genu (24 egzony), do analizy wybrano egzony kodujące domenę II, uwzględniając wstępne dane, świadczące o względnie częstym występowaniu w nich mutacji.

4. Charakterystyka kliniczna pacjentów, z dystrofią obręczowo - kończynową typu 2A.

Material

3. Materiał.

Materiał stanowi grupa 125 pacjentów ze 106 rodzin. W większości rodziny były mało liczne lub niekompletne, co dodatkowo utrudniało analizę genetyczną. Materiał został zebrany w Klinice Neurologicznej AM w Warszawie, Zespole Badawczo - Leczniczym Chorób Nerwowo - Mięśniowych PAN oraz przez Zakład Genetyki Medycznej (Department of Medical Genetics), Uniwersytetu w Newcastle.

I. 88 (105 pacjentów) ze 106 rodzin. Rozpoznanie LGMD stawiano podczas hospitalizacji w Klinice Neurologicznej AM w Warszawie lub chorzy diagnozowani byli ambulatoryjnie w poradni Chorób Mięśni w latach 1980 - 1995.

70 pacjentów to przypadki sporadyczne, pozostałe są rodzinne o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym. Grupa ta jest fenotypowo heterogenna, co wyraża się różnym wiekiem wystąpienia pierwszych objawów klinicznych (2 - 36 r. ż), różną ciężkością przebiegu, w niektórych przypadkach przerostem mięśni łydek.

Rozpoznanie dystrofii obręczowo - kończynowej w badanej grupie chorych stawiano na podstawie: obrazu klinicznego, wyników badań: elektromiograficznego i biopsji mięśniowej, oceny aktywności kinazy kreatynowej i aldolazy w surowicy krwi. Źródłem informacji o chorych były historie chorób, karty obserwacji ambulatoryjnych oraz kontrolne badania kliniczne, na które chorzy ci zostali wezwani wraz z rodzinami. W każdej rodzinie przeprowadzono wywiad genetyczny i sporządzono rodowód.

II. 21 pacjentów z 18 rodzin, zostało zebranych przez Zakład Gnetyki Medycznej,
Uniwersytetu w Newcastle (Wielka Brytania).

Metody

4. Metodyka.

4.1 Metody laboratoryjne zastosowane w pracy:

- badanie dystrofiny mięśniowej metodami immunochemicznymi i metodą typu „western”,
- badanie cytogenetyczne - ocena kariotypu,
- izolacja DNA metodą fenolową,
- rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych,
- reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR),
- hybrydyzacja metodą Southerna,
- analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA,
- analiza heterodupleksów,
- analiza sekwencji fragmentów DNA,
- klonowanie fragmentów DNA, uprzednio amplifikowanych w reakcji PCR, w plazmidach bakteryjnych.

4.2 Wstęp do metod:

1. Kliniczne badania kontrolne pacjentów, u których rozpoznano dystrofię obřęczowo - kończynową w latach 1980 - 1995.

- badanie neurologiczne i ocena postępu choroby,
- wykonanie testu mięśniowego i ocena stanu funkcjonalnego w skali według Archibalda i Vignosa (załącznik 2) [Archibald & Vignos 1959],
- badania biochemiczne - badanie aktywności kinazy kreatynowej (CK) i aldolazy w surowicy krwi,
- badanie dostępnych członków rodzin pacjentów - badanie neurologiczne, badania biochemiczne, pobranie krwi w celu izolacji DNA, ewentualne uzupełnienie wywiadu rodzinnego.

Pobierano około 15 ml krwi od chorych i zdrowych członków rodzin, do jałowych próbek zawierających 300 μ l EDTA (wersenian dwusodowy). DNA izolowano z leukocytów krwi obwodowej metodą fenolową [Kunkel i wsp. 1977], w Pracowni Genetycznej Kliniki Neurologicznej AM, w Warszawie.

2. Ujednolicenie grupy pacjentów z LGMD:

a. Wyłączenie dystrofinopatii:

W przypadkach, w których nie oceniano dystrofiny mięśniowej dokonano ponownie biopsji mięśnia (dwugłowego ramienia, lub czworogłowego uda).

* Ocena dystrofiny mięśniowej - ocena immunochemiczna (badanie immunofluorescencyjne z użyciem monoklonalnych przeciwciał przeciwko dystrofinie) w mikroskopowych skrawkach mięśnia, w części przypadków metodą „western” (wykonano w Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, w Warszawie).

- * Analiza DNA (PCR lub metodą hybrydizacyjną), w celu wyłączenia lub stwierdzenia delecji genu dystrofiny, u chorych chłopców (wykonano w Zakładzie Genetyki, IPN w Warszawie).
 - * Badanie cytogenetyczne (ocena kariotypu - metodą prążków G), u chorych kobiet z nieprawidłową dystrofiną - w celu wyłączenia aberracji chromosomowych (wykonano w Zakładzie Genetyki IPN w Warszawie).
- b. Wyłączenie przypadków dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej (FSHD) u chorych ze znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej.
- Analiza hybrydizacyjna z zastosowaniem sondy molekularnej P13E-11, która wykrywa charakterystyczny dla FSHD polimorfizm.
3. Poszukiwanie mutacji u pacjentów z LGMD w genie kodującym CANP3 (kalpainę 3).
- a. metody pośrednie:
- * ustalenie haplotypów w rodzinach dla poszczególnych *loci* LGMD - zastosowano reakcję łańcuchową polimerazy ze starterami dla markerów mikrosatelitarnych ściśle sprzężonych z pięcioma *loci* (dwa pozostałe *loci* dla LGMD dziedziczącej się w sposób autosomalnie recesywny nie były znane w czasie wykonywania badań). Z badanej grupy rodzin wyłączono te rodziny, które nie mapowały się do *locus* na chromosomie 15 oraz wyłączono niektóre rodziny z poszczególnych *loci*,
 - * poszukiwanie mutacji lub/i polimorfizmu w poszczególnych egzonach genu CANP3 w rodzinach, w których nie wyłączono mapowania do *locus* na chromosomie 15 i w rodzinach, w których nie można było zastosować analizy

haplotypów - analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP)

i analiza heterodupleksów (HET),

b. metody bezpośrednie:

* ustalanie sekwencji nukleotydowej poszczególnych egzonów genu kodującego
CANP3.

4.3 Opis metod i materiałów zastosowanych w pracy:

Szczegółowo opisano tylko te metody, które były bezpośrednio zastosowane przez badającego.

Ta część pracy wykonana została w Zakładzie Genetyki Medycznej, Uniwersytetu w Newcastle (Wielka Brytania).

4.31 Analiza haplotypów:

Celem analizy jest ustalenie alleli segregujących w rodzinach, w poszczególnych *loci* dla LGMD, Stwierdzenie obecności rekombinantów może umożliwić wyłączenie niektórych rodzin z poszczególnych *loci*, a w następstwie tego, ukierunkować poszukiwania mutacji. Analiza haplotypów jest metodą opartą na genotypowaniu osobników należących do tej samej rodziny, z użyciem wysoko polimorficznych markerów, takich jak sekwencje mikrosatelitarne. Są one obecnie najczęściej stosowane w badaniach genetycznych. Mikrosatelitarne sekwencje inaczej nazywane krótkimi tandemowymi powtórzeniami (ang. short tandem repeats - STRs) są sekwencjami powtarzającymi się, o liczbie nukleotydów 2-4 bp. Występują one równomiernie rozproszone po całym genomie, a ponadto są często polimorficzne. Ich heterozygotyczność osiąga wartość 0,7, ponadto mogą być łatwo analizowane przy pomocy reakcji PCR [Weissenbach i wsp. 1992].

W ostatnich latach, wiele badań poświęcono identyfikacji nowych markerów mikrosatelitarnych, co pozwoliło na skonstruowanie genetycznych map ludzkiego genomu [NIH/CEPH Collaborative Mapping Group 1992, Weissenbach i wsp. 1992]. Wszystkie zmapowane do tej pory *loci* LGMD mogą być analizowane, przy użyciu wybranych markerów mikrosatelitarnych.

W pracy tej, mikrosatelitarne markery, zostały użyte, w celu ustalenia alleli lub/i haplotypów w *loci* LGMD, w badanych rodzinach. Wybór markerów, był zależny od ich genomowej lokalizacji, zawartości polimorficznej informacji (polymorphic information content-PIC), oraz dostępności w momencie wykonywania badań.

Wybrane markery mikrosatelitarne sprzężone z loci LGMD analizowanymi w niniejszej pracy:

marker	lokalizacja	PIC	wielkość produktu PCR	piśmiennictwo	
D2S2111	2p		~220 bp	wszystkie trzy ściśle sprzężone z LGMD2B	[Gyapay i wsp. 1994]
D2S2109	2p		~220 bp		
D2S291	2p		~190 bp		[Passos - Bueno i wsp. 1995b]
CA12T	4q	0.7	~300 bp	(438-439nts) w LGMD2E	[Lim i wsp. 1995]
D4S428	4q	0.77	~190 bp	ściśle sprzężony z LGMD2E	
D13S232	13q		~120 bp	wewnątrzgenowy w LGMD2C	[Ben Othmane i wsp. 1995]
D15S779	15q	0.84	~96 bp	oba ściśle sprzężone z LGMD2A	[Allamand i wsp. 1995b]
D15S782	15q	0.78	~132 bp		
D17S1319	17q		~160 bp	wewnątrzgenowy w LGMD2D (intron 6)	[Roberds i wsp. 1994]

W niektórych przypadkach dodatkowo zastosowano następujące markery mikrosatelitarne, ściśle sprzężone z *locus* LGMD2B:

D2S145, AFMa205zc5, D2S291, D2S327, D2S292 [Gyapay i wsp. 1994].

Analiza haplotypów przebiega w kilku etapach:

1. znakowanie startera F,
2. reakcja łańcuchowa polimerazy ze starterami dla markerów mikrosatelitarnych,
3. rozdzielenie produktów PCR w denaturującym poliakrylamidowym żelu,
4. autoradiografia,
5. analiza autoradiogramów i konstrukcja poszczególnych haplotypów.

1. Znakowanie starterów:

Koniec 5', startera F był radioaktywnie znakowany, przy użyciu $\gamma^{32}\text{P}$ dATP i kinazy polinukleotydomowej faga T4 (Boehringer Mannheim). Reakcję znakowania przeprowadzono w objętości 30 μl ., w temperaturze 37^o C przez 45 min.

Mieszanina reakcyjna:

Starter F (10 μM) - s.k.-0.25 μM w mieszaninie PCR,
Bufor kinazy polinukleotydomowej faga T4 (10X) - 1X,
 γ^{32} dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), - 3 $\mu\text{l}/50\text{-}60$ próbek,
o radioaktywności specyficznej - 3000 Ci/mmol (Amersham)
Kinaza polinukleotydomowa faga T4 (10 $\text{u}/\mu\text{l}$) - 1 μl ,

2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR):

Stężenie genomowego DNA oceniono przy pomocy GeneQuant. DNA rozcieńczano do około 100 - 150 ng/ μl .

Okolo 100 ng DNA każdego pacjenta zostało użyte w reakcji PCR zawierającej następujące składniki:

Bufor polimerazy Taq (10X) -1X
MgCl₂ (25 mM) - s.k. - 1.5 mM
dNTPs (2 mM) - s.k. - 0.2 mM
Starter R (10 μM) - s.k. - 0.25 μM

Mieszanka znakowanego startera - 3 μ l

Polimeraza Taq (5 jednostek/ μ l) (Amersham) - 0.5 jednostek/PCR

Dodano sdH_2O do objętości końcowej - 10 μ l.

Reakcję PCR przeprowadzono w „Hybaid - Omnigene” w następujących warunkach:

denaturacja w temp. 94° C przez 1 min., przyłączenie starterów - temp. 55° C przez 1 min., wydłużenie łańcucha - temp. 72° C przez 1 min. (30 cykli). Faza ostatecznego wydłużania - temp. 72° C przez 10 min. - 1 cykl.

Po amplifikacji do każdej z próbek dodano 6 μ l buforu zatrzymującego reakcję (10 mM EDTA, 0.05% błękit bromofenolowy, 0.05% ksylen, 98% formamid).

3. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym:

Około 3-4 μ l produktu powyższej reakcji PCR umieszczono w studzienkach żelu. Zastosowano 6% denaturujący żel poliakrylamidowy - Sequagel, (National Diagnostics), czynnikiem denaturującym był 8M mocznik. Próbkę poddano zostały elektroforezie w buforze 1X TBE w temp. 55°C, pod wpływem prądu o mocy 100 Watów, przez 2-4 godzin w zależności od wielkości produktu PCR.

4. Autoradiografia:

Żele wysuszono i poddano autoradiografii na filmach BioMax Kodak przez 12 do 48 godzin w zależności od intensywności radioaktywnego sygnału.

5. Analiza autoradiogramów i konstrukcja poszczególnych haplotypów:

10X TBE (108 g. Tris, 55 g. kwasu borowego, 40 ml. 0.5 M EDTA, pH - 8, destylowana woda do 1000 ml. końcowej objętości)

* s.k. - stężenie końcowe.

4.32 Analiza polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP) i analiza heterodupleksów (HET).

Polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP) i analiza heterodupleksów (HET) są metodami stosowanymi w pierwszym etapie identyfikacji „małych” mutacji. Obie te metody wykrywają zarówno mutacje jak i polimorfizmy [Orita i wsp. 1989, Keen i wsp. 1991, Michaud i wsp. 1992].

Metoda SSCP wykazuje zmienioną ruchliwość zmutowanego jednoniciowego DNA, w stosunku do jego prawidłowego odpowiednika. Pojedyncza nić DNA w roztworze i w określonych warunkach przyjmuje trójwymiarową strukturę, która jest zależna od sekwencji nukleotydowej. W przypadku zmiany jednej lub więcej par zasad dochodzi do utworzenia nowej trójwymiarowej struktury DNA, co w efekcie może wpływać na zmianę ruchliwości elektroforetycznej zmutowanego fragmentu.

Typ dziki i badana, potencjalnie zmutowana sekwencja są amplifikowane w reakcji PCR, następnie denaturowane i poddawane elektroforezie w niedenaturującym, poliakrylamidowym żelu, często z dodatkiem glicerolu. Różnice sekwencji pomiędzy typem dzikim i badanym odcinkiem DNA powodują różną prędkość migracji fragmentów DNA w żelu. Próbkę migrującą odmiennie od kontrolnego DNA, mogą być następnie scharakteryzowane przy pomocy sekwencjonowania.

Fragmenty DNA po rozdzieleniu w żelach mogą być uwidocznione autoradiograficznie - na kliszach rentgenowskich (znakowanie produktu PCR: ^{32}P lub ^{35}S), albo wybarwiane azotanem srebra.

Według danych literaturowych, metodą SSCP można wykryć od 35% do 100% mutacji w badanym fragmencie DNA [Claustres i wsp. 1993, Michaud i wsp. 1992, Sarkar, Yoon, Sommer 1992, Sheffield i wsp. 1993]. Uważa się, że czułość tej metody znacznie się zwiększa, kiedy SSCP jest stosowane razem z analizą heterodupleksów [Cotton 1993, Grompe 1993, Soto and Sukumar 1992]. Czułość obu metod ulega obniżeniu, w przypadku wydłużenia badanej sekwencji nukleotydowej. Optymalna długość amplifikowanego fragmentu, zawiera się pomiędzy 100 a 300 par zasad. Przy fragmentach dłuższych niż 400 bp., czułość metody ulega znacznemu obniżeniu.

W analizie heterodupleksów (HET), dokonuje się pomiaru ruchliwości dwuniciowego DNA w żelu niedenaturującym [Nagamine, Chan, Lau 1989, White i wsp. 1992]. Heterodupleksy są tworzone jeśli w mieszaninie jednocześnie znajdują się fragmenty o sekwencji zmutowanej i dzikiej [Keen i wsp. 1991]. Zmiana jednego lub kilku nukleotydów w badanej sekwencji ujawnia się w tworzeniu heterodupleksów o zmienionej ruchliwości w porównaniu z homodupleksem kontrolnego odcinka DNA [Grompe 1993, Cotton 1993]. Wynika to ze zmian konformacji podwójnej nici DNA, która jest również zależna od sekwencji nukleotydowej. Poziom czułości metody HET dla fragmentów o długości 100 - 300 bp. jest podobny jak dla SSCP [Soto, Sukumar 1992].

Użycie obu tych technik nie umożliwia jednak określenia miejsca ani charakteru mutacji.

Przygotowanie próbek DNA:

Warunki dla amplifikacji każdego z egzonów genu kodującego CANP3 zostały tak dobrane, aby uzyskać pełną specyficzność reakcji (wyniki, tabela 5.10).

Startery zostały zaplanowane tak, aby amplifikacji ulegały egzony wraz ze złączami egzon/intron [Richard i wsp. 1995]. Genomowy DNA, po rozcieńczeniu do około 100 -150 ng/2 μ l, użyto jako matrycy dla reakcji PCR, w końcowej objętości 25 μ l każda.

Mieszanka PCR zawierała następujące składniki:

Bufor polimerazy Taq (10x) - 1x
MgCl₂ (25 mM) - s.k. - 1.5 mM
dNTPs (2mM) - s.k. - 0.2 mM
Starter F (10 μ M) - s.k. - 0.25 μ M
Starter R (10 μ M) - s.k. - 0.25 μ M
Polimeraza Taq (0.5 jednostek/ μ l) - 0.5 jednostek/PCR

Próbki DNA z mieszaniną PCR, były inkubowane w „Hybaid - Omnigene”, w następujących warunkach:

Warunki PCR:

Wstępna denaturacja	94° C	4 min.	1 cykl
Denaturacja	94° C	30 sek.] 30 cykli
Temp. asocjacji starterów	50°C - 60°C	1 min.	
Faza wydłużania łańcucha	72° C	1 min.	
Faza ostatecznego wydłużania	72° C	10 min.	1 cykl

Po amplifikacji produkty PCR były poddane elektroforezie w 2%, żelu agarozowym (Pharmacia), w celu oceny wydajności i specyficzności amplifikacji.

Do 7 μ l każdego z produktów PCR dodano 7 μ l buforu zatrzymującego reakcję (95% formamid, 10mM NaOH, 0.25% błękit bromofenolowy, 0.25% ksylen).

Następnie próbki denaturowano w temp. 95° C przez 3 min. i umieszczano w lodzie, tak aby zachowały jednoniciową strukturę DNA.

W metodzie HET procedura była podobna, z wyjątkiem:

Do 7 μ l produktu PCR badanej próbki dodawano 7 μ l kontrolnego produktu PCR (o znanej i prawidłowej sekwencji DNA). Do tej mieszaniny dodawano 4 μ l buforu zatrzymującego reakcję. Tak przygotowane próbki były denaturowane w temp. 95° przez 3 min., a następnie powoli ochładzane (przez ponad godzinę), co stwarza odpowiednie warunki dla formowania homodupleksów i heterodupleksów.

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR:

Próbki poddawano elektroforezie w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym, zawierającym 5% glicerolu. W pracy stosowano żel MDE (J.T. Baker) zgodnie z zaleceniami producenta. Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzano w buforze 0.6x TBE, w temp. około 4 - 8° C, pod napięciem 300 Voltów przez 14 - 18 godzin, w zależności od wielkości produktu PCR.

Barwienie azotanem srebra:

Po elektroforezie żele umieszczano w kolejnych roztworach:

- w wodnym roztworze 10% etanolu i 0.5% kwasu octowego - przez 3 min, dwukrotnie,
- w 0.1% wodnym roztworze azotanu srebra - przez 15 min.,
- dwukrotnie płukano w wodzie destylowanej,
- w wodnym roztworze 1.5% wodorotlenku sodu i 0.15% formaldehydu - przez 20min.,
- w 0.75% wodnym roztworze węglanu sodu - przez 10 min.

Następnie żele pokryto folią plastikową i analizowano.

4.33 Sekwencjonowanie.

Sekwencjonowanie polega na ustaleniu kolejności nukleotydów w badanym fragmencie DNA. Jest ono ostatnim etapem fizycznego mapowania i identyfikacji mutacji, szczególnie przy poszukiwaniu nowych, nieznanych mutacji. Sekwencjonowanie w większości przypadków wykonywane jest metodą enzymatyczną Sanger [Sanger, Nicklen, Coulson 1977]. Metoda ta polega na analizowaniu produktów syntezy DNA *in vitro*. Synteza zachodzi na jednoniciowej matrycy DNA od oligonukleotydowego startera komplementarnego do końca 3' matrycy. W skład czterech mieszanin reakcyjnych wchodzi cztery różne dideoksytrifosforany nukleotydów. Powodują one terminację syntezy w pozycji, w której zostaną włączone do rosnącej nici DNA.

W 1990 roku opisano metodę umożliwiającą całkowite zautomatyzowanie sekwencjonowania DNA, przy użyciu barwnika fluorescencyjnego do znakowania oligonukleotydowego startera [Wilson i wsp. 1990].

W pracy tej sekwencjonowanie zostało wykonane zgodnie z procedurą opisaną w protokole "Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit" (Amersham), w modyfikacji własnej jak niżej. Matryce do sekwencjonowania stanowiły produkty reakcji PCR lub egzony genu kodującego CANP3 sklonowane w plazmidach bakteryjnych.

Po amplifikacji produkty PCR były poddane elektroforezie w 1.5 % żelu agarozowym i oczyszczone zgodnie z protokołem: WizardTM PCR Preps DNA Purification System for Rapid Purification of DNA Fragments (Promega).

Protokół reakcji sekwencjonowania: Jako matrycy użyto 300 ng DNA i około 300 ng startera. Przygotowano następujące mieszaniny:

Składniki mieszaniny asocjacji (annealing):

- 300 ng - DNA,
- 1 μ l - DMSO (dwumetylo sulfotlenek), (BDH Chemicals Ltd.)
- 2 μ l - bufor reakcji,
- 300 ng - starter F lub R,
- sdH₂O (do uzyskania objętości reakcji 10 μ l).

Składniki mieszaniny znakującej (na jedną próbkę):

- 1 μ l - 0.1 M DTT (dwutiotretiol),
- 0.5 μ l - lab. mix dGTP,
- 0.5 μ l (5 μ Ci)- ³⁵S-dATP,
- 1.75 μ l - sequenase dilution buffer,
- 2 μ l - sd H₂O,
- 0.25 μ l - Sequenase version 2.0

Mieszaniny hamujące syntezę łańcuchów DNA: do 2 μ l każdej mieszaniny terminującej (ddA, ddC, ddG, ddT) dodano po 0.25 μ l DMSO.

1. Procedura sekwencjonowania:

- 1.1. Denaturacja matrycy DNA w temp. 99° C przez 2 min., następnie umieszczano je w lodzie,
- 1.2. Mieszaninę asocjacji inkubowano przez 2 min. w temp. 65° C, a następnie ochładzano do < 35° C przez 15 do 30 min. Po odwirowaniu chłodzono w lodzie.
- 1.3. 5 μ l mieszaniny znakującej dodano do mieszaniny asocjacji i pozostawiono w temp. pokojowej na 5 min.,

1.4. Mieszaniny hamujące syntezę łańcuchów DNA inkubowano w temp. 37° C, przez 4 min.,

1.5. Do każdej z czterech mieszanin terminujących dodano 3.4 µl mieszaniny opisanej w pkt. 1.3. Całość inkubowano w temp. 37° C, przez 3 - 5 min., następnie do każdej próbówki dodano po 4 µl buforu „stop”.

Tak przygotowane próbki przechowywane były w temp. -20° C.

2. Elektroforeza:

Próbki DNA denaturowano w temp. 80° - 85° C przez 2 min., a następnie umieszczono w lodzie, dla zachowania jednoniciowej struktury.

- próbki nanoszono na 6% denaturujący żel poliakrylamidowy, według następującej kolejności: A., C., G., T.,

- warunki elektroforezy:

* moc - 100 Watów,

* temperatura 50° - 55° C,

* bufor - 1x TBE,

* czas elektroforezy modyfikowano w zależności od długości sekwencjonowanego fragmentu.

:- długi 3 do 4 godzin (umożliwia czytanie sekwencji w dalszej odległości od miejsca przyłączenia startera).

- krótki 1.5 do 2 godzin (umożliwia czytanie sekwencji w bezpośredniej bliskości miejsca przyłączenia się startera).

3. Autoradiografia:

Żele suszono i poddawano autoradiografii na filmach BioMax Kodak, przez 16 do 72 godzin, w zależności od intensywności sygnału. Następnie żele były analizowane.

Modyfikacje warunków reakcji:

W celu zredukowania kompresji prążków, szczególnie w regionach bogatych w sekwencje GC, konieczne było użycie dITP lab. mix. i mieszanin terminujących dITP. Dodatkowo stosowano pyrofosfatę w ilości 0.5 μ l do sequenase dilution buffer, na 4 sekwencjonowane próbki.

* Niektóre nazwy buforów i enzymów pozostawiono w wersji oryginalnej (ang.), wg. Sequenase Version 2.0 (Amersham).

4.34 Hybrydyzacja Southerna.

Przed hybrydyzacją DNA trawiony jest jednym lub większą liczbą enzymów restrykcyjnych, a następnie poddawany elektroforezie. Fragmenty DNA migrują w kierunku dodatnio naładowanej elektrody, z szybkością zależną od ich wielkości (w granicach wielkości DNA od 0.1 do 20 - 30 kb). Dla rozdzielenia fragmentów większych od 40 kb. konieczne jest zastosowanie elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym.

DNA jest denaturowany w środowisku zasadowym i przenoszony na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy, gdzie pojedyncze nici DNA zostają unieruchomione. Hybrydyzacja molekularna umożliwia identyfikację sekwencji DNA, które są podobne do sekwencji zasad znakowanej sondy. Jednociowa znakowana radioaktywnia sonda molekularna jest dodawana do roztworu z filtrem nitrocelulozowym, na którym znajduje się unieruchomiony badany fragment DNA. W odpowiednich warunkach nici DNA mające komplementarne sekwencje połączą się. Pozycja przyłączonej sondy może być wykryta poprzez autoradiografię [Southern 1975].

Hybrydyzacja metodą Southerna jest uważana za jedną z szybszych metod poszukiwania mutacji [Grompe 1993]. Jej istotną zaletą jest to, że nie jest wymagana szczegółowa znajomość badanej sekwencji. Powstanie prążków o innych niż oczekiwane wielkościach, bądź o zmienionej intensywności świadczy o: dużych delecjach lub insercjach, może być także wynikiem zmiany miejsca restrykcyjnego dla zastosowanego enzymu.

Sonda molekularna P13E-11 stosowana jest do wykrywania polimorfizmu charakterystycznego dla dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej (FSHD).

Pochodzi ona z kosmidu 13E [Wijmenga i wsp. 1992b] i hybrydyzuje do tandemowych sekwencji powtórzonych DNA o długości 3.3 kb w *locus* 4q35. Po trawieniu genomowego DNA enzymem restrykcyjnym EcoRI, sonda P13E-11 wykrywa fragmenty o wielkości 50 - 300 kb u zdrowych ludzi i mniejsze od 35 kb u pacjentów z FSHD [Wijmenga i wsp. 1994a, Van Deutekom i wsp. 1993]. Fragmenty o długości mniejszej niż 35 kb powstają w wyniku delecji tandemowych powtórzeń fragmentów DNA w *locus* 4q35. Sonda P13E -11 może hybrydyzować także do fragmentów DNA w *locus* na chromosomie 10 (10q26), ze względu na podobieństwo sekwencji [Deidda i wsp. 1995]. Allele pochodzące z *locus* na chromosomie 10 są eliminowane przez podwójne trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi EcoRI i BlnI [Deidda, Cacurri, Piazza, Felicetti 1996], wobec tego sonda hybrydyzuje tylko do sekwencji DNA w *locus* 4q35.

W tej pracy hybrydyzacja Southerna, składa się z kilku etapów:

1. Trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi: EcoRI i podwójne trawienie EcoRI i BlnI,
2. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelach agarozowych,
3. Przenoszenie fragmentów DNA na filtry nitrocelulozowe metodą Southerna,
4. Hybrydyzacja,
5. Autoradiografia.

1. Trawienie enzymami restrykcyjnymi genomowego DNA:

Reakcja trawienia enzymami restrykcyjnymi została przeprowadzona w objętości 40 μ l. Użyto około 10 μ g genomowego DNA pacjenta.

Składniki reakcji trawienia endonukleazą EcoRI:

- 10 μg genomowego DNA pacjenta,
- 4 μl buforu dla EcoRI (10X) - s.k. 1X,
- 4 μl spermidyny (Sigma) 10X - s.k. 1X,
- 1 μl EcoRI (Boehringer Mannheim), (40 jednostek/1 μl),
- dsH_2O dodano do ostatecznej objętości reakcji - 40 μl .

Składniki reakcji podwójnego trawienia endonukleazami: EcoRI i BlnI:

- 10 μg genomowego DNA pacjenta,
- 4 μl buforu (10X) - s.k. 1X,
- 4 μl spermidyny 10X - s.k. 1X,
- 1 μl EcoRI (>40 jednostek/1 μl),
- 4 μl BlnI (Boehringer Mannheim) (10 jednostek/1 μl),
- dsH_2O dodano do ostatecznej objętości reakcji - 40 μl .

Enzym lub enzymy zostały dodane na końcu, po inkubacji mieszaniny w temp. 37°C, przez 15 min.

Tak przygotowane mieszaniny reakcyjne były inkubowane w temp. 37°C, przez 16 godzin.

Następnie 4 μl mieszaniny reakcyjnej poddawano elektroforezie w 1% żelu agarozowym i buforze 1X TAE (0.04 M Tris, 0.001 M EDTA, buforowane lodowatym kwasem octowym pH - 8.2), pod napięciem 60 V, przez 1.5 godziny, w celu stwierdzenia czy trawienie było kompletne.

2. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelach agarozowych.

Pozostała objętość tj. 36 μl całkowicie strawionego DNA, po dodaniu 4 μl barwnika w 20% roztworze fikolu, poddana została elektroforezie w 0.5% żelu

agarozowym. Standardem wielkości fragmentów DNA był DNA faga λ trawiony enzymem Hind III (λ -Hind III).

Warunki elektroforezy:

- bufor - 1X TAE,
- czas - około 48 godzin,
- napięcie - 16 - 18 V.

Żele barwione były bromkiem etydyny (końcowe stężenie 0.5 μ g/ml). Żele oglądano i fotografowano w świetle UV.

3. Przenoszenie fragmentów DNA na filtry nitrocelulozowe metoda Southerna.

DNA w żelach denaturowano w środowisku zasadowym (0.4 M NaOH) przez 30 min. Następnie żele umieszczono na platformie pokrytej bibułą Whatman 17CHR i 3MM (Whatman Ltd) nasączoną wodorotlenkiem sodu. Pojemnik platformy napełniono buforem (0.4M NaOH). Membranę HybondTM-N+ (Amersham) umieszczono na żelu. Dwa nasączone roztworem NaOH arkusze papieru Whatman 3MM umieszczono na membranie. Następnie położono kilka warstw miękkiego papieru i przykryto je płytą z perspexu. Cztery strony żelu otoczono folią. Tak przygotowane żele pozostawiono na 16 godzin.

Po przeniesieniu fragmentów DNA na filtr nitrocelulozowy, filtry płukano w 2x SSC (20x SSC - 3 M NaCl, 0.3 M cytrynian sodu), w celu usunięcia ewentualnych pozostałości fragmentów żelu.

4. Hybrydyzacja sonda P13E-11:

1. znakowanie sondy molekularnej P13E-11 i λ -Hind III,
2. monitorowanie inkorporacji radioaktywności,
3. oczyszczenie sondy i λ - Hind III,

4. hybrydyzacja,

5. płukanie filtrów,

1. Znakowanie sondy P13E-11 i λ -Hind III wykonano metodą wydłużania startera (ang: primer extension), przy użyciu zestawu Megaprime Labelling System (Amersham):

Składniki mieszaniny reakcji :

- 50 - 100 ng DNA sondy (w objętości 1 - 2 μ l), lub 50 - 100 ng λ - Hind III,
- 3 μ l buforu (10X) - s.k. 1X,
- 3 μ l oligonukleotydów (10X) - s.k. 1X,
- 1 μ l fragmentu Klenowa polimerazy I DNA,
- 3 μ l [α^{32} P] dCTP (10 μ Ci/ 1 μ l), o aktywności specyficznej 3000 Ci/mmol,
- sdH₂O, dodano do ostatecznej objętości 30 μ l.

Denaturacja DNA sondy zachodziła w temp. 99°C przez 3 min. Następnie sondę umieszczono w lodzie. Dodano bufor, oligonukleotydy, fragment Klenowa polimerazy I DNA (Amersham) i [α^{32} P] dCTP (Amersham). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 37°C przez 14 godzin.

2. Monitorowanie inkorporacji radioaktywności:

Inkorporację radioaktywności sprawdzono mierząc ilość znakowanego DNA strąconego 5% TCA (kwas trójchlorooctowy) na filtrach szklanych.

3. Oczyszczanie sondy molekularnej i λ -Hind III:

Sondę oczyszczano przy pomocy kolumny NICKTM (Pharmacia Biotech) zgodnie z załączoną do niej instrukcją.

4. Hybrydyzacja:

Filtry umieszczono w butlach hybrydacyjnych z 30 ml - 40 ml roztworu prehybrydacyjnego. Butle inkubowano w temp. 65°C, przez przynajmniej 30 min. Przed dodaniem znakowanej sondy, sonda i standard wielkości fragmentów DNA były denaturowane w temp. 99°C przez 5 min. i chłodzone w lodzie. Hybrydację przeprowadzono w temp. 65°C przez 14 godzin.

5. Płukanie filtrów:

- 2X SSC w 65°C, przez 10 min. - 15 min, dwukrotnie,
- 1X SSC i 0.1% SDS w 65°C, przez 10 min. - 15 min. dwukrotnie,
- 0.5X SSC i 0.1% SDS, w 65°C, przez 10 min. - 15 min,
- 0.1X SSC i 0.1% SDS, w 65°C, przez 10 min. - 15 min.

Po każdym płukaniu monitorowano pozostałości radioaktywności.

5. Autoradiografia:

Filtry zostały pokryte folią plastikową i poddane autoradiografii na 12 godzin do 4 - 7 dni w temp - 80°C., w zależności od intensywności radioaktywnego sygnału.

100x roztwór Denhardt (2% BSA, 2% fikoł, 2% PVP)

roztwór prehybrydacyjny (6.5 ml 20X SSC - s.k 5X, 1.25 ml roztworu Denhardt - s.k 5X, 1.25 ml 10% SDS - s.k. 0.5%, 0.5 µg sonikowany niehomologiczny DNA (ssDNA)/na 25 ml roztworu, dodano 25 ml sdH₂O do ostatecznej objętości 25 ml).

ssDNA zdenaturowano przez ogrzanie do temp. 100 °C (5 min.), chłodzono w lodzie, potem dodano do roztworu prehybrydacyjnego.

SDS - deodecylosiarczan sodu - (Sigma)

BSA - albumina osocza krwi bydłej (ang:bovine serum albumin) - (Sigma)

PVP - poliwinylpyrrolidon (Sigma)

sonda molekularna P13E-11 - wyprodukowana w Department of Medical Genetics, Uniwersytetu w Newcastle

4. 35 Klonowanie fragmentów DNA.

Egzony genu kodującego CANP3 amplifikowano w reakcji PCR. Klonowanie egzonów przeprowadzono zgodnie z protokołem zamieszczonym w „The Ligator plus Ligase kit protocol” (R&D Systems GmbH). Jako wektor do klonowania zastosowano plazmid pTAg. Transformowano bakterie *Escherichia coli* szczep DH1. Selekcję transformantów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

DNA plazmidowy izolowano z wyselekcjonowanych transformantów niosących wektor zawierający sklonowany egzon, zgodnie z protokołem zamieszczonym w „WizardTM Minipreps DNA purification systems protocol” (Promega).

Wyniki

5.1 Wyniki kontrolnych badań klinicznych pacjentów i ich rodzin.

Kontrolne badania kliniczne pacjentów i ich rodzin, przeprowadzono w rok do 12 lat od postawienia rozpoznania LGMD. Pozwoliły one na wyłonienie pacjentów z objawami podobnymi do objawów klinicznych dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej oraz pacjentów, u których dominowały objawy osobnego osłabienia mięśni.

a. Wyłonienie grupy pacjentów z objawami klinicznymi podobnymi do objawów klinicznych dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej (FSHD).

Po kontrolnych badaniach klinicznych polskich pacjentów z 88 rodzin, wyłoniono grupę 16 pacjentów z 13 rodzin (6 przypadków rodzinnych i 7 sporadycznych), o obrazie klinicznym znacznie różniącym się od pozostałych przypadków z zespołami obręczowo - kończynowymi.

Pacjenci z tych 13 rodzin (3 chłopców i 13 kobiet), zostali zdiagnozowani wstępnie jako przypadki dystrofii obręczowo - kończynowej. Pierwsze objawy kliniczne pojawiły się w wieku między 2 a 14 rokiem życia i związane były z osłabieniem mięśni osobnych obręczy biodrowej. W badaniach kontrolnych przeprowadzonych po 3 do 12 latach, od postawienia rozpoznania, u chorych tych obserwowano pewne cechy kliniczne charakterystyczne dla dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej. Stwierdzano mianowicie znaczne osłabienie mięśni obręczy barkowej i łopatek, powodujące tworzenie się trójkąta nadobojczykowego (tzw: „terasowanie” łopatek), po odwiedzeniu kończyn górnych do poziomu. Nie stwierdzano jednakże osłabienia mięśni twarzy. Sześć pacjentek przestało samodzielnie chodzić w wieku pomiędzy 18 a 27 rokiem życia. W pozostałych przypadkach przebieg jest względnie łagodny.

W badaniu EMG i biopsji mięśniowej ujawniono obecność cech uszkodzenia pierwotnie mięśniowego we wszystkich przypadkach.

Badanie EKG wykonano u 14 pacjentów. Dyskretne zmiany stwierdzono u 5 chorych. Miały one charakter: niemiarywości zatokowej, utrudnienia przewodzenia śródkomorowego, niespecyficzných zmian ST - T, zupełnego lub niezupełnego bloku prawej odnogi pęczka Hisa.

Aktywność kinazy kreatynowej w tej grupie chorych była podwyższona od 4 do 93 razy w stosunku do wartości prawidłowych.

W tych rodzinach, ze względu na wyżej opisany obraz kliniczny, uznano za konieczne wykonanie molekularnej diagnostyki różnicowej pomiędzy LGMD i dystrofią twarzowo - łopatkowo - ramieniową.

W toku dalszych badań wykazano niejednorodność genetyczną tej grupy pacjentów.

b. Pacjenci z objawami ksobnej miopatii:

U pacjentów z 75 rodzin obserwowano postępujące osłabienie mięśni, o rozkładzie zespołu obręczowo - kończynowego. Grupa tych chorych jest niejednorodna, zarówno pod względem wystąpienia pierwszych objawów (2-36 r.ż.) jak i ciężkości przebiegu choroby.

5.2 Ujednolicenie grupy rodzin z rozpoznaniem LGMD.

Badania mające na celu ujednolicenie grupy pacjentów, z uprzednio rozpoznaną dystrofią obręczowo - kończynową dokonano aby wyłączyć przypadki innych dystrofii mięśniowych postępujących.

5. 21 Wyłączenie dystrofinopatii:

Badaniom poddano pacjentów z 88 rodzin (z całości materiału - 106 rodzin). Celem wyłączenia dystrofinopatii wykonano analizę DNA (wyłączenie delecji w Xp21) lub/i badanie dystrofiny mięśniowej.

- w 40 rodzinach, dystrofinę oceniono jako prawidłową (ryc. 5.2), a analiza DNA nie wykazała delecji genu dystrofiny* - ci pacjenci pozostali w grupie LGMD,
- wyłoniono 30 rodzin z dystrofinopatiami,
- w 18 rodzinach nie wykazano delecji genu dystrofiny, a pacjenci nie wyrazili zgody na wykonanie ponownej biopsji z oceną dystrofiny mięśniowej**.

* nie badano mutacji punktowych.

** te 18 rodzin nie jest brane pod uwagę w rozdziale wyniki 5.21

5.21 Wyłączenie dystrofinopatii z grupy rozpoznanej jako dystrofia obręczowo - kończynowa.

Zbadano pacjentów z 88 rodzin polskich, u których rozpoznanie dystrofii obręczowo - kończynowej, postawione zostało w większości przypadków przed wprowadzeniem do diagnostyki metod biologii molekularnej. W 18 rodzinach nie wykazano delecji genu dystrofiny, natomiast pacjenci nie wyrazili zgody na wykonanie ponownej biopsji mięśniowej. Wobec tego, rodziny te nie są brane pod uwagę w dyskusji w niniejszym rozdziale.

Badania: ocena dystrofiny mięśniowej i analiza DNA w celu wykrycia delecji w genie dystrofiny, umożliwiły zrewidowanie uprzednio postawionego rozpoznania LGMD, i w efekcie, wyeliminowanie 30 rodzin z dystrofinopatiami (42.8%), z grupy 70 rodzin, z uprzednio postawionym rozpoznaniem LGMD.

Dystrofinopatie stwierdzono (tabela 5.1):

- u 25 chłopców - 19 przypadków sporadycznych i 3 rodzinne,
- u 8 kobiet - 7 przypadków sporadycznych i 1 rodzinny.

Przypadki dystrofii mięśniowej związanej z mutacją genu dystrofiny stwierdzono u mężczyzn z 22 rodzin. Pierwotne rozpoznanie LGMD zostało zmienione na podstawie wyników badań: dystrofiny mięśniowej lub/i analizy DNA. Delecje genu dystrofiny stwierdzono w 14 spośród 22 rodzin (tabela 5.2, ryc.5.3). Wykryte delecje dotyczą w większości przypadków egzonów zlokalizowanych w końcu 3` genu dystrofiny i nie powodują przesunięcia fazy odczytu (poza przypadkiem 2 i 13, tab. 5.2 i 5.3). W pozostałych przypadkach nie wykryto delecji, więc prawdopodobna jest obecność mutacji punktowych (nie badanych).

Grupa	dystrofinopatie		
	K	M	razem
Płeć			
Liczba pacjentów	8	25	33
Wiek zachorowania	2 - 8	2 - 36	2 - 36
II < 90	3	5	8
Zmiany w EKG	3	11	14
Przerost mięśni	7	19	23
Wiek unieruchomienia	10	14-25	10-25
Liczba chorych chodzących	nie 1	3	4

Tabela 5.1 Dystrofinopatie wyłączone z LGMD.
 II - iloraz inteligencji.

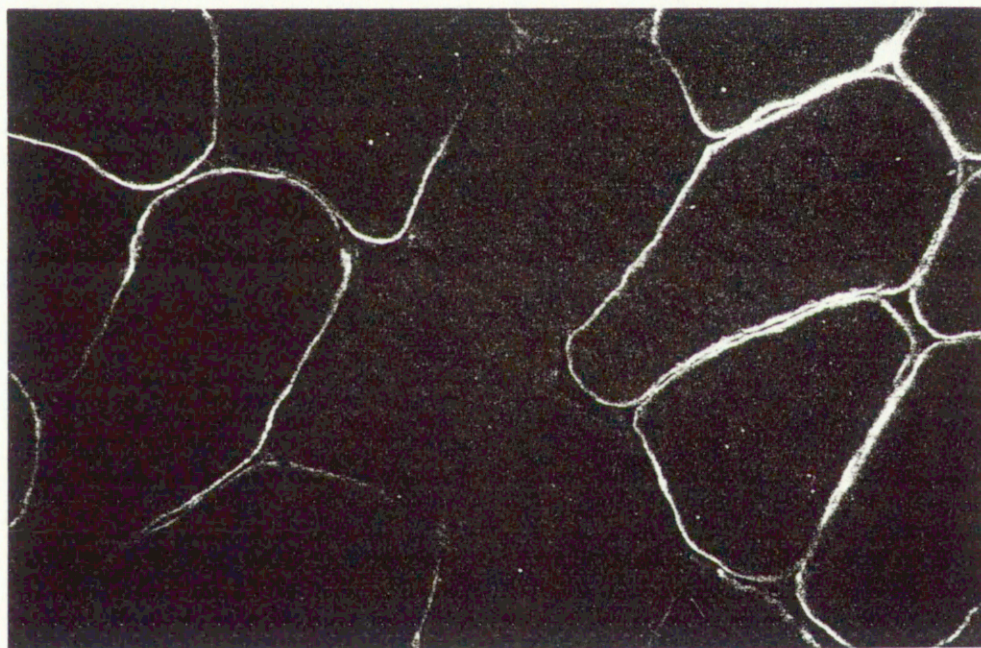
Rozpoznanie u tych pacjentów postawiono na podstawie badania dystrofiny w biopsji mięśniowej. Za pomocą przeciwciał monoklonalnych przeciwko dystrofianie 60 kD i 10 kD, w większości przypadków wykazano obecność dystrofiny przerywanej na obwodzie włókien mięśniowych (ryc. 5.1b).

W 10 rodzinach stwierdzono delecje dotyczące końca 3' genu dystrofiny. W 6 na 14 stwierdzonych delecji, delecja dotyczyła egzonów 45 - 47 (tab 5.2, ryc. 5.3). U chorych, u których wykazano delecję o jednakowej rozległości, wykazano różny ciężar cząsteczkowy dystrofiny oraz różną jej procentową zawartość w mięśniach. Przebieg kliniczny u tych pacjentów (6, 7, 8, 12, 14, 21 w tab. 5.3) - był na ogół łagodny, zakwalifikowano ich do grupy I - IV według oceny stanu funkcjonalnego w skali Archibalda i Vignosa [Archibald i Vignos 1959].

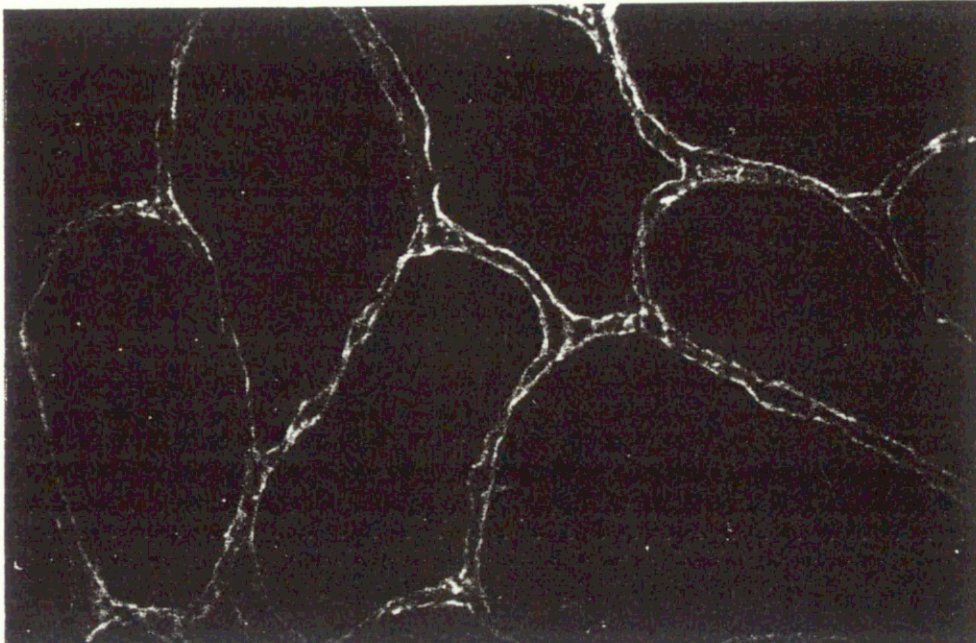
U sześciu chorych kobiet (tab. 5.2 i 5.4) (1 przypadek rodzinny i pięć sporadycznych), rozpoznano objawowe nosicielstwo, na podstawie analizy dystrofiny mięśniowej, przy prawidłowym kariotypie. W 5 - ciu przypadkach w badaniu immunofluorescencyjnym stwierdzono charakterystyczną mozaikę dystrofiny tzn: obok włókien z zachowaną dystrofiną, obecne były włókna jej pozbawione (ryc. 5.1a), w jednym przypadku dystrofinę cienką. U 6 pacjentek kariotyp oceniono jako prawidłowy. W przypadku rodzinnym (26), u chorego brata (26a, 26M) pacjentki, rozpoznano DMD (tab. 5.2 i 5.4). Analiza DNA nie wykazała delecji genu dystrofiny.

U dwóch kobiet z dystrofią mięśniową postępującą (przypadek 31 i 32 - tab. 5.2 i 5.4), stwierdzono nieprawidłową dystrofinę, a ocena kariotypu ujawniła translokacje części chromosomu X na chromosom autosomalny: 2, a w drugim przypadku na 22, z punktem przełamania w miejscu Xp21.

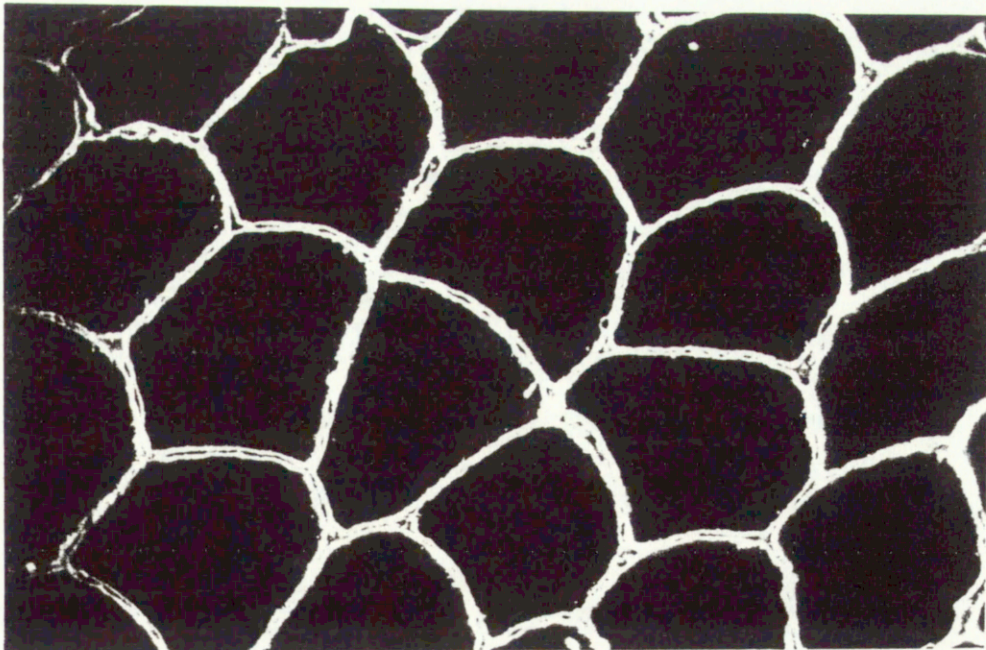
W tabeli 5.2 przedstawione są przypadki dystrofinopatii oraz wykryte delecje, z uwzględnieniem wyników analizy dystrofiny mięśniowej.



Ryc. 5.1a. Mięsień czworogłowy uda. Objawowa nosicielka. Immunofluorescencja. Monoklonalne przeciwciała przeciwko dystrofinie 60 kD. Typowa mozaika: obok włókien z zachowaną dystrofiną widoczne są włókna pozbawione dystrofiny $\times 448$.



Ryc. 5.1b. Mięsień czworogłowy uda. Dystrofia mięśniowa Beckera. Immunofluorescencja. Monoklonalne przeciwciała przeciwko dystrofynie 60 kD. Dystrofina cienka i przerywana $\times 448$.



Ryc. 5.2. Mięsień czworogłowy uda. Norma. Immunofluorescencja . Monoklonalne przeciwciała przeciwko dystrofynie 60 kD. Włókna mięśniowe z prawidłowo zachowaną dystrofina $\times 448$.

Dystrofinopatie mężczyzn

Pacjent	IM	WB	Delecja
1	przerywana	-	ns
2	przerywana	369kD-33%	2-11
3	-	-	45-53
4	przerywana	390kD-15%	ns
5	przerywana	400kD-80%	ns
6	przerywana	380kD-50%	45-47
7	przerywana	392kD-13%	45-47
8	przerywana	380kD-50%	45-47
9	-	-	10-25
10	przerywana	385kD-17%	3-16
11	przerywana	358kD-10%	45-49
12	-	-	45-47
13	-	-	3-7
14	-	-	45-47
15	-	-	45-53
17	przerywana	410kD-56%	45-48
18	przerywana	500kD-30%	ns
19	przerywana	360kD-25%	ns
20	przerywana	368kD-11%	ns
21	-	-	45-47
22	przerywana	376kD-53%	ns
23	revertant*		ns

Dystrofinopatie kobiet

Pacjent	IM (10, 60 kD)	Kariotyp	Delecja
24	mozaika	46XX	-
25	mozaika	46XX	-
26	mozaika	46XX	-
26a	brak		ns
27	mozaika	46XX	-
28	mozaika	46XX	-
29	cienka	46XX	-
31	mozaika (40% wł bez dystr)	46,X,t(X;2) (p21.2;p11.2)	-
32	60kD-jest, 10kD-brak	46,X,t(X;22) (p21.2;q11.2)	-

Tabela 5.2 Dystrofinopatie wyłączone z grupy LGMD.

ns-nie stwierdzono,

- nie badano,

IM-badanie immunofluorescencyjne dystrofiny mięśniowej,

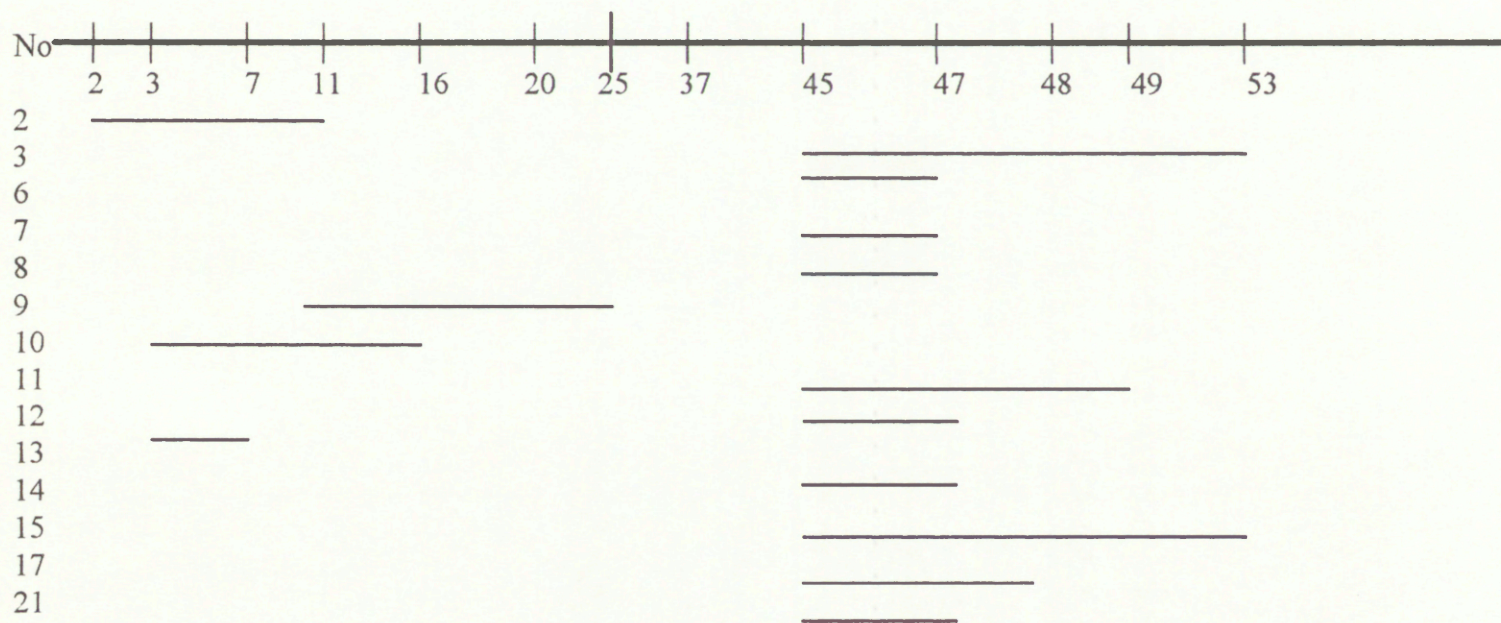
WB - badanie metodą „western” dystrofiny mięśniowej,

26a, - brat objawowej nosicielki.

kD - kilo Dalton

*zachowano angielską nazwę ze względu na brak polskiego odpowiednika

Egzony genu dystrofiny.



Ryc 5.3: Delecje egzonów genu dystrofiny w przypadkach dystrofinopatii, wyłączonych z grupy uprzednio rozpoznanej jako LGMD (No-numer pacjenta).

Dystrofinopatie mężczyzn.

Na podstawie obrazu klinicznego, w korelacji z wynikami analizy DNA i immunochemicznej oceny dystrofiny mięśniowej, w grupie tych chorych rozpoznano: w jednym przypadku dystrofię mięśniową Duchenne'a, w trzech rodzinach postać pośrednią, a w pozostałych osiemnastu rodzinach dystrofię mięśniową typu Beckera.

Wiek zachorowania wahał się między 2 a 36 r.ż. Pierwszymi objawami były: w 19 przypadkach - trudności w chodzeniu i łatwe przewracanie się, u 4 pacjentów - tendencja do chodzenia na palcach, u jednego chorego - bóle łydek i kurcze mięśni po wysiłku. Nie obserwowano asymetrycznego osłabienia mięśni.

Stan kliniczny chorych oceniano w skali Archibalda i Vignosa [Archibald i Vignos 1959] i jest on przedstawiony w stopniach ciężkości, w tabeli 5.3. U pacjenta nr. 5 - nie stwierdzono osłabienia mięśni. U 20 chorych przebieg kliniczny oceniano jako łagodny (st. I - IV). U 4 pacjentów przebieg był cięższy (VII i V st.). U trzech z nich (4, 13 i 18, w tabeli 5.3) rozpoznano postać pośrednią. Chorzy 7 i 18 przestali samodzielnie chodzić w wieku 20 i 25 lat, u pacjenta 4, przebieg jest cięższy, ale samodzielnie chodzi, chociaż z dużym trudem (V st.). U pacjenta nr. 23, który przestał chodzić w wieku 14 lat rozpoznano DMD.

Rozwój ruchowy we wczesnym dzieciństwie był nieprawidłowy tylko w dwóch przypadkach (4 i 10a), chorzy ci zaczęli samodzielnie chodzić z opóźnieniem w wieku 20 i 15 miesięcy.

Kurcze i bóle mięśni występowały u czterech pacjentów. Przerost mięśni łydek obserwowano u dziewiętnastu chorych, z tego przerost także mięśni dwugłowych i trójgłowych ramion u dwóch chorych (nr. 5 i 20 w tabeli 5.3). Przerostowi

mięśni łydek towarzyszył przerost mięśni czworogłowych ud w trzech przypadkach (nr. 5, 19 i 20).

Pogłębienie lordozy lędźwiowej obserwowano w 12 przypadkach, a odstawianie łopatek w 13.

Wrodzoną wadę serca stwierdzono u jednego chorego (nr.9), u pacjenta nr. 13 - szmer skurczowy nad wszystkimi ujściami (został skierowany do dalszej diagnostyki kardiologicznej) natomiast, kardiomiopatię na podstawie badania USG (lewa komora powiększona - 60 mm, o upośledzonej kurczliwości) u pacjenta nr. 22. W badaniach EKG, w 11 przypadkach stwierdzono zmiany o charakterze: niemierności zatokowej, bloku przedniej wiązki lewej odnogi pęczka Hisa, cech przeciążenia lub przerostu lewej komory, wysokich załamków R i T, wąskich i głębokich załamków Q, zaburzeń przewodzenia śródkomorowego, niespecyficznych zmian ST - T. W 10 przypadkach EKG było prawidłowe.

Aktywność CK zawsze przewyższała normę (norma 0-34 IU) od 6 do 191 razy w stosunku do wartości prawidłowych i nie korelowała z ciężkością choroby. W większości przypadków oznaczenie wykonano dwukrotnie. Zaobserwowano obniżenie aktywności CK, wraz z zaawansowaniem procesu chorobowego, natomiast w czterech przypadkach wzrost jej aktywności.

W pięciu przypadkach II (iloraz inteligencji - II) był niższy od 90, natomiast w jednym przypadku (nr.4), rozwój psychiczny był wyraźnie opóźniony, pacjent uczęszcza do specjalnej szkoły (nie badano II).

No	zach	unier	łydki	CK	w.bad	II	EKG	rodz	klinika	komentarz
1	10	-	+	44x 26x	23	-	zm	S	II (36)	kurcze mięśni
2	2	-	+	21x 20x	11	117	bz	S	II (16) III (18)	
3	5	-	-	186x 69x	12	77	bz	S	II (16)	
4	2	-	+/-	131x 40x	12		zm	S	V (16)	
5	6	-	+	52x 66x	8	-	zm	S	0 (15)	kurcze mięśni
6	10	-	+	34x	14	71	zm	R	I (18)	niedosłuch odbiorczy
6a		-	+	23x	21	-	-		I (21)	w rodzinie SMA?
7	2	-	+	34x 24x	12	96	zm	S	I (18)	
8	2	-	+	81x	11	82	zm	S	I (11)	bóle mięśni, 16 l- chodzi
9	4	-	-	61x	7	135	zm	S	I (12)	wrodzona wada serca
10	5	-	-	35x 125x	10	-	zm	R	I (15)	
10a	8	-	+	56x	11	100	bz		II (13)	przyrodni brat 10
11	7	-	+	59x 37x	13	94	bz	S	II (22)	
12	8	-	-	6x 36x	10	114	bz	S	IV (21)	
13	7	20	+	17x 11x	13	103	bz	S	VII (22)	szmer skurczowy
14	2	-	-	191x 171x	15	129	zm	S	II (27)	
15	2	-	+	18x 9x	17	-	zm	S	III (40)	córka, obligatoryjna nosicielka.
17	2	-	+	-	-	-	-	S	II (21)	
18	2	25	+	60x	20	67	bz	R	VII(25)	
18a	5	-	+	-	18	-	-		III (18)	
19	13	-	+	46x 86x	14	-	bz	S	I (15)	
20	36	-	+	11x	44	-	bz	S	I (44)	
21	10	-	+	-	-	-	-	S	III (31)	
22	2	-	+	39x	20	-	zm	S	II (20)	kardiomiopatia bóle mięśni
23	2	14	+	101x 25x	10	84	bz	S	VII (15)	

Tabela 5.3 Dystrofinopatie u chorych płci męskiej, pierwotnie rozpoznanych jako LGMD.

CK - kinaza kreatynowa (x - wielokrotność podwyższenia w stosunku do wartości prawidłowych).
R - przypadek rodzinny, S - przypadek sporadyczny. 6a, 10a, 18a - bracia chorych. W kolumnie „klinika” - liczba oznacza stan kliniczny w skali Archibalda i Vignosa, następna liczba w

Dystrofinopatie kobiet.

Dystrofinopatie wykryto u ośmiu kobiet (tabela 5.4); 7 przypadków sporadycznych i jeden rodzinny. Na podstawie badania dystrofiny mięśniowej, przy prawidłowym kariotypie, w sześciu przypadkach wykazano objawowe nosicielstwo DMD, natomiast w dwóch przypadkach dystrofię mięśniową, będącą rezultatem aberracji chromosomalnych (tabela 5.2). Pierwszymi objawami klinicznymi były trudności w chodzeniu w 5 - ciu przypadkach, u pacjentki 24K były to bóle mięśni po wysiłku i tendencja do chodzenia na palcach, u chorej 26K: bóle nóg i trudności w bieganiu, natomiast u 25K przerost mięśni łydek był pierwszym zauważalnym objawem. Stan kliniczny pacjentek oceniano w skali według Archibalda i Vignosa (tabela 5.4). Przebieg ciężki i złośliwy stwierdzono u jednej chorej - 32K, przestała ona samodzielnie chodzić w wieku 10 lat. Rozwój ruchowy w dzieciństwie był nieprawidłowy u czterech pacjentek (27, 26, 29, 32). Zaczęły one samodzielnie chodzić w wieku 15 miesięcy, a pacjentka nr. 29, w wieku 16 miesięcy.

U siedmiu chorych stwierdzono przerost mięśni łydek, w tym także przerost mięśni czworogłowych ud w trzech przypadkach. Odstawanie łopatek obserwowano u dwóch chorych, a pogłębienie lordozy lędźwiowej u czterech pacjentek.

U trzech pacjentek w badaniu Wechslera stwierdzono II niższe niż 90. Nieprawidłowości w badaniu EKG stwierdzono w trzech przypadkach. Były to: cechy przerostu lewej komory, wysokie załamki R, wąskie i głębokie załamki Q, niespecyficzne zmiany ST-T. Aktywność kinazy kreatynowej w surowicy kobiet

była podwyższona od 14 do 207 razy w stosunku do wartości prawidłowych (norma 0-34 IU).

Pacjentka 26K, jest objawową nosicielką, a obraz kliniczny u brata chorej (26M), jest typowy dla DMD (tabela 5.4). W biopsji mięśniowej u 26K stwierdzono mozaikę, u 26M wykazano brak dystrofiny (metoda immunofluorescencyjna), a analiza DNA nie wykazała obecności delecji Xp21 (tabela 5.2).

31K i 32K, to dwa przypadki dystrofinopatii u kobiet, będące wynikiem translokacji części chromosomu X, na autosom z punktem przełamania w miejscu Xp21 (tabela 5.2 i 5.4). U obu pacjentek początek zachorowania miał miejsce we wczesnym dzieciństwie, a ich stan kliniczny w wieku 8 i 10 lat oceniono odpowiednio na I i VII stopień w skali według Archibalda i Vignosa. Występował przerost mięśni łydek, wysoki poziom kinazy kreatynowej, a u pacjentki 32K - II oceniono znacznie poniżej normy. U żadnej z nich nie stwierdzono zmian w badaniu EKG.

No	zach	unieruch.	łydki	CK	wiek bad	II	EKG	rodz	klinika	komentarz
24K	6	-	+	132x 22x	24 30	108	bz	S	II (30)	bóle mięśni po wysiłku
25K	8	-	+	129x	8	-	-	S	I (8)	
26K	6	-	+	35x 243x	7 8	87	zm	R	I (8)	bóle mięśni po wysiłku
26M	6		+	20x 114x	6 7	72	bz		I (7)	
27K	4	-	+	19x 61x	4 5	123	zm	S	0 (5)	
28K	2	-	+/-	67x	9	115	bz	S	I (9)	
29K	2	-	+	76x 50x	9 11	65	zm	S	I (9)	
31K	2	-	+	207x	9	96	bz	S	I (8)	
32K	2	10	+	173x	4	58	bz	S	VII (10)	

Tabela 5.4 Dystrofinopatie wykryte u chłopców płci żeńskiej, uprzednio rozpoznanych jako LGMD.

CK - kinaza kreatynowa (x - wielokrotność podwyższenia w stosunku do wartości prawidłowych).

R - przypadek rodzinny, S - przypadek sporadyczny. 26M - brat objawowej nosicielki. W kolumnie „klinika” - liczba oznacza stan kliniczny w skali Archibalda i Vignosa, a następną liczbą w nawiasie - wiek pacjenta w momencie oceny. zach. - zachorowanie, unieruch. - wiek unieruchomienia, rodz. - rodzinność.

Badania członków rodzin pacjentów z dystrofinopatiami:

Badanie neurologiczne bezobjawowych członków rodzin pacjentów z dystrofinopatiami, nie wykazało istotnych odchyłeń od stanu prawidłowego. Badanie kinazy kreatynowej wykazało wzrost aktywności od 2 do 3 razy w stosunku do wartości prawidłowych, u sześciu kobiet będących siostrami lub matkami chorych mężczyzn.

W 22 rodzinach chorych płci męskiej, u których wykryto dystrofinopatie, była tylko jedna pewna nosicielka, córka pacjenta z dystrofią mięśniową Beckera, (nr. 15 tabela 5.3). Była ona badana w wieku 15 lat, nie stwierdzono osłabienia mięśni, a jedynie przerost mięśni łydek i czworogłowych ud. Aktywność kinazy kreatynowej i aldolazy była prawidłowa. W biopsji mięśnia dwugłowego ramienia wykazano cechy uszkodzenia pierwotnie mięśniowego (różna średnica włókien mięśniowych i włókna ulegające homogenizacji), ponadto mozaikę włókien dystrofino - pozytywnych i włókien o bardzo cienkiej dystrofinie. Badania te umożliwiły rozpoznanie bezobjawowego nosicielstwa dystrofii mięśniowej typu Beckera.

5.22 Wyłączenie przypadków dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej (FSHD) z grupy LGMD.

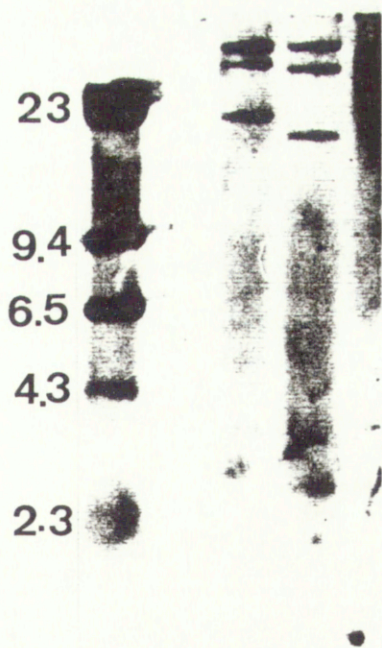
Grupę 15 pacjentów, z 15 rodzin (13 rodzin polskich i 2 z materiału angielskiego) analizowano pod kątem FSHD. Chorych tych wybrano, ze względu na charakterystyczny obraz kliniczny (przedstawiony na str 64 i 65). Wobec tego, uznano za konieczne dokonanie próby molekularnej diagnostyki różnicowej, pomiędzy LGMD i FSHD.

W badaniu tym, kontrolę stanowiło DNA od trzech chorych z FSHD (uprzednio zdiagnozowanych na podstawie badań klinicznych i genetycznych) oraz od sześciu zdrowych osób.

Spośród 15 pacjentów, charakterystyczną dla FSHD delecję w regionie 4q35, stwierdzono tylko u jednego chorego (ryc. 5.5). U pacjenta tego stwierdzono także, homozygotyczną mutację w genie kodującym CANP3 (ryc.5.31).

Na ryc. 5.4 przedstawiony jest charakterystyczny wzór hybrydyzacji, wykrywany przy pomocy sondy molekularnej P13E-11, u pacjenta z uprzednio zdiagnozowaną dystrofią twarzowo - łopatkowo - ramieniową (pozytywna kontrola). Sonda P13E - 11 hybrydyzuje do prążka o wielkości 20 kb, w genomowym DNA strawionym enzymem restrykcyjnym EcoRI. Po podwójnym trawieniu (EcoRI/BlnI), fragment restrykcyjny zmniejsza się o 3 kb, do wielkości 17 kb. Poniżej widoczny jest fragment o wielkości 2.8 kb, należący do chromosomu 10q26.

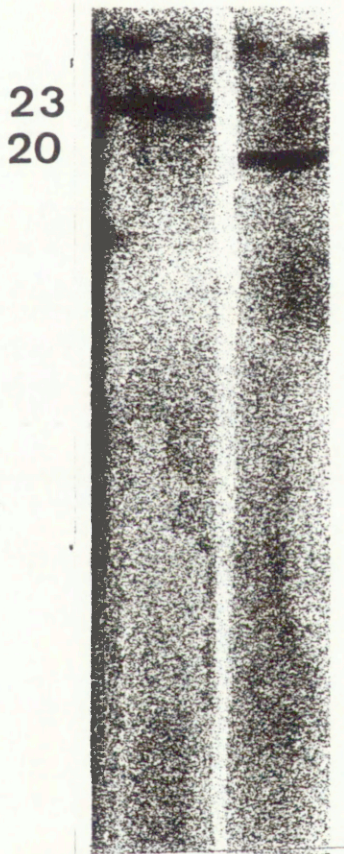
W przypadku zdrowych osób sonda P13E-11 hybrydyzuje do fragmentów DNA o wielkości 50 - 300 kb, które nie rozdzielą się w żelach agarozowych, a jedynie podczas elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym.



Ryc. 5.4 Hybrydyzacja Southerna, u chorego z FSHD (pozytywna kontrola).

- 1 - standard wielkości fragmentów DNA (λ Hind III),
- 2 - genomowy DNA chorego z FSHD strawione EcoRI.
- 3 - genomowy DNA chorego z FSHD strawione EcoRI i BlnI.

U pacjenta P1, stwierdzono charakterystyczny dla FSHD wzór hybrydyzacji. Do DNA strawionego enzymem restrykcyjnym EcoRI, hybryduje sonda P13E - 11, co uwidacznia fragment o długości 23 kb, który następnie ulega zmniejszeniu, po podwójnym trawieniu enzymami EcoRI i BlnI, do 20 kb.



Ryc. 5.5 Hybrydyzacja Southerna u pacjenta P1.
1 - genomowy DNA strawione EcoRI,
2 - genomowy DNA strawione EcoRI i BlnI.

5.3 Rezultaty analizy DNA w ujednocionej grupie pacjentów z LGMD.

Liczba rodzin analizowanych - 76:

- 58 rodzin polskich (po wyłączeniu przypadków mylnie rozpoznanych jako LGMD),
- 18 rodzin pochodzących z materiału angielskiego,

Podsumowanie wyników analizy DNA:

1. Wykazano niejednorodność genetyczną w grupie pacjentów z LGMD (tabela 5.5),
2. Analiza haplotypów umożliwiła wyłączenie LGMD2A w sześciu rodzinach,
2. Na podstawie elektroforezy metodą SSCP/HET, stwierdzono mutacje lub/i polimorfizm w egzonach genu CANP3, u 27 chorych,
3. Niezależne mutacje stwierdzono u 9 chorych na podstawie sekwencjonowania.

5.31 Wykazanie heterogenności locus LGMD w grupie badanych pacjentów na podstawie analizy haplotypów.

Haplotypy określono u 141 osób, z 27 rodzin. (rodowody w załączniku 1).

-17 rodzin z LGMD (86 osób), u których dane dotyczące obecności komponentów DGC były niedostępne*. Rodziny te genotypowano dziewięcioma markerami (pięć *loci*) (tabela 5.6 - 5.8). W rodzinach tych podjęto próbę ustalenia haplotypów w pięciu *loci*.

- 8 rodzin z LGMD (32 osoby), u których dane dotyczące obecności komponentów DGC były niedostępne. Rodziny te genotypowano czterema markerami (dwa *loci*) - próba ustalenia haplotypów w dwóch *loci*.

-2 rodziny (23 osoby) z fenotypem miopatii Miyoshi, genotypowano 3 markerami. Wyniki pozwoliły na uzyskanie wstępnych danych, umożliwiających wyłączenie niektórych rodzin z poszczególnych *loci* (tabela 5.5)

- rodziny: 2, 6, 8, 10, 17, 19, 20, 21, 86, 164, 188 zostały wyłączone z *locus* LGMD2B,

- rodziny: 2, 8, 9, 13, 14, 21 zostały wyłączone z *locus* LGMD2E,

- rodziny: 2, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 17, 21 zostały wyłączone z *locus* LGMD2C,

- rodziny: 7, 10, 12, 13, 17, 21 zostały wyłączone z *locus* LGMD2A,

- rodziny: 6, 8, 9, 16, 21, 162, 164, 200 zostały wyłączone z *locus* LGMD2D.

11 rodzin nie zostało wyłączonych z *locus* LGMD2A. Oznacza to, że pacjenci ci mogą mieć mutacje w genie kalpajny 3, dlatego też w następnym etapie, DNA tych chorych było analizowane w kierunku mutacji CANP3.

* w rodzinach 12 i 18, po wykonaniu genotypowania kilkoma markerami, ustalono, że komponenty kompleksu sarkoglikanowego są obecne w tkance mięśniowej.

Locus	liczba wyłączonych rodzin
LGMD2A	6
LGMD2B	11
LGMD2C	9
LGMD2D	8
LGMD2E	6

Tabela 5.5 Rezultaty analizy haplotypów, wyłączone rodziny z poszczególnych loci.

<i>locus</i>	markery	rodzina 1	rodzina 2	rodzina 5	rodzina 6	rodzina 7
LGMD2B	D2S2109	NI	rekombinanty	NI	nie wyłączona	nie wyłączona
	D2S2111	nie wyłączona	rekombinanty	nie wyłączona	wyłączona	nie wyłączona
LGMD2E	CA12T	NI	rekombinanty	NI	NI	NI
	D4S428	nie wyłączona	rekombinanty	NI	NI	NI
LGMD2C	D13S232	nie wyłączona	rekombinanty	NI	rekombinanty	NI
LGMD2A	D15S779	nie wyłączona	nie wyłączona, w	NI	NI	rekombinanty
	D15S782	nie wyłączona	pełni informatywna	nie wyłączona	NI	
LGMD2D	D17S1319	nie wyłączona	NI	NI	rekombinanty	NI

Tabela 5.6 Wyniki analizy haplotypów.

<i>locus</i>	markery	rodzina 8	rodzina 9	rodzina 10	rodzina 11	rodzina 12
LGMD2B	D2S2109	rekombinanty	nie wyłączona, nie w	rekombinanty	NI	nie wyłączona
	D2S2111	rekombinaty	pełni informatywna	rekombinanty	nie wyłączona	NI
LGMD2E	CA12T	NI	wyłączona	NI		
	D4S428	rekombinanty	nie wyłączona	nie wyłączona		
LGMD2C	D13S232	rekombinanty	rekombinanty	rekombinanty	nie wyłączona	
LGMD2A	D15S779	nie wyłączona	nie wyłączona	rekombinanty	NI	wyłączona
	D15S782	nie wyłączona	nie wyłączona	rekombinanty		NI
LGMD2D	D17S1319	rekombinanty	rekombinanty	nie wyłączona		

Tabela 5.7 Wyniki analizy haplotypów.

Komentarz do tabel 5.6 - 5.9 - na poprzedniej stronie.

*NI - nie informatywna.

<i>locus</i>	markery	rodzina 13	rodzina 14	rodzina 15	rodzina 16	rodzina 17	rodzina 18	rodzina 21
LGMD2B	D2S2109	NI	nie wyłączona	nie wyłączona	NI	wyłączona	nie wyłączona	rekombinanty
	D2S2111	NI	nie wyłączona	nie wyłączona	NI	wyłączona	nie wyłączona	rekombinanty
LGMD2E	CA12T							rekombinanty
	D4S428	rekombinanty	rekombinanty	nie wyłączona	NI	NI	NI	rekombinanty
LGMD2C	D13S232	wyłączona	rekombinanty	nie wyłączona	nie wyłączona	rekombinanty	nie wyłączona	rekombinanty
LGMD2A	D15S779	wyłączona	nie wyłączona	nie wyłączona	NI	NI	nie wyłączona	rekombinanty
	D15S782		nie wyłączona		nie wyłączona	wyłączona	NI	rekombinanty
LGMD2D	D17S1319		nie wyłączona	nie wyłączona	wyłączona	nie wyłączona		rekombinanty

Tabela 5.8 Analiza haplotypów.

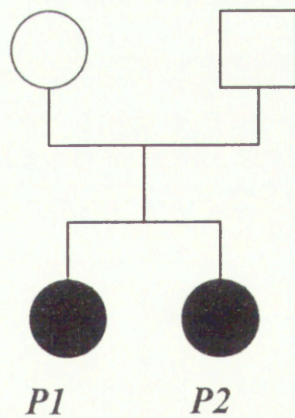
<i>locus</i>	markery	rodzina 19	rodzina 20
LGMD2B	D2S2109	rekombinanty	rekombinanty
	D2S2111	rekombinanty	rekombinanty
	D2S291	NI	rekombinanty

Tabela 5.9 Analiza haplotypów w rodzinach z fenotypem miopatii Miyoshi.

*NI - nie informatywna

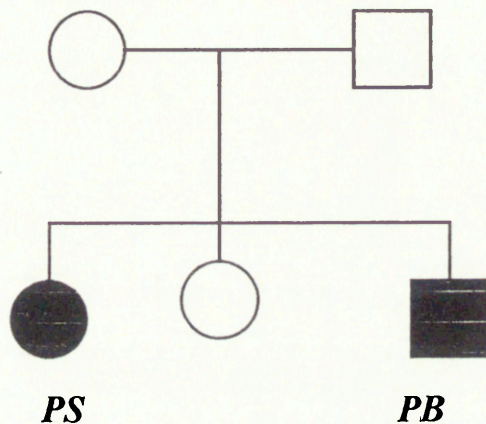
Na ryc. 5.6 pokazany jest wynik analizy haplotypów w rodzinie 2. Wyłączono 3 *loci*, ponieważ u obu chorych stwierdzono różne haplotypy w LGMD2B, 2E, 2C. W LGMD2D, rodzina ta nie była informatywna, wobec czego wyłączenie tego *locus* nie było możliwe. W LGMD2A, rodzina 2, była w pełni informatywna i wykazano, że chorzy mają te same haplotypy, więc zostali oni włączeni do grupy badanej, w kierunku mutacji na chromosomie 15q.

markery	<i>locus</i>	P1	P2	M	O
D2S2109	LGMD2B	14	34	13	24
D2S2111		12	24	14	23
CA12T	LGMD2E	11	23	13	12
D4S428		12	13	23	12
D13S232	LGMD2C	23	13	33	12
D15S779	LGMD2A	33	33	23	13
D15S782		13	13	34	12
D17S1319	LGMD2D	12	12	12	12



Ryc. 5.6 Rodzina 2, rodowód i haplotypy.
P1, P2 - pacjenci,
M - matka, O - ojciec.

Dla markerów: D2S2109 i CA12T rodzina nr. 1 nie była informatywna (ryc. 5.7 i 5.8). W rodzinie tej nie udało się wyłączyć żadnego z badanych *loci* (ryc. 5.7). Chorych jednak nie włączono do grupy pacjentów, w której poszukiwano mutacji w genie kodującym CANP3, ponieważ w rodzinie tej stwierdzono mutację w genie dla α - sarkoglikanu (Pogue 1995-1998).

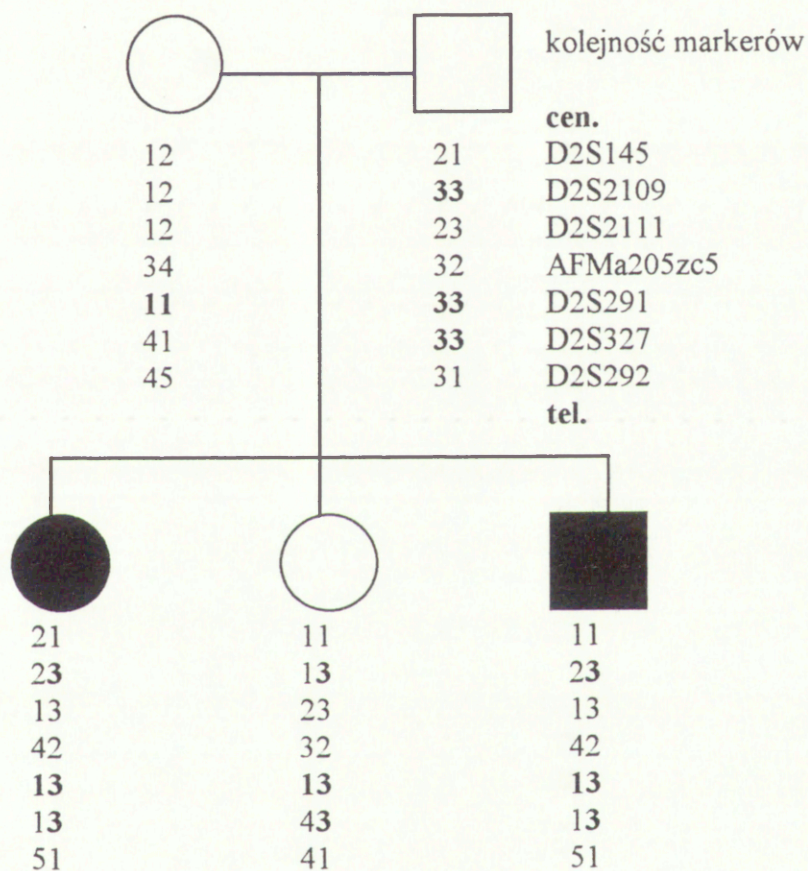


markery	locus	PS	PB	S	M	0
D2S2109	LGMD2B	23	23	13	12	33
D2S2111		13	13	23	12	23
CA12T	LGMD2E	11	11	11	11	11
D4S428		12	12	33	23	13
D13S232	LGMD2C	33	33	13	13	23
D15S779	LGMD2A	34	34	12	14	23
D15S782		34	34	12	13	24
D17S1318	LGMD2D	13	13	23	13	12

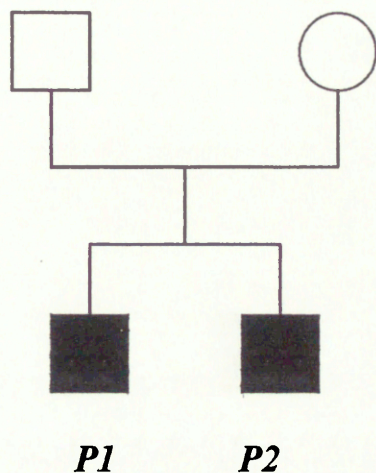
Ryc. 5.7 Rodzina 1, rodowód i haplotypy.

Haplotypy każdego członka rodziny 1, w *locus* LGMD2B (ryc. 5.8). Sposób dziedziczenia jest autosomalnie recesywny. Każdy allel użytych markerów jest przedstawiony jako numer. Ustalenie, który chromosom zawiera recesywny allel genu LGMD2B, wynika z faktu, że każdy chory musi mieć dwa recesywne allele genu. Wytłuszczonym drukiem zaznaczono nieinformatywne markery.

Ryc. 5.8 Haplotypy rodziny 1.
 cen - centromer
 tel - telomer



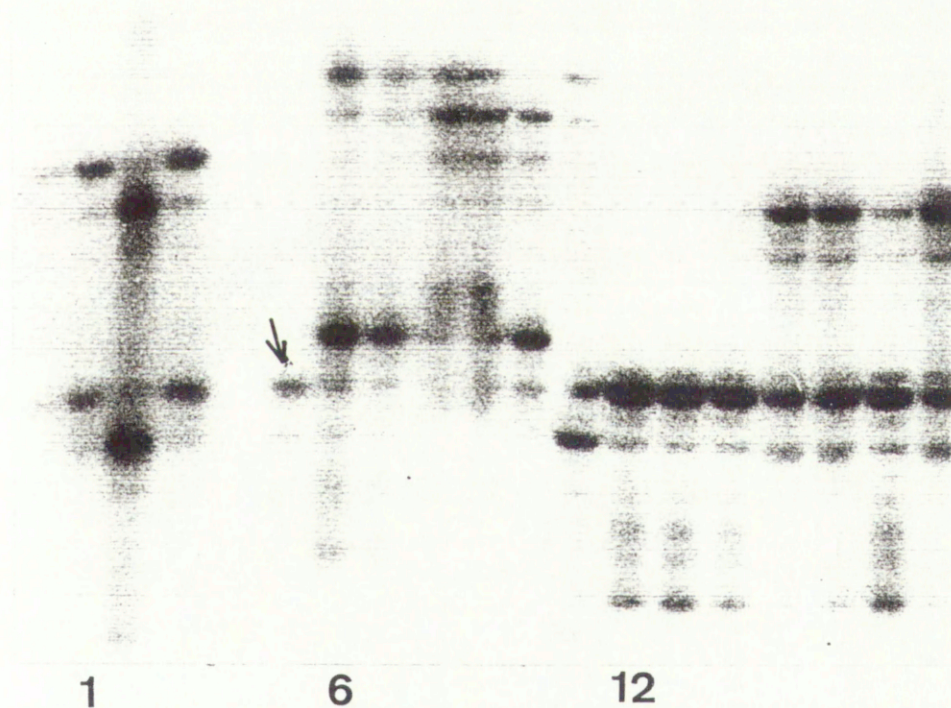
Rodzina 5 nie była informatywna dla żadnego z testowanych markerów, poza D15S782 i D2S2111. Rodziny tej nie wyłączono z żadnego z badanych *loci*.



markery	<i>locus</i>	P1	P2	M	O
D2S2109	LGMD2B	23	23	13	22
D2S2111		12	12	12	13
CA12T	LGMD2E	22	22	22	12
D4S428		11	11	11	12
D13S232	LGMD2C	12	12	11	12
D15S779	LGMD2A	14	14	14	11
D15S782		23	23	12	13
D17S1319	LGMD2D	33	33	33	34

Ryc. 5.9 Rodowód i haplotypy rodziny 5.

Na ryc. 5.10 przedstawiony jest przykład genotypowania rodzin 11, 12, 13 markerem D15S799. Analiza ta nie pozwoliła na wyłączenie rodziny 11 z *locus* LGMD2A, chociaż rodzeństwo chore i zdrowe posiada te same allele, ponieważ rodzina nie jest informatywna, ze względu na homozygotyczność ojca (strzałka). Rodzina 12 i 13 została wyłączona z tego *locus*, ponieważ zarówno chore jak i zdrowe rodzeństwo ma te same haplotypy i rodziny są w pełni informatywne.



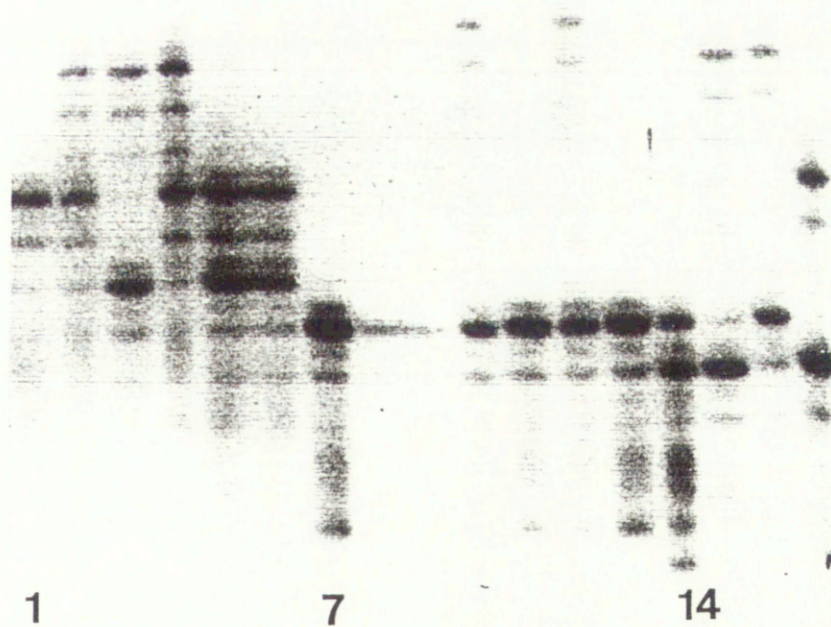
Ryc. 5.10: Genotypowanie rodzin: 11, 12 i 13 markerem D15S779.

Rodzina 11 (1-5), członkowie rodziny w kolejności: P, S1, S2, M, O. DNA matki pacjenta (ścieżka 4) nie uległo amplifikacji.

Rodzina 12 (6-11): P, B, S (8,9), M, O.

Rodzina 13 (12-18): P1, P2, B1, B2, B3, M, O.

Na ryc. 5.11 pokazano rezultaty analizy rodzin 15, 16, 10, genotypowanych markerem D15S779. Rodzina 15 jest w pełni informatywna dla D15S779 i nie została wyłączona z *locus* LGMD2A (chore rodzeństwo posiada inne allele niż zdrowe). Rodzina 16 nie mogła być wyłączona mimo, że rodzeństwo zdrowe i chore ma te same allele, ponieważ rodzina ta nie jest w pełni informatywna. Genotypowanie markerem D15S782, także nie pozwoliło na wyłączenie jej z LGMD2A *locus*. Wobec tego, pacjenci z tych rodzin zostali włączeni do grupy analizowanej w kierunku mutacji w genie dla CANP3. Rodzina 10 została wyłączona z *locus* LGMD2A, ze względu na stwierdzenie rekombinantów przy genotypowaniu z oboma markerami: D15S779 i D15S782.



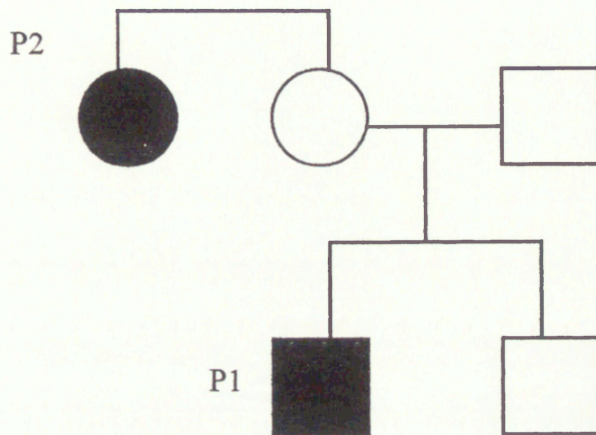
Ryc. 5.11 Genotypowanie rodzin 15, 16, 10 markerem D15S799

Rodzina 15 (1-6) członkowie rodziny przedstawieni są w kolejności: P, S1, S2, M, O (5,6).

Rodzina 16 (7-13) P, S1(8,9), S2, S3, M, O.

Rodzina 10 (14-17) P1, P2, M, O.

Rodzina 86. DNA pacjentki P2 nie było dostępne. Rodzina ta została wyłączona z LGMD2B, ponieważ u pacjenta i u jego zdrowego brata wykazano te same haplotypy w tym *locus*. Rodzina nie została wyłączona z LGMD2D (u P1 i B stwierdzono różne allele w tym *locus*)



Marker	locus	P1	B	M	O
D2S2111	LGMD2B	26	26	36	26
AFMa205zc5	LGMD2B	23	23	12	34
D2S2109	LGMD2B	11	11	12	12
D17S1319	LGMD2D	23	12	23	13

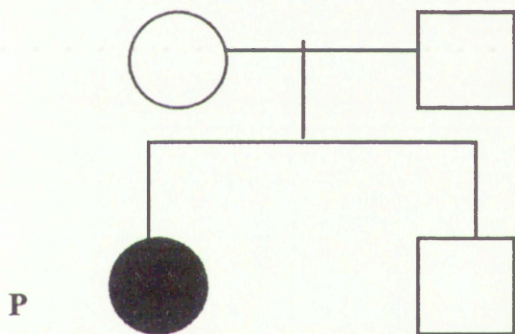
Ryc. 5.12. Rodzina 86, genotypowanie markerami ściśle sprzężonymi z locus LGMD2B i LGMD2D.

W rodzinach 188, 208, 162 jest tylko jedna chora.

Rodzina 188 nie jest w pełni informatywna dla markerów D2S2109, AFMa205zc5 i D17S1319 ze względu na homozygotyczność ojca. Dla markera D2S2111 jest w pełni informatywna i allele w LGMD2B u chorej i zdrowego brata są jednakowe. Na podstawie tylko jednego markera nie można jednak z całą pewnością wyłączyć tej rodziny z *locus* 2B.

W rodzinie 208 nie badano alleli matki. Uzyskane haplotypy i allele w LGMD2B i 2D nie pozwoliły na wyłączenie rodziny 208 z tych *loci*.

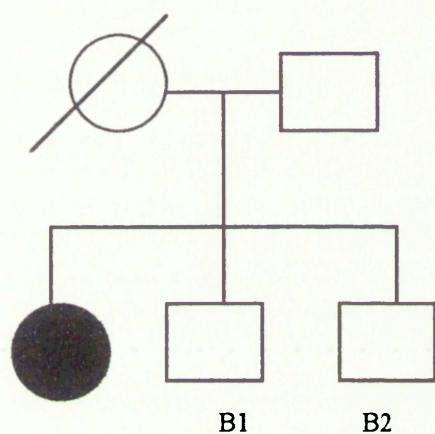
Rodziny 162 nie wyłączono z LGMD2B (różne haplotypy dla pacjentki i jej zdrowego brata), natomiast wyłączono ją z dużym prawdopodobieństwem z LGMD2D.



Marker	locus	rodzina	P	B	M	O
D2S2111	LGMD2B	188	36	36	23	36
AFMa205zc5	LGMD2B		34	34	14	33
D2S2109	LGMD2B		14	14	16	44
D17S1319	LGMD2D		22	22	12	22
D2S2111	LGMD2B	208	56	36	-	36
AFMa205zc5	LGMD2B		13	12	-	15
D2S2109	LGMD2B		16	16	-	12
D17S1319	LGMD2D		14	13	-	34
D2S2111	LGMD2B	162	36	23	36	26
AFMa205zc5	LGMD2B		33	23	23	36
D2S2109	LGMD2B		34	33	34	34
D17S1319	LGMD2D		13	13	13	12

Ryc. 5.13 Rodziny 188, 208, 162 - genotypowanie markerami ściśle sprzężonymi z locus LGMD2B i 2D.

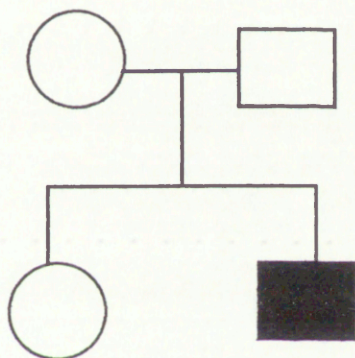
Rodzina 186 jest niekompletna - brak DNA od ojca i drugiego brata pacjentki utrudnia interpretację wyników. W sytuacji takiej, że jedno z rodziców było homozygotą w *locus* 2B, rodzina ta byłaby nieinformatywna dla analizowanych markerów. Dlatego rodziny tej nie można wyłączyć z LGMD2B. Nie można jej także z całą pewnością wyłączyć z *locus* 2D.



Marker	locus	P	0	B1	B2
D2S2111	LGMD2B	33	-	33	-
AFMa205zc5	LGMD2B	33	-	33	-
D2S2109	LGMD2B	44	-	44	-
D17S1319	LGMD2D	24	-	34	-

Ryc. 5.14. Przykład genotypowania rodziny 186, markerami ściśle sprzężonymi z LGMD2B i 2D locus.

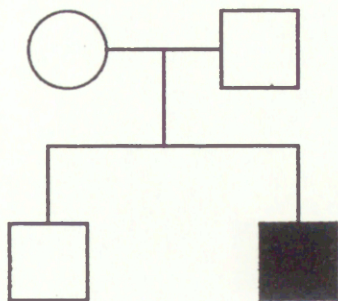
Rodzina 164. Dla markerem D2S2111 rodzina jest nieinformatywna ze względu na homozygotyczność matki, dla D2S2109 jest ona także nieinformatywna, ponieważ oboje rodzice mają te same allele dla badanego markera. Dla AFMa205zc5, chory i zdrowa siostra mają te same allele, co mogłoby przemawiać za wyłączeniem tej rodziny z *locus* 2B. Rodzina 164 może być wyłączona z *locus* 2D, ponieważ rodzeństwo zdrowe i chore ma te same allele.



Marker	locus	P	M	O	S
D2S2111	LGMD2B	35	33	56	35
AFMa205zc5	LGMD2B	34	23	34	34
D2S2109	LGMD2B	34	34	34	34
D17S1319	LGMD2D	14	12	34	14

Ryc. 5.15. Przykład genotypowania rodziny 164 markerami ściśle sprzężonymi z LGMD2B i 2D locus.

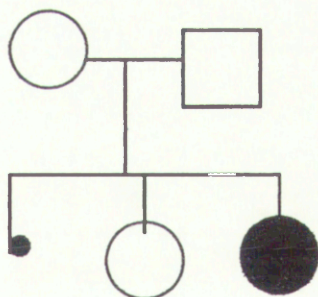
Rodzina 200. Rodzina ta nie została wyłączona z *locus* 2B, mimo genotypowania trzema markerami. Przy pomocy markera wewnątrzgenowego - D17S1319 została wyłączona z *locus* 2D.



Marker	locus	P	M	O	B
D2S2111	LGMD2B	46	34	66	36
AFMa205zc5	LGMD2B	56	35	16	13
D2S2109	LGMD2B	24	26	44	46
D17S1319	LGMD2D	12	13	24	12

Ryc. 5.16 Genotypowanie rodziny 200 markerami ściśle sprzężonymi z *loci* 2B i 2D.

Rodzina 187 nie została wyłączona z obu *loci*: 2B i 2D. Nie jest ona informatywna dla markera D2S2111, ze względu na homozygotyczność ojca.

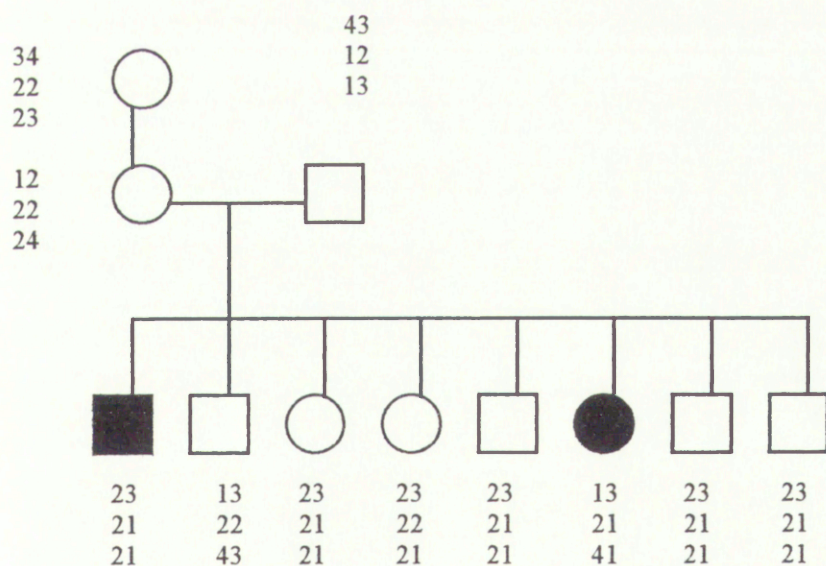


Marker	locus	P	S	M	O
D2S2111	LGMD2B	36	36	33	66
AFMa205zc5	LGMD2B	24	23	24	23
D2S2109	LGMD2B	67	57	77	56
D17S1319	LGMD2D	23	14	12	34

Ryc. 5.17. Przykład genotypowania rodziny 187, markerami ściśle sprzężonymi z LGMD2B i 2D locus.

Miopatia Miyoshi (MM), została przypisana do *locus* LGMD2B na chromosomie 2p13. Uważa się, że LGMD2B i MM mogą być allelicznymi wariantami tego samego genu [Bejaoui i wsp. 1995, Bashir i wsp. 1996]. Dwie rodziny z fenotypem MM, analizowano markerami ściśle sprzężonymi z LGMD2B, aby ustalić czy mapują się one do tego miejsca genomowego,

Rodziny 19 i 20 o fenotypie miopatii Miyoshi analizowano markerami D2S2109, D2S2111 i D2S291, ściśle sprzężonymi z 2p13. W rodzinie 19 stwierdzono obecność rekombinantów w analizie dwoma markerami. Dla D2S291, rodzina ta nie była informatywna.

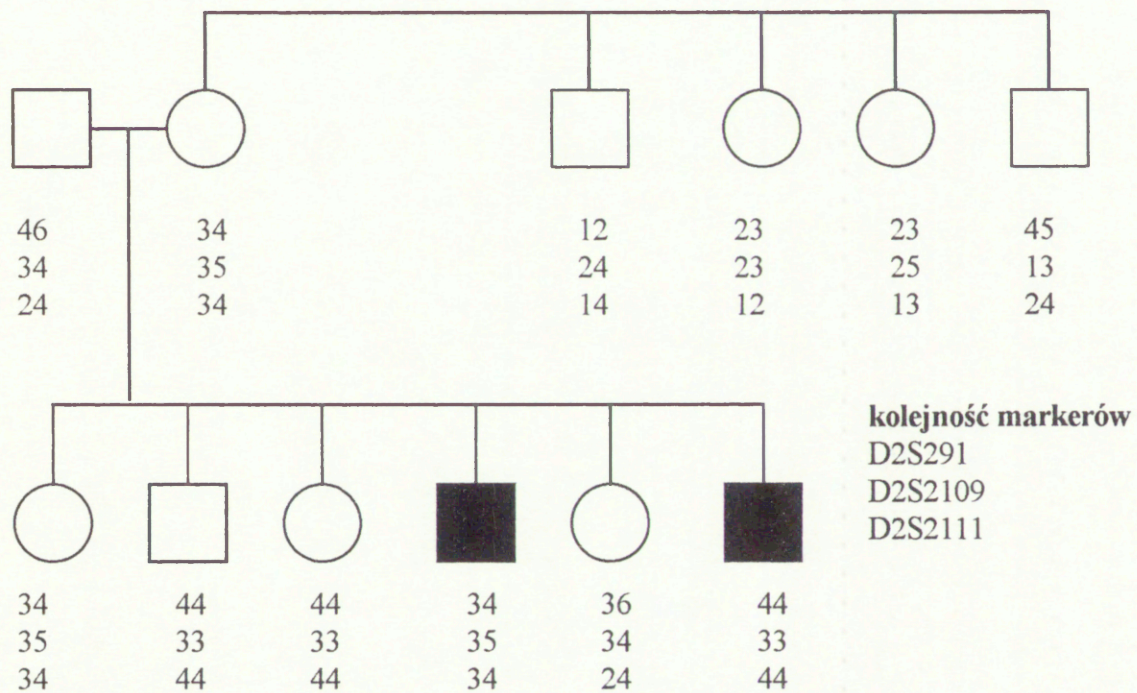


Kolejność markerów: D2S2109
D2S291
D2S2111

Ryc. 5.18 Rodzina 19 - haplotypy.

Rodzina 20

W rodzinie 20 wykazano obecność rekombinantów w analizie trzema markerami.



Ryc. 5.19 Haplotypy rodziny 20, w *locus* LGMD2B.

5.32 Wyniki analizy polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA i analizy heterodupleksów.

Ustalenie warunków amplifikacji poszczególnych egzonów genu CANP3.

Zanim przystąpiono do analizy SSCP/HET, ustalono warunki amplifikacji poszczególnych egzonów genu kodującego CANP3, tak aby uzyskać pełną specyficzność reakcji. Jest to niezbędnym warunkiem dla analizy SSCP/HET. Warunki amplifikacji zostały ustalone dla wszystkich egzonów poza: 13, 17, 18 i PA* (tabela 5.10), w których dostosowywanie temperatury asocjacji starterów (AT), końcowego stężenia jonów Mg^{2+} i dNTPs nie zredukowało niespecyficznej amplifikacji.

SSCP i HET zastosowano w pierwszym etapie poszukiwania mutacji w genie kodującym CANP3. Grupa badana składała się z 49 chorych. Badania wykonano na przykładzie analizy wybranych egzonów genu kalpiny, kodujących domenę II białka, uwzględniając wstępne dane, świadczące o dość częstym występowaniu w nich mutacji [Richard i wsp. 1995]. Analizowano 8 egzonów, co stanowi około 30% sekwencji kodującej badanego genu. U 27 pacjentów stwierdzono zmienioną ruchliwość elektroforetyczną prążków w żelach (tabela 5.11).

Na podstawie danych uzyskanych metodą SSCP/HET, u pięciu pacjentów stwierdzono zmiany wzorca migracji w dwóch egzonach genu CANP3 (złożone heterozygoty, tabela 5.12). Za zmianę wzorca migracji uważano, zmianę szybkości poruszania się prążka w żelu lub pojawienie się dodatkowych prążków. Po stwierdzeniu takiej zmiany (w porównaniu z ruchliwością elektroforetyczną DNA kontrolnego od zdrowych osób np. ryc. 5.20), próbkę DNA poddawano

egzon	AT°C	MgCl ₂ o.s.
promotor	59	
1	59	
2	52	
3	58	
4	56	
5	56	
6	56	
7	53	
8	57	
9	56	
10	56	
11	56	
12	61	
13*	54	2 mM
14	55	
15	57	
16	57	
17*	48	
18*	48	2 mM
19	57	
20/21	60	
22	50	
22/23	60	
24	54	
P.A*	45	3 mM

Tabela 5.10 Warunki amplifikacji egzonów genu CANP3. Stężenie magnezu pokazano w przypadkach, kiedy zostało zmienione, w pozostałych standardowe stężenie 1.5 mM było wystarczające. *P.A.- sekwencja sygnału poliadenylacji. AT - temperatura asocjacji starterów.

egzon	1	2	3	4	5	6	9	10
długość produktu PCR (nts)	438	239	354	292	325	315	173	251
liczba zmian ruchliwości	0	2	1	24	3	1	0	0

Tabela 5.11. Liczba zmian ruchliwości prążków, stwierdzonych metodami SSCP i HET.

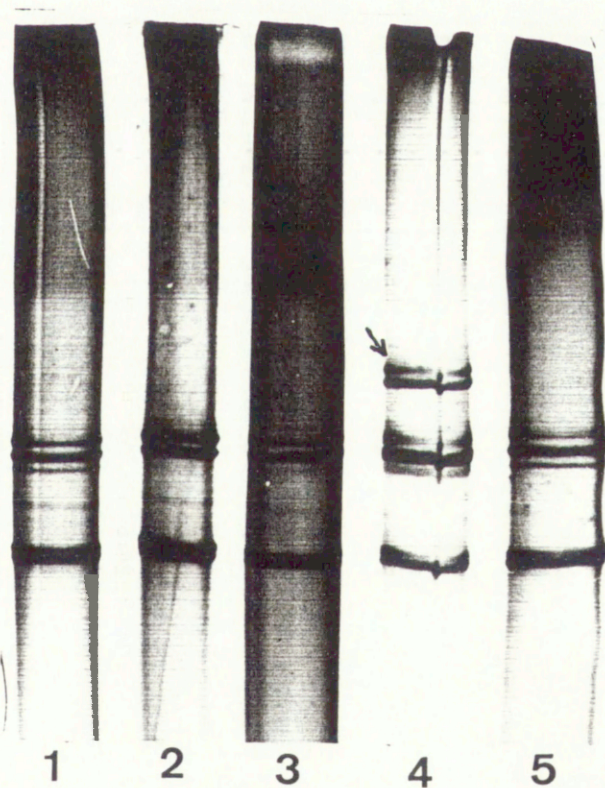
pacjent	201	62	P39	100	43
zmiana wzorca migracji egzonu	2 i 4	4 i 5	4 i 5	6 i 6	4 i 5

Tabela 5.12 Złożone heterozygoty.

elektroforezie przynajmniej dwukrotnie, w celu wyłączenia artefaktów związanych z ewentualną nieswoistą amplifikacją i samymi warunkami elektroforezy. Jeżeli próbki DNA od innych członków rodziny były dostępne, poddawano je także elektroforezie, aby ocenić czy zmiana ruchliwości elektroforetycznej segreguje w danej rodzinie.

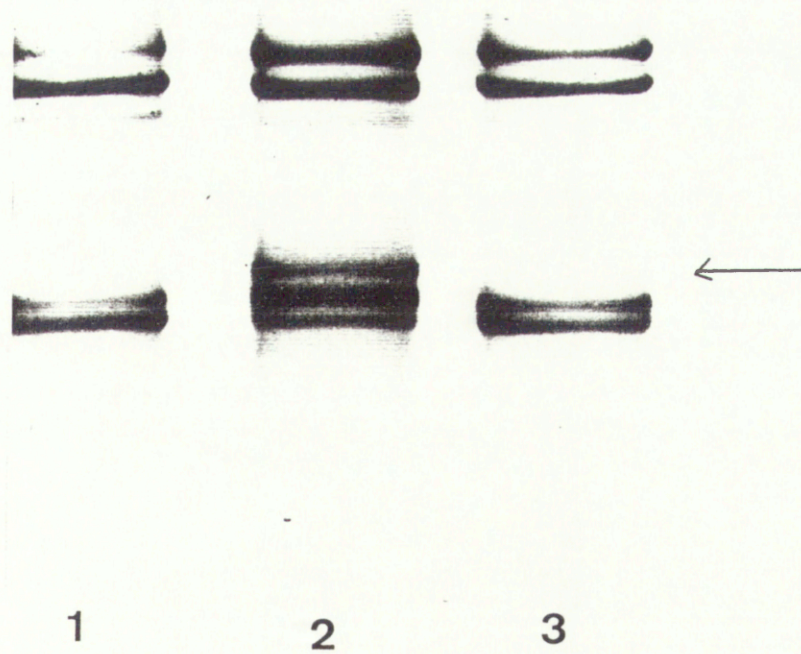
Egzon 2:

Zmianę wzorca migracji metodą SSCP i HET, stwierdzono u pacjenta 201. Na ryc. 5.20 strzałką zaznaczone są dodatkowe prążki u chorego.



Ryc. 5.20 Elektroforeza zamplifikowanego egzonu 2, metoda SSCP.
1, 2, 3, 5 - prawidłowa migracja.
4 - pacjent 201.

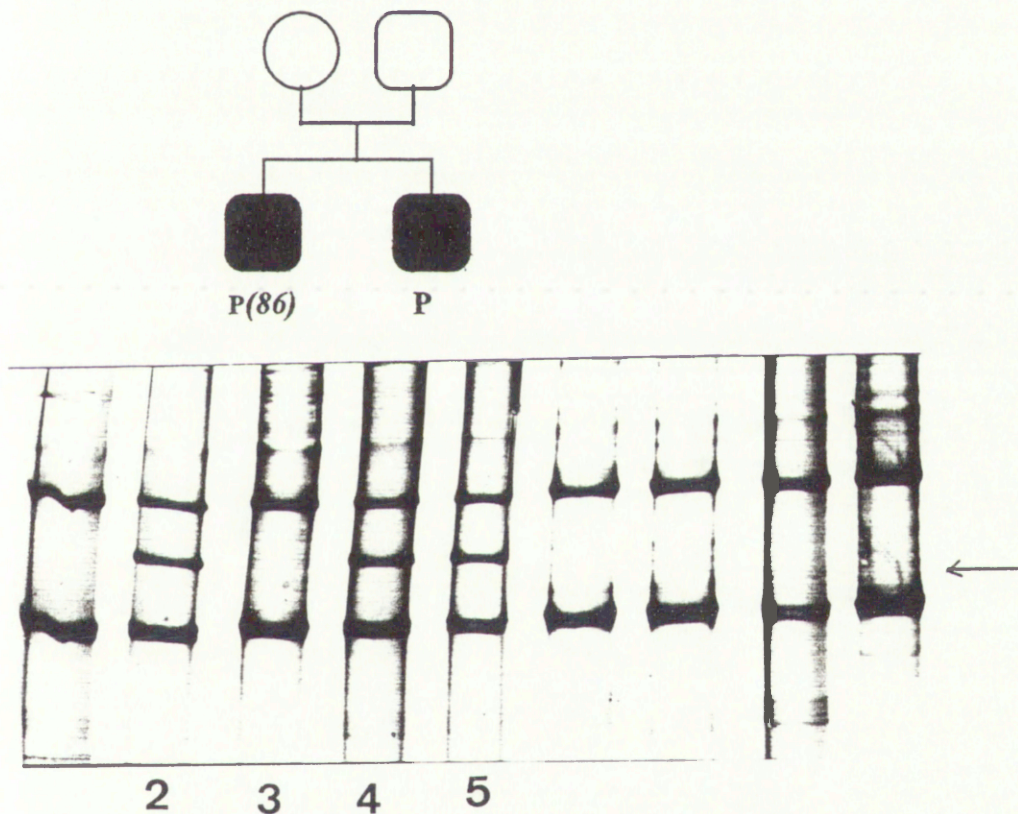
Metoda SSCP, elektroforeza egzonu 2. Zmiana wzoru migracji próbki pacjenta 208 (widoczny dodatkowy prążek), w stosunku do kontrolnego DNA (ryc. 5.21).



Ryc. 5.21 Metoda SSCP - egzon 2.
1,3 - kontrolne DNA.
2 - pacjent 208, obecność dodatkowego prążka.

Egzon 3

DNA pacjenta nr. 86 z rodziny 5 (nie wyłączonej z żadnego z badanych *loci* - tabela 5.6, ryc. 5.9 - haplotypy), wykazuje odmienny od pozostałych wzór migracji w żelach. Zmiana ruchliwości występuje u obu chorych chłopców i u ich ojca, ale nie u matki (ryc.5.22). Fakt ten oraz to, że heterodupleksy były widoczne w metodzie SSCP (na ryc. 5.22 nie pokazano), sugeruje, że zmiana w sekwencji DNA egzonu 3 występuje u pacjentów w stanie heterozygotycznym i przekazana została przez ojca.



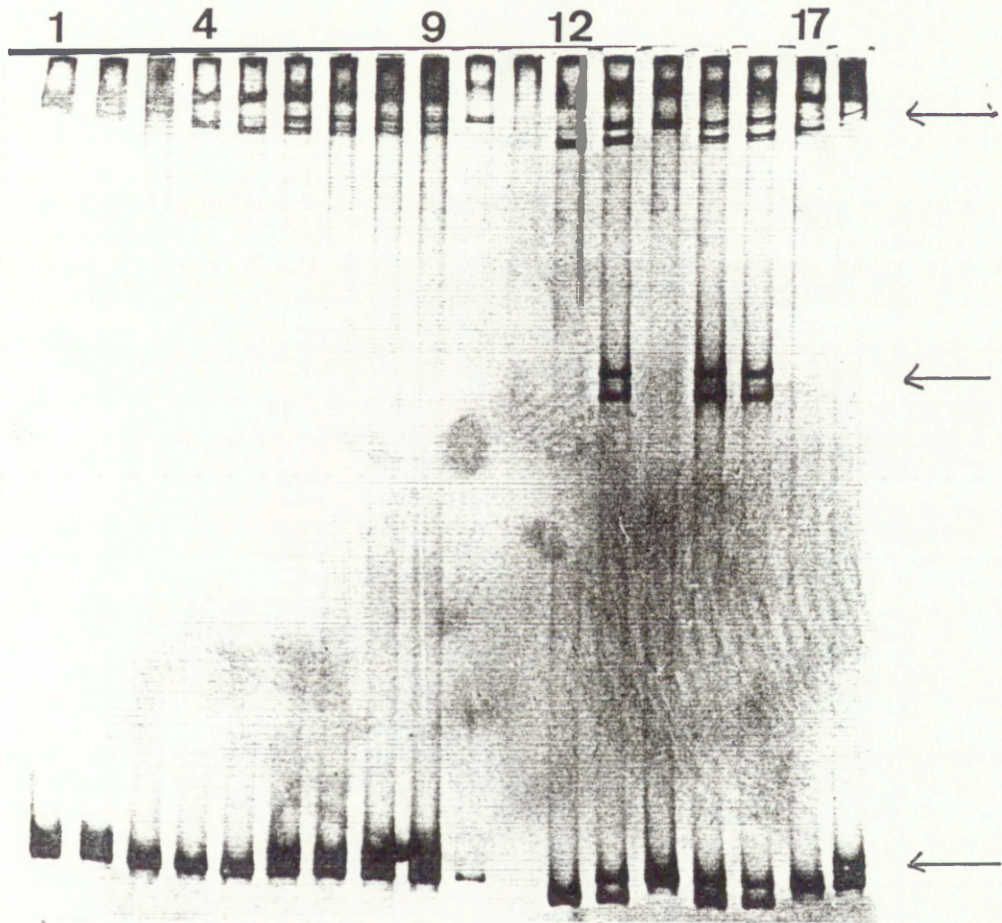
Ryc 5.22 SSCP, egzon 3 genu CANP3.
1, 6, 7, 8, 9, prawidłowy wzór migracji.
2, 3, 4, 5, : rodzina nr. 5 w kolejności: P(86), M, P, O.

Egzon 4

Zmiany ruchliwości elektroforetycznej wykryto u 24 pacjentów spośród 49 badanych (przykłady: ryc. 5.23-5.26). W celu wyeliminowania ewentualnych artefaktów próbki poddawane były elektroforezie przynajmniej dwukrotnie, każdorazowo w innych warunkach (żele bez glicerolu i z 5% glicerolem). Następnie, zamplifikowany DNA, pochodzący od innych członków rodzin poddawano elektroforezie. U 20 pacjentów stwierdzono ten sam wzór migracji, chociaż inny od obserwowanego w przypadku kontrolnego DNA. W pozostałych czterech przypadkach migracja była różna.

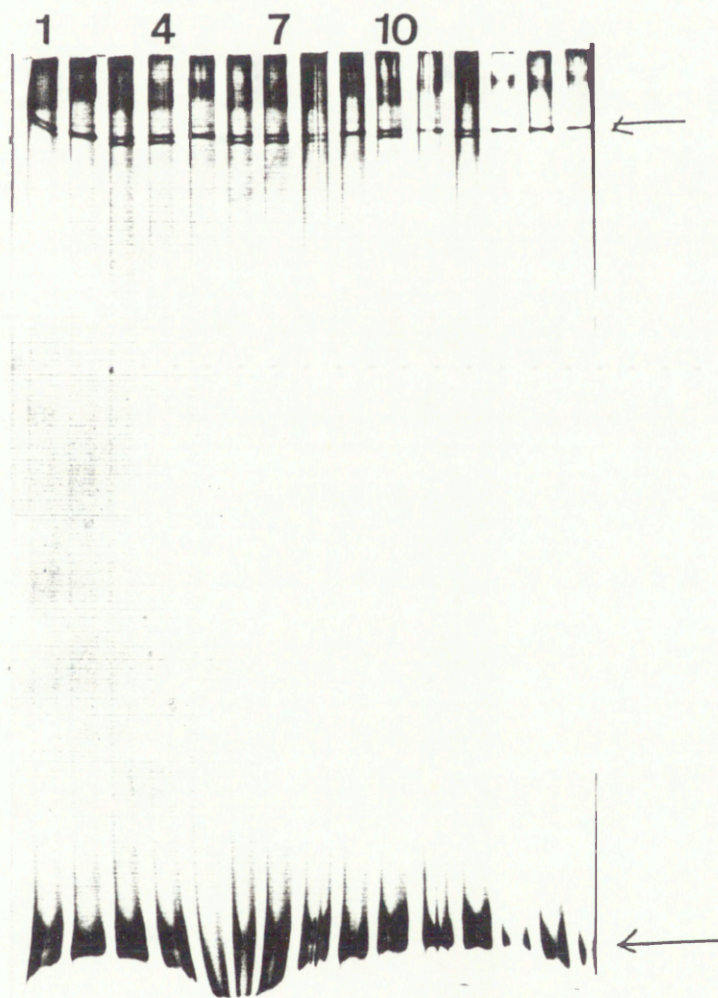
Na ryc. 5.23 pokazano żel SSCP, po elektroforezie DNA pacjentów i członków ich rodzin. W rodzinie P39 uwidoczniły się zmiany migracji prążków DNA, a także heterodupleksy u pacjenta i jego matki (metoda SSCP). Sugeruje to, że oboje są heterozygotami względem tej zmiany w sekwencji DNA. W toku dalszych badań, ustalono zmianę ruchliwości prążków w egzonie 5 (ryc. 5.27), co jest w zgodzie z wyżej wysuniętą sugestią. W rodzinie P15 zmiana sekwencji DNA ma także charakter heterozygotyczny. W rodzinach: 9 (pacjent 7), 15 (pacjent 14) i 50, u chorych nie stwierdzono tworzenia heterodupleksów w metodzie SSCP, jednakże wzór migracji jest wyraźnie inny od kontrolnego. Natomiast, heterodupleksy uwidoczniły się w metodzie HET. Ponadto w rodzinie 15, heterodupleksy są widoczne także podczas SSCP, u obojga rodziców. Wyniki te, mogą wskazywać na to, że stwierdzone zmiany w egzonie 4 występują u tych pacjentów w stanie homozygotycznym. (rodzina 9 i 15, rodowody-załącznik 1, analiza haplotypów-tabela 5.7 i 5.8, ryc. 5.11).

Na ryc. 5.23 pokazany jest żel SSCP, egzon 4 - pacjenci i ich rodziny w kolejności: P39, 9, P15, 15, 50.



Ryc. 5.23: Egzon 4, metoda SSCP, rodziny:
Rodzina P39 - (1-3) - P, M, O,
Rodzina 9 - (4-8) - P1, P2, S1, S2, M,
Rodzina P15 - (9-11) - P, M, O,
Rodzina 15 - (12-16) - P, S1, S2, M, O,
Rodzina 50 - (17-18) - P, M,
Prawidłowy wzór migracji: 3, 10, 14.

Na ryc. 5.24 pokazany jest rozdział elektroforetyczny egzonu 4 - pięciu chorych (47, 59, P33, P34, 201) i ich rodziny (metoda SSCP). Zmiany ruchliwości elektroforetycznej segregują z chorobą. U wszystkich chorych stwierdza się tworzenie heterodupleksów. W toku dalszych badań, zsekwencjonowano egzon 4 u pacjentów P33, 201, wykazując obecność mutacji punktowej - delta 550 (A) w stanie heterozygotycznym (ryc. 5.30).



Ryc. 5.24 Egzon 4, SSCP, rodziny:
Rodziny 47 - (1 - 3) - P, B, M,
Rodziny 59 - (4 - 6) - P, B, M,
Rodziny P33 - (7 - 9) - P, M, O,
Rodziny P34 - (10 - 11) - P, M,
Pacjent 201 - 12.
Kontrole DNA - 13 - 15.

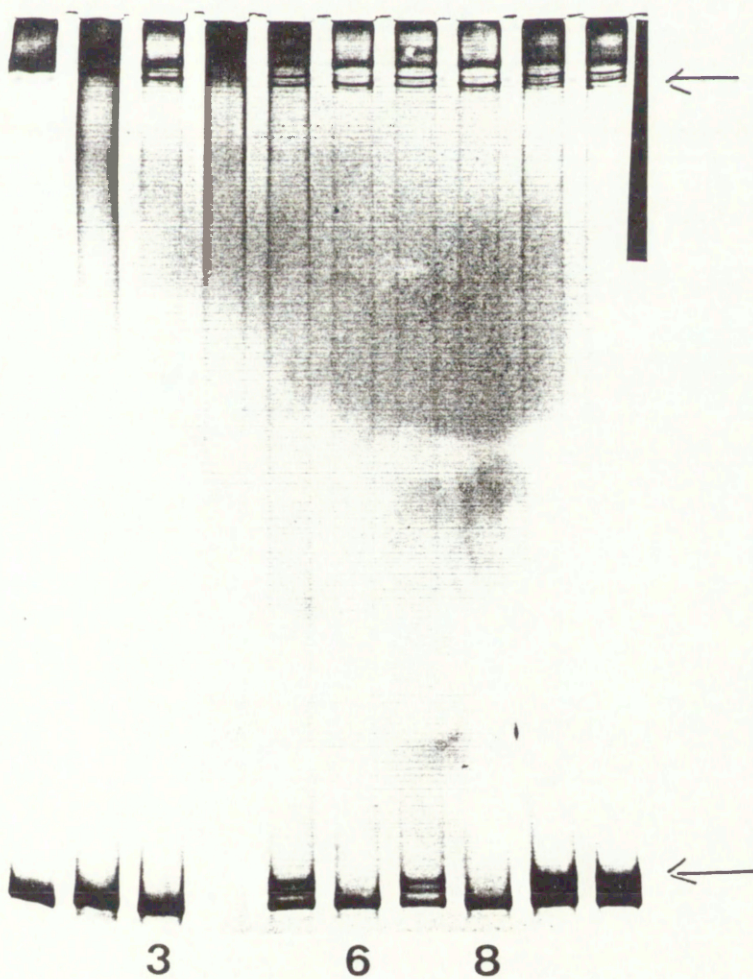
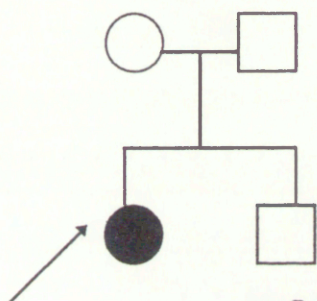
Na ryc. 5.25 pokazano rozdział elektroforetyczny, DNA rodziny P14 i P37. Charakter migracji wskazuje na heterozygotyczność pacjentów względem tych zmian DNA w egzonie 4. Egzon 4 został następnie zsekwencjonowany, u pacjenta P37 wykazano obecność mutacji - delta 550 (A) w stanie heterozygotycznym (ryc. 5.30).



Ryc. 5.25: Egzon 4, SSCP, rodziny:
Rodzina P14 - (1 - 4) - P, B, M, O,
Rodzina P37 - (5- 7) - P, O, M,
Kontrola - (8 - 9).

Na ryc. 5.26 pokazane są zmiany ruchliwości elektroforetycznej i tworzenie się heterodupleksów w trzech rodzinach (P1, P8, P4). U pacjentów nie stwierdza się heterodupleksów w badaniu metodą SSCP, ale są one obecne w analizie HET. Wskazuje to na homozygotyczność zmian u tych chorych. Potwierdzono to poprzez wykazanie mutacji w stanie homozygotycznym u pacjentów P1 i P4 (ryc. 5.31 i 5.33). Ponadto u pacjentki P1 wykazano także polimorfizm wykrywany sondą molekularną P13E-11 (ryc. 5.5).

Rodzina P1



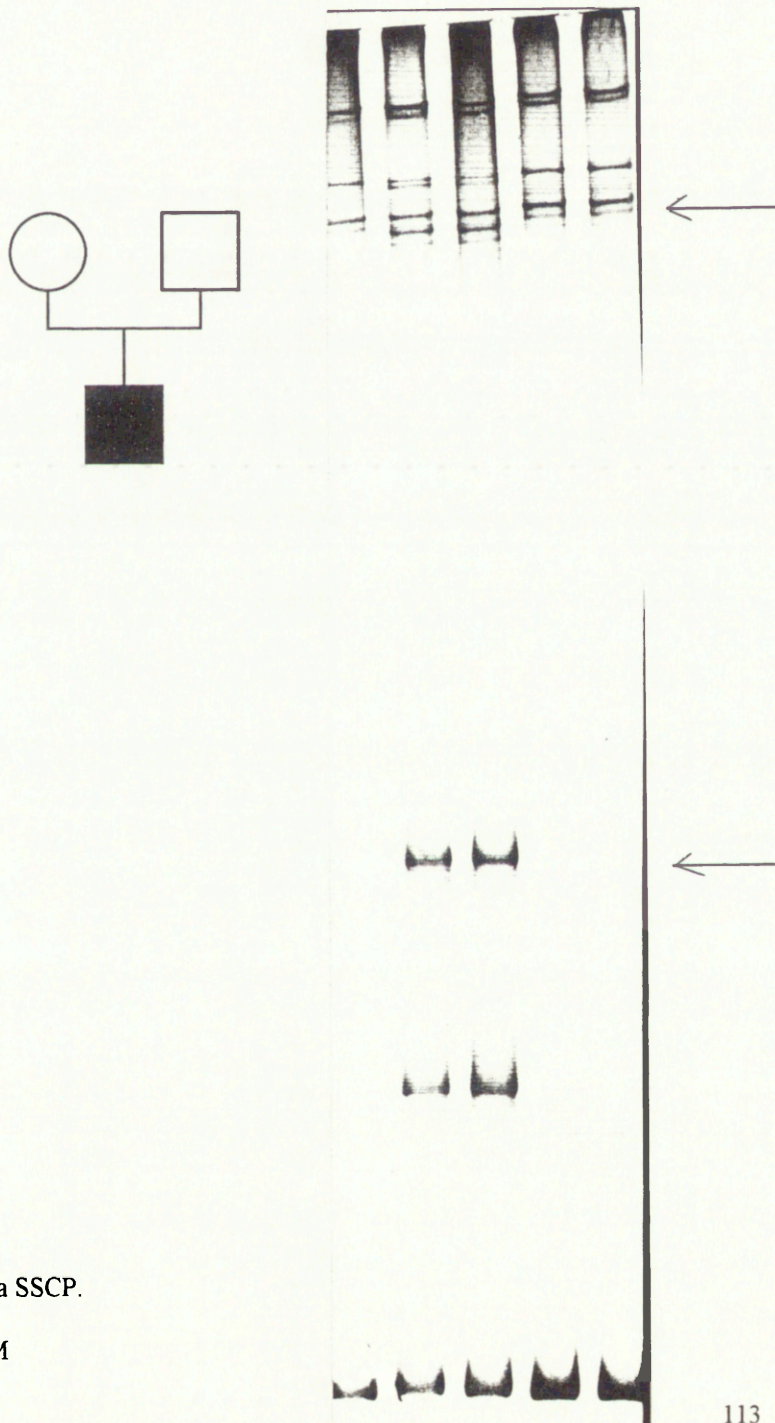
Ryc. 5.26 analiza SSCP, egzon 4

- 1 - 2: kontrole
- 3 - 5: rodzina P1 (P, M, O)
- 6 - 7: rodzina P8 (P, O)
- 8 - 10: rodzina P4 (P, M, O)

Egzon 5

W egzonie 5 zmiany ruchliwości stwierdzono u 2 pacjentów (przypadki sporadyczne: 62, P39). Zmiana wyraźnie segreguje w rodzinie P39 i jest przekazana choremu przez ojca (ryc. 5.27). U pacjenta P39 i jego matki, wykazano uprzednio dodatkowy prążek w egzonie 4 (ryc. 5.23, str. 109). Zarówno egzon 4 jak i 5 zostały zsekwencjonowane u tego chorego (ryc. 5.31 i ryc. 5.34).

Rodzina P39

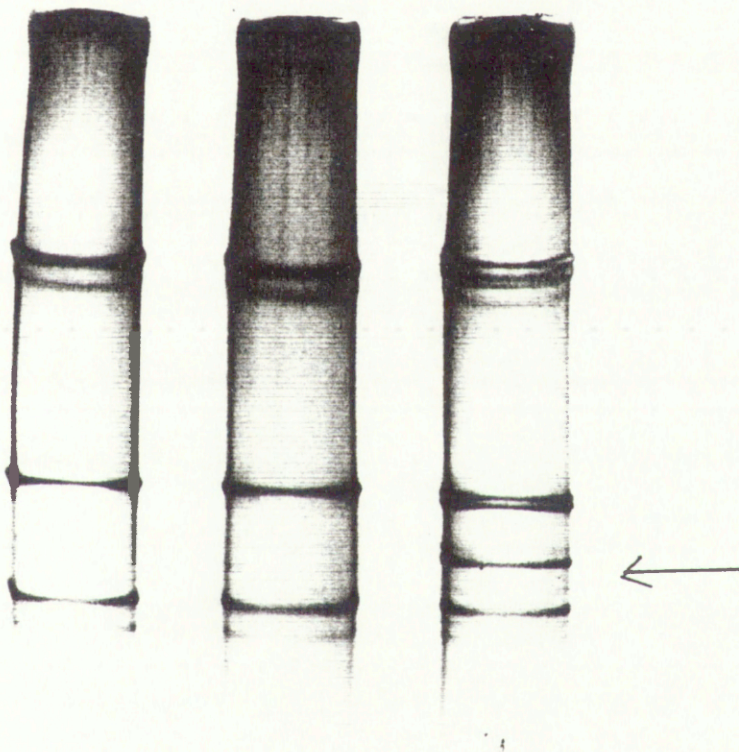


Ryc. 5.27 Egzon 5, metoda SSCP.

1, 5: Kontrola,

2 - 4: rodzina P39: P, O, M

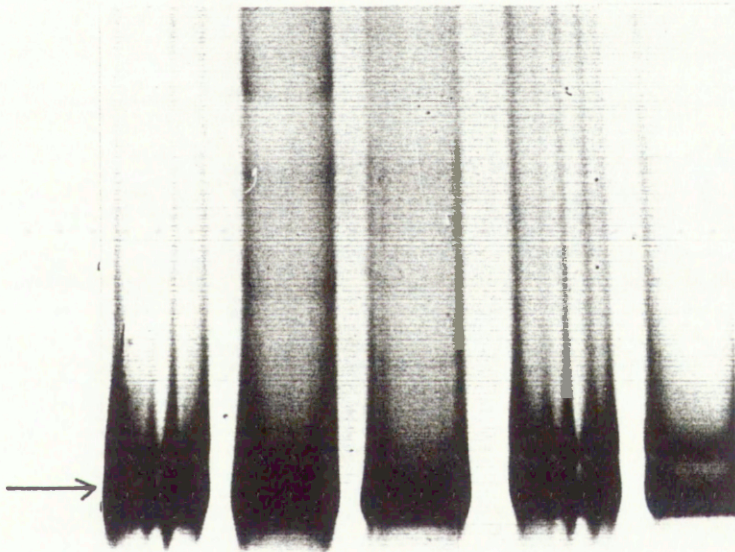
U pacjentki 62, stwierdzono dodatkowy prążek (strzałka) w egzonie 5. Inni członkowie tej rodziny nie byli dostępni badaniu. Chora ta jest prawdopodobnie złożoną heterozygotą, ponieważ dodatkowy prążek został uwidoczniiony w żelu (metoda SSCP), egzonu 4.



Ryc. 5.28 Egzon 5, metoda SSCP.
1-2: kontrole
3: pacjent 62

Egzon 6

Formowanie się heterodupleksów pokazane jest na przykładzie zmian w egzonie 6. Tworzenie heterodupleksów jest widoczne u pacjenta 100 (rodzina 11) i jego rodziców. Może to sugerować, że każdy z rodziców tego chorego ma inną zmianę sekwencji DNA w egzonie 6, dlatego pacjent mógłby być złożoną heterozygotą.



Ryc. 5.29 Egzon 6, metoda SSCP.
1-5: pacjent 100 i jego rodzina nr. 11 - P,S,B,M,O

5.33 Wyniki sekwencjonowania:

W przypadkach stwierdzenia zmian ruchliwości elektroforetycznej, metodami SSCP lub/i HET w poszczególnych egzonach genu CANP3, wykonano sekwencjonowanie w obu kierunkach (F, R), zgodnie z procedurą zamieszczoną na str. 53-56. Matryce do sekwencjonowania stanowiły produkty reakcji PCR lub egzony genu CANP3 sklonowane w plazmidach bakteryjnych.

Egzon 4

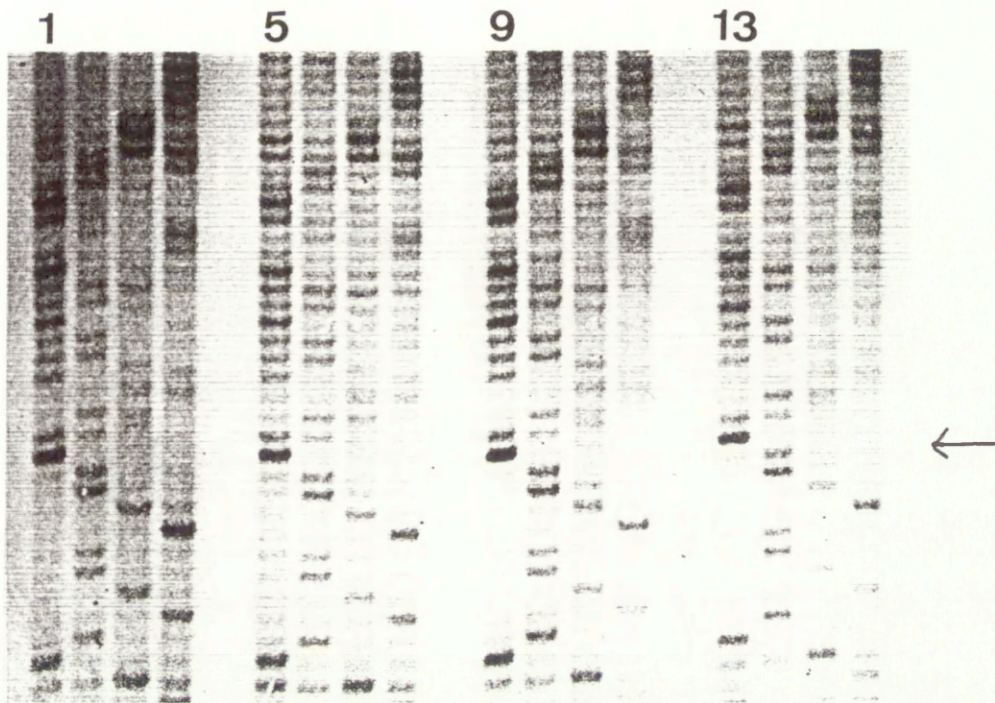
Egzon 4 zsekwencjonowano u 9 pacjentów: P33, 43, P37, 201, P39, 14, P1, 50 i P4.

W 5 przypadkach (P33, 43, P37, 201, P39) stwierdzono delecję nukleotydu A w pozycji 550 w stanie heterozygotycznym (SSCP/HET - ryc. 5.23, str. 109, ryc. 5.24, str. 110, ryc. 5.25, str. 111) i w 3 przypadkach (50, P4, P1) w stanie homozygotycznym (SSCP/HET ryc. 5.23, str. 109, ryc. 5.26, str. 112).

Delecja nukleotydu A w pozycji 550, kodującej sekwencji CANP3 (domena II), powoduje zmianę ramki odczytu, w wyniku czego powstaje przedwcześnie kodon terminacyjny i zakończenie syntezy białka na aminokwasie 219. Mutacja ta została już wcześniej opisana przez grupę francuską [Richard i wsp. 1995, Restagno i wsp. 1996],

Na ryc. 5.30 przedstawiono przykład sekwencjonowania DNA pacjentów P33, 43, P37, 201 ze starterem F. Delecja nukleotydu adeniny (A) jest w stanie heterozygotycznym. Od nukleotydu adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej genu CANP3 widoczne jest podwojenie prążków, co uniemożliwia dalsze analizowanie żelu.

5' GAC, TGC, CTG, CCA, 3'
 Asp, Cys, Leu, Pro ← nukleotyd 550



Ryc. 5.30 Sekwencjonowanie - starter F. Kolejność : A, C, G, T.

- 1 - 4: pacjent P33,
- 5 - 8: pacjent 43,
- 9 - 12: pacjent P37
- 13 - 16: pacjent 201

Na ryc. 5.31 przedstawione jest sekwencjonowanie egzonu 4, u pacjentów P39 i P1 (SSCP, pacjent P1-ryc.5.26). Widoczna delecja A, w pozycji 550, w stanie homozygotycznym u pacjenta P1 i w stanie heterozygotycznym u pacjenta P39.

Przedstawiona jest sekwencja niezmutowanego fragmentu DNA, poniżej aminokwasy przez tą sekwencję kodowane:

5' GAC, TGC, CTG, CCA, ACG, TAC, AAC, AAT, CAA 3'.
 Asp, Cys, Leu, Pro, Thr, Tyr, Asn, Asn, Gln

Sekwencja fragmentu DNA pacjenta P1:

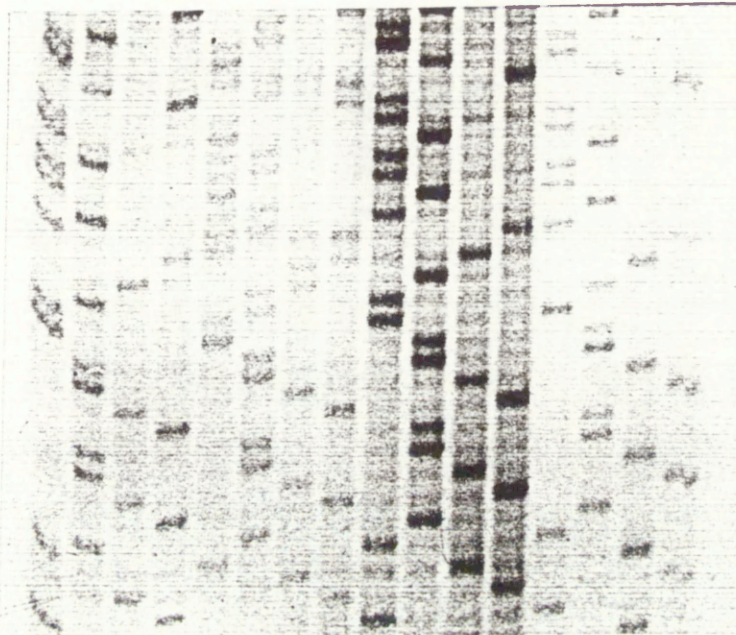
5' GAC, TGC, CTG, CCA, CGT, ACA, ACA, ATC, AA 3'
 Asp, Cys, Leu, Pro, Arg, Thr, Thr, Ile,

zmiana ramki odczytu

Sekwencja fragmentu DNA pacjenta P39:

5' GAC, TGC, CTG, CCA, 3'
Asp, Cys, Leu, Pro,

nukleotyd 550



Ryc. 5.31 Sekwencjonowanie - starter F, kolejność A, C, G, T,
1-4 i 9-12: kontrole, 5-8: pacjent P39, 13-16: pacjent P1

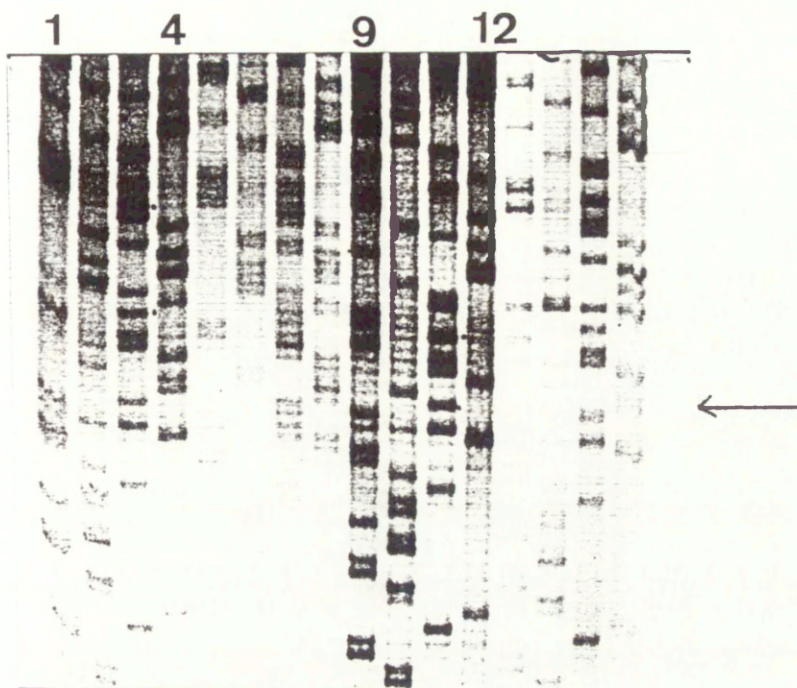
Na ryc. 5.32, przedstawiona jest delecja kilkunastu nukleotydów w stanie homozygotycznym. Brakuje piętnastu nukleotydów od 599 do 613 sekwencji kodującej, u pacjenta 14.

Sekwencja niezmutowanego fragmentu DNA i aminokwasy przez tą sekwencję kodowane:

5' CGC, AAT, GAG, /TTC, TGG, AGT, GCT, CTG/ CTG, GAG 3'
Arg, Asn, Glu, Phe, Trp, Ser, Ala, Leu, Leu, Glu

Sekwencja odcinka DNA pacjenta 14

5' CGC,AAT,GAG,..... CTG,GAG 3'
Arg, Asn, Glu,..... Leu, Glu



Ryc. 5.32 Sekwencjonowanie - starter F, kolejność A, C, G, T, 1-4: kontrola, 9-12: pacjent 14. Ścieżki 5-8 i 13-16 - sekwencje innych pacjentów trudne do analizowania ze względu na nakładanie się prążków.

Na ryc. 5.33, przedstawiona jest delecja nukleotydu A, w pozycji 550, w stanie homozygotycznym u pacjentów 50 i P4 (SSCP, ryc. 5.26, ryc. 5.23).

Sekwencja niezmutowanego fragmentu DNA:

5' G, CCA, ACG, TAC, AAC, 3'
Pro, Thr, Tyr, Asn,

Sekwencja fragmentu DNA pacjenta 50:

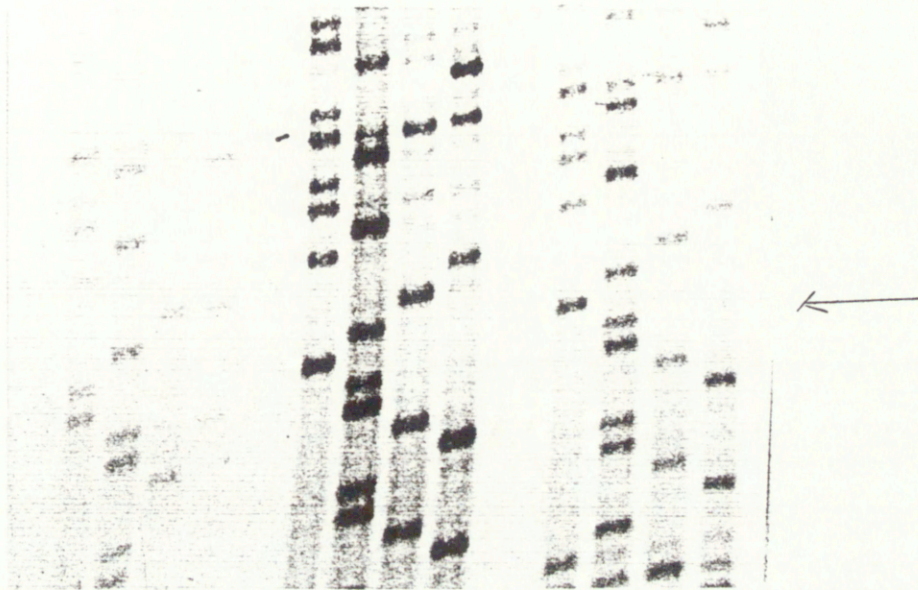
5' C, TGC, CTG, CCA, CGT, ACA, ACA, ATC, AA 3'
Cys, Leu, Pro, Arg, Thr, Thr, Ile,

↓
zmiana ramki odczytu

Sekwencja fragmentu DNA pacjenta P4:

5' GAC, TGC, CTG, CCA, CGT, ACA, ACA, AT 3'
Asp, Cys, Leu, Pro, Arg, Thr, Thr,

↓
zmiana ramki odczytu



Ryc. 5.33 Sekwencjonowanie - starter F, kolejność A, C, G, T,
 1-4 : kontrola
 5-8: pacjent 50
 9-12: pacjent P4

Egzon 5

Po stwierdzeniu zmian ruchliwości elektroforetycznej fragmentów DNA egzonu 5 genu CANP3 u pacjenta P39 i jego ojca (SSCP ryc. 5.27), sekwencjonowano egzon 5. Mutację stwierdzono u pacjenta i u jego ojca, w stanie heterozygotycznym. Na ryc. 5.34 widoczne jest podwojenie prążków uniemożliwiające dalszą analizę sekwencji zaczynające się od nukleotydu 760, sekwencji kodującej (domena II, CANP3). Wynika to prawdopodobnie z delecji lub insercji kilku nukleotydów. Długości tej zmiany nie udało się jednak ustalić,

mimo sekwencjonowania ze starterem F i R. Podwojenie prążków nie jest widoczne w kontroli.

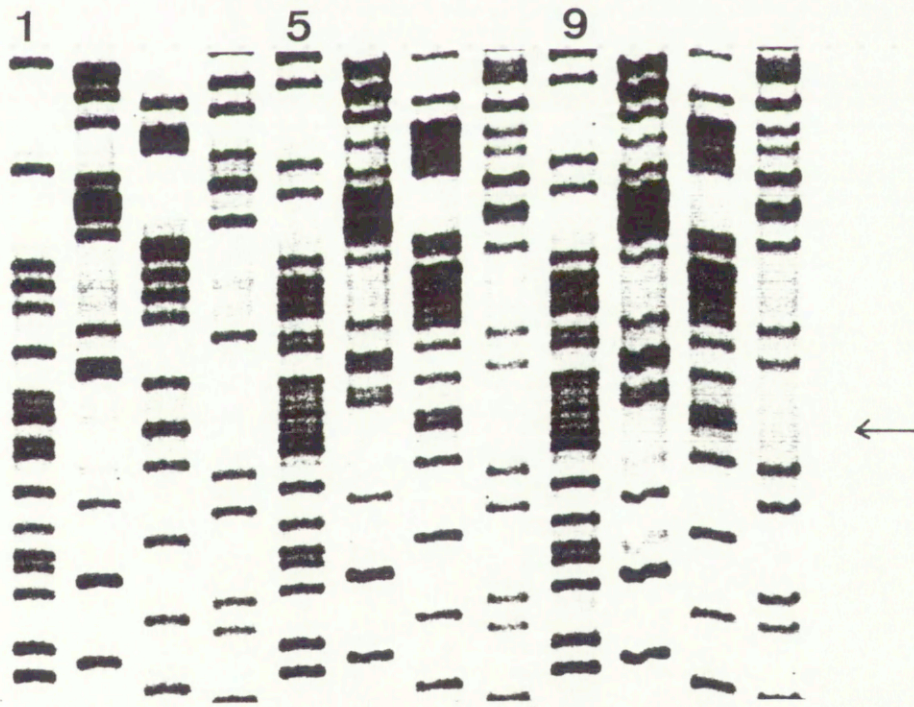
Sekwencja niezmutowanego fragmentu DNA i kodowane przez nią aminowasy:

5' TG, TAC, AAG, ATC, ATG, AAG, AAA, GCC, ATC 3'
Tyr, Lys, Ile, Met, Lys, Lys, Ala, Ile,

Sekwencja fragmentu DNA u pacjenta P39 i jego ojca:

5' TG, TAC, AAG, ATC, ATG, AAG, 3'
Tyr, Lys, Ile, Met, Lys,

nukleotyd 760



Ryc. 5.34 Sekwencjonowanie ze starterem F, kolejność : A, C, G, T.

1 - 4: kontrola,

5 - 8: P39A

9 - 12: P39 - ojciec.

5.34 Podsumowanie wyników analizy DNA w grupie pacjentów z prawdopodobnym typem 2A.

Grupę pacjentów z prawdopodobną dystrofią obręczowo - kończynową typem 2A wyłoniono na podstawie wyników analizy SSCP i HET, a w niektórych przypadkach potwierdzonych analizą sekwencji poszczególnych egzonów genu kodującego CANP3. Do grupy tej włączono także chorych, u których zmiany stwierdzone w sekwencji DNA miały charakter heterozygotyczny i u których w badanym odcinku genu nie znaleziono drugiej zmiany ruchliwości elektroforetycznej w żelach (metody SSCP i HET). Na podstawie analizy DNA u 5 pacjentów stwierdzono zmiany sekwencji DNA w dwóch egzonach genu CANP3 (tabela 5.12, tabela 5.13). Jak wykazano w tabeli 5.13, liczba złożonych heterozygot jest większa i w tym materiale wynosi 17. DNA poszczególnych pacjentów zsekwencjonowano, a wykazane mutacje były w stanie homo -lub heterozygotycznym, zgodnie z wynikami uzyskanymi na podstawie analizy SSCP i HET.

Pacjent	zmiany (egzon)	homo-/hetero-	rezultaty sekwencjonowania
P39	4, 5	heterozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550 egzon 5-del. kilku nukleotydów
43 (8)	4, 5	heterozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
62	4, 5	heterozygota	
7 (9)	4,	homozygota	
14 (15)	4,	homozygota	egzon 4-delecja 15 nukleotydów
30 (16)	4,	heterozygota	
47	4,	heterozygota	
50	4,	homozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
59	4,	heterozygota	
67	4,	homozygota	
86 (5)	3,	heterozygota	
P1	4,	homozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
P4	4,	homozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
P8	4,	homozygota	
P10 (2)	4,	homozygota	
P14	4,	heterozygota	
P15	4,	heterozygota	
P18	4,	homozygota	
P23	4,	homozygota	
P33	4,	heterozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
P34	4,	heterozygota	
P36	4,	heterozygota	
P37	4,	heterozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
P38	4,	heterozygota	
100(11)	6, 6	heterozygota	
201	2, 4	heterozygota	egzon 4 - del. A w poz. 550
208	2,	heterozygota	

Tabela 5.13 Wyniki analizy DNA w grupie pacjentów z prawdopodobnym typem 2A. A-adenina, del.-delecja, poz.-pozycja nukleotydu w sekwencji kodującej DNA, zmiany-zmiany ruchliwości elektroforetycznej w poszczególnych egzonach genu CANP3, homo-homozygota, hetero-heterozygota. W nawiasach podano numery rodzin

5.4 Charakterystyka kliniczna grupy pacjentów z typem LGMD2A.

Na podstawie analizy DNA rozpoznano LGMD typ 2A w 27 rodzinach (33 chorych). W grupie tej jest dziewięć przypadków rodzinnych. Pokrewieństwo rodziców ujawniono tylko w trzech rodzinach (przypadki: 43, 50, 210) (tabela 5.14).

Wiek zachorowania wahał się między 2 a 25 rokiem życia. Objawy kliniczne u piętnastu pacjentów wystąpiły przed 10 r. ż., u trzynastu chorych między 10 a 15 r. ż., a tylko w trzech przypadkach po 15 r.ż (ryc. 5.35, tabela 5.14). Pierwsze objawy związane były z osłabieniem mięśni kończyn dolnych u wszystkich pacjentów. U dwudziestu chorych wyrażały się niezgrabnym chodem (chód kaczkowaty) lub tendencją do chodzenia na palcach, w pozostałych przypadkach trudnościami w bieganiu, wchodzeniu na schody, natomiast u jednego pacjenta pierwszym zauważonym objawem była trudność we wstawaniu z pozycji leżącej. Tylko u dwóch pacjentów stwierdzono opóźniony rozwój ruchowy w dzieciństwie (7K2, P8). Zaczęli oni samodzielnie chodzić w wieku 15 miesięcy.

Progresję osłabienia i zaniku mięśni obserwowano u wszystkich badanych pacjentów. Osłabienie mięśni dotyczyło początkowo obręczy biodrowej, a w rok do 13 lat później także obręczy barkowej. Szczególnie słabe były mięśnie zginacze i prostowniki, w następnej kolejności przywodziciele i odwodziciele w stawach biodrowych. W stawach barkowych osłabienie początkowo dominowało w mięśniach prostownikach i przywodzicielach, w następnej kolejności w odwodzicielach i zginaczach. Mięśnie tułowia były stosunkowo wcześniej osłabione, dotyczyło to szczególnie mięśni prostego i skośnych brzucha, w

następnej kolejności prostowników tułowia. Mięśnie łopatek były również osłabione we wczesnych stadiach choroby (I - III stopień w skali Archibalda i Vignosa). Osłabienie dominowało w mięśniach czworobocznym i równoległobocznym. W późniejszych stadiach choroby osłabieniu ulegały mięśnie w stawach łokciowych i kolanowych, wcześniej dotyczyło to mięśni zginaczy niż prostowników. W bardziej zaawansowanych stadiach osłabienie mięśni było globalne, z przewagą w grupach ksobnych. W czterech przypadkach obserwowano osłabienie mięśni szyi, zarówno zginaczy jak i prostowników.

W siedmiu przypadkach (7,P1,P4,P10,P15,P18,P14, tabela 5.14) obserwowano tworzenie się trójkąta nadobojczykowego przy odwiedzeniu ramion („terasowanie” łopatek), objaw którego nie obserwowano u pozostałych pacjentów w tej grupie chorych. Stan funkcjonalny oceniano w skali według Archibalda i Vignosa (załącznik 2). W trzech przypadkach, w których pierwsze objawy kliniczne wystąpiły w wieku powyżej 15 r.ż., obserwuje się wyraźnie łagodny przebieg dystrofii - u pacjentów tych w wieku od 22 do 34 lat stan funkcjonalny oceniono na stopień pierwszy (tabela 5.14). U następnym czternastu chorych, przebieg dystrofii oceniono również jako dobrotliwy (stopień I,II,III). W momencie ostatniej oceny pacjenci ci byli w wieku 13-22 lat i chorowali od 4 do 15 lat (początek objawów w wieku 2 do 14 lat). W sześciu przypadkach przebieg choroby był średnio - ciężki. U dwóch chorych stan funkcjonalny oceniono na stopień V po 6 do 10 latach trwania choroby. Czterech pacjentów przestało samodzielnie chodzić w wieku między 18 a 27 r.ż. po 10 do 25 latach od wystąpienia pierwszych objawów choroby. W ośmiu przypadkach przebieg

kliniczny jest trudny do przewidzenia, ze względu na zbyt krótki okres obserwacji i młody wiek chorych (ryc. 5.36 i 5.37).

Pojawienie się objawów u rodzeństwa do tej pory bezobjawowego, stwierdzono w trzech przypadkach (P33K, P10K2, 7K1). Niesymetryczne osłabienie mięśni stwierdzono w czterech przypadkach (7K2, P10K1, P10K2, P15).

Przerost mięśni w tej grupie chorych był rzadki. Przerost mięśni łydek obserwowano u czterech chorych, przerost mięśni łydek i mięśni czworogłowych ud u jednej pacjentki (nr. 62), a przerost tylko mięśni czworogłowych w jednym przypadku (201). U czternastu pacjentów stwierdzono odstawanie łopatek, a u trzynastu pogłębienie lordozy lędźwiowej. U dwudziestu sześciu chorych stwierdzono przykurcze ścięgien Achillesa, które operowano w dziewięciu przypadkach, w wieku między 7 a 17 rokiem życia. Przykurcze wystąpiły także w innych stawach (kolanowych, łokciowych, biodrowych, barkowych) u ośmiu pacjentów. Szewską klatkę piersiową stwierdzono w dwóch przypadkach (43M,50), a u jednego pacjenta obserwowano ginekomastię (43M).

Aktywność kinazy kreatynowej w surowicy krwi (CK) była podwyższona u wszystkich pacjentów, od 3 do 288 (średnio 53.5x) razy w stosunku do wartości prawidłowych (wartości prawidłowe 0 - 34 IU). W tabeli 5.14 podano wartości CK i wieku, w którym dokonano pomiaru. W przypadku pomiarów wykonanych dwa razy, przedstawiono wartości wyższe. Aktywność CK miała tendencje spadkowe wraz z zaawansowaniem procesu chorobowego, poza jednym przypadkiem (nr. 47).

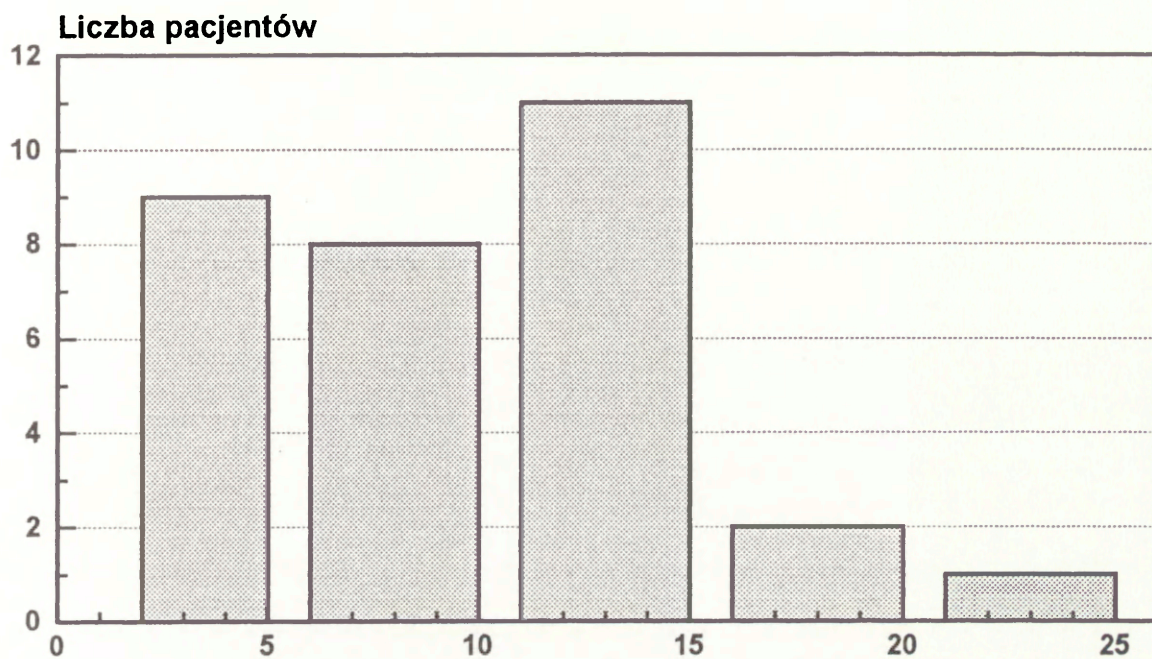
Badania psychologiczne wykonano u dziesięciu pacjentów. Wartości niższe od 90 stwierdzono trzech 3 chorych (iloraz inteligencji - II: 85, 74, 66), w przypadkach: 7K2, 59, P34.

W badaniu EKG, dyskretne nieprawidłowości stwierdzono u dziesięciu pacjentów. Miały one charakter: niemiarowości zatokowej, niepełnego bloku prawej odnogi pęczka Hisa, bloku przedniej wiązki lewej odnogi pęczka Hisa, szpiczastych załamków T, bloku przedsionkowo - komorowego I stopnia, dodatknej fali U, niespecyficznych zmian ST - T.

Pacjent	wiek zach.	klinika	wiek badania	CK	wiek badania	przerost mięśni	wiek unier.	rodz.
P39(M)	12	II	18	108x	18	-		S
43(M)	13	II	15	39x	15	-		R
43(K)	13	II	16	7x	16	-		
62(K)	19	I	34	13x	34	+		S
7(K1)	12	VII	25	4x	25	+	22	R
7(K2)	2	VII	27	50x	13	-	27	
14(K)	11	I	12	50x	12	+		S
30(K)	2	II	16	53x	13	-		S
47(M)	14	I	21	81x	21	-		S
50(M)	12	V	22	95x	14	-		S
59(M)	18	I	22	26x	22	+		S
67(M)	14	I	15	36x	15	-		S
86(M1)	9	I	10	288x	10	-		R
86(M2)	2	II	15	83x	15	-		
P1(K)	8	V	14	93x	10	-		S
P4(K)	10	III	19	27x	19	-		R
P8(M)	13	II	17	59x	17	-		S
P10(K1)	5	VII	30	7x	18	-	25	R
P10(K2)	7	III	22	3x	22	-		
P14(M)	8	VII	19	88x	10	-	18	R
P15(M)	11	III	16	31x	14	-		S
P18(M)	6	III	18	47x	14	-		S
P23(K)	2	III	16	10x	16	-		S
P33(M)	5	I	6	70x	6	+		R
P33(K)	2	0	2.5	59x	2.5	-		
P34(K)	4	II	13	17x	13	-		S
P36(M1)	12	I/II	14	53x	14	-		R
P36(M2)	10	I/II	11	41x	11	-		
P37(M)	8	I	9	88x	9	-		S
P38(K)	2	I	14	20x	14	-		S
100(M)*								S
201(K)	25	I	31	11x	25	+		R
208(M)*								S

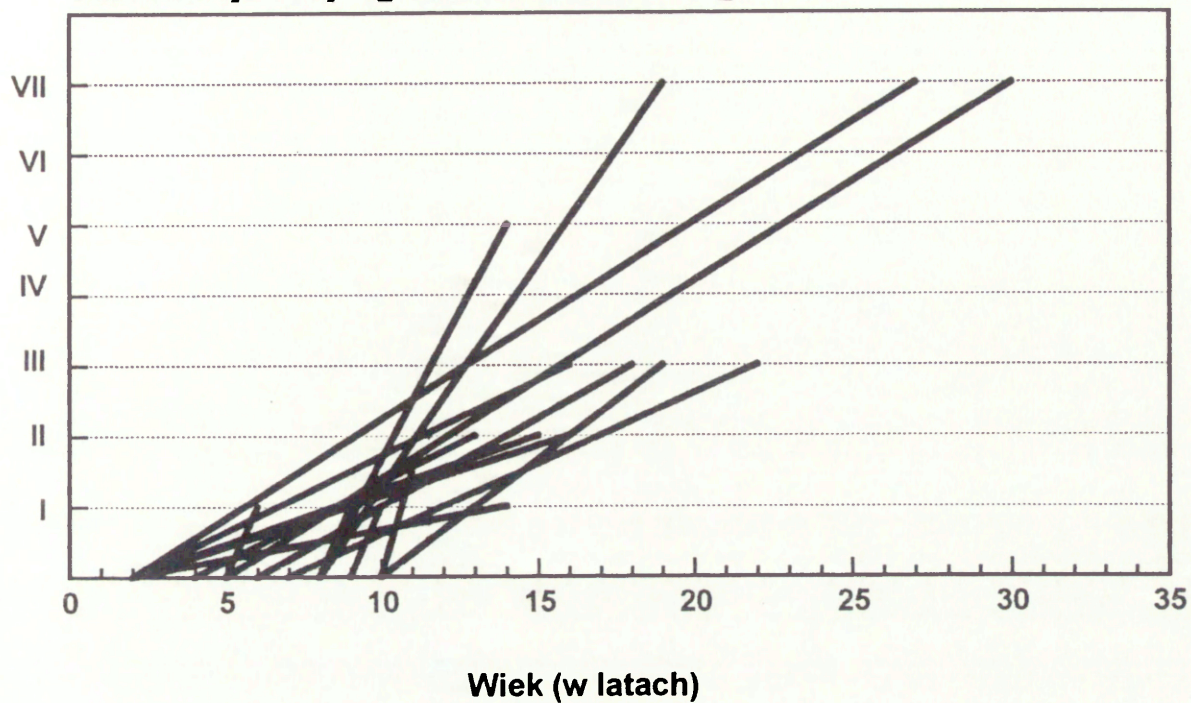
Tabela 5.14: Stan funkcjonalny pacjentów z LGMD2A.

(M-mężczyzna, K-kobieta, wiek zach-wiek zachorowania, wiek unier.-wiek unieruchomienia, wiek badania-wiek w momencie badania, CK-poziom kinazy kreatynowej wyrażony wiekokrotnością podwyższenia w stosunku do wartości prawidłowych, R-rodzinny, S-sporadyczny, klinika-w skali Archibalda i Vignosa, O-bez ewidentnych cech osłabienia mięśni, przerost-przerost mięśni. *pacjenci z łagodną, ksobną miopatią (brak bliższych danych klinicznych).



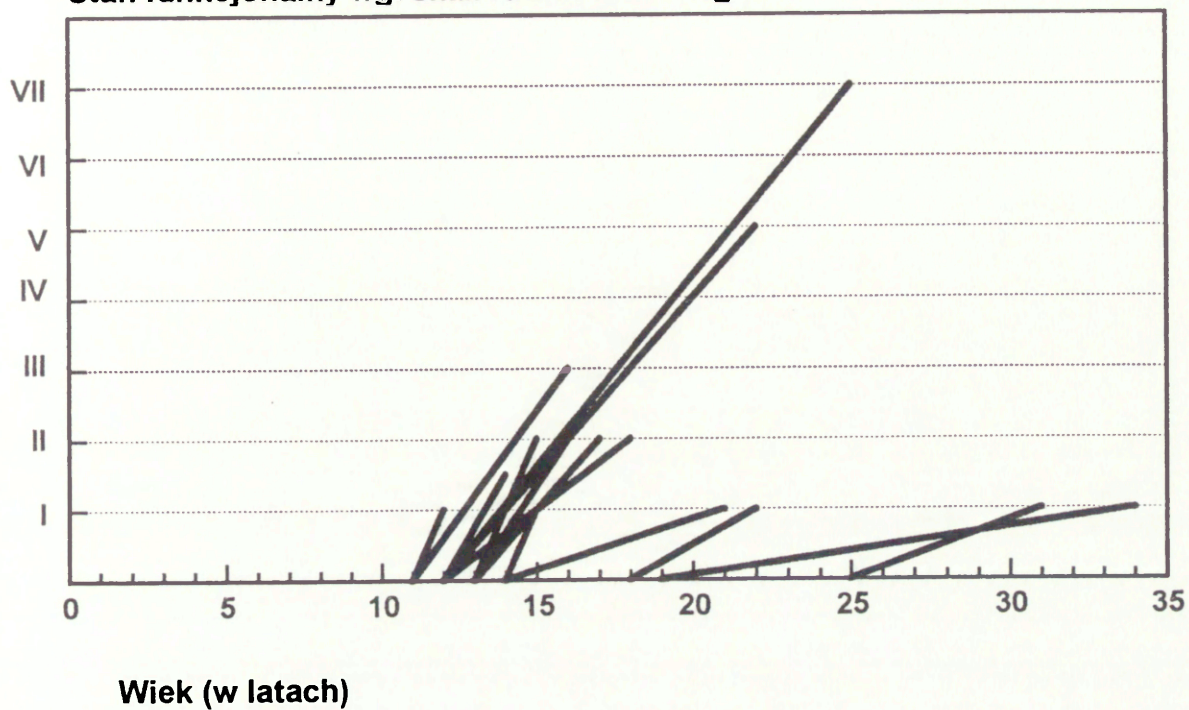
Ryc. 5.35: Analiza wieku zachorowania.

Stan funkcjonalny wg. skali Archibalda i Vignosa



Ryc. 5.36: Krzywa progresji choroby u pacjentów z LGMD2A i wiekiem zachorowania między 2 a 10 rokiem życia.

Stan funkcjonalny wg. skali Archibalda i Vignosa



Ryc. 5.37: Krzywa progresji choroby u pacjentów z LGMD2A i wiekiem zachorowania między 11 a 25 rokiem życia.

Diskusja

6. Dyskusja

Pierwszym celem niniejszej pracy, było zrewidowanie na podstawie badań genetycznych pierwotnie postawionego rozpoznania LGMD i ujednoczenie zebranego materiału, poprzez wykazanie, że w zebranej grupie rodzin znajdują się także przypadki innych dystrofii mięśniowych postępujących.

Jak już wcześniej wielokrotnie wykazano różnicowanie pomiędzy dystrofią obręczowo - kończynową i dystrofinopatiami dokonane jedynie na podstawie obrazu klinicznego jest bardzo zawodne [Norman, Coakley, Thomas i Harper 1989, Passos - Bueno i wsp. 1991, Beyenburg i wsp. 1994]. Podobnie w grupie badanych w tej pracy chorych, u których rozpoznanie dystrofii obręczowo - kończynowej stawiane było w większości przypadków przed erą diagnostyki molekularnej, wykazano obecność dystrofinopatii w około 43% przypadków. W dotychczas opublikowanych doniesieniach, podawane są różne dane ilościowe (27%, 33%, 55%) dotyczące występowania dystrofinopatii wśród chorych z mylnie rozpoznaną dystrofią obręczowo - kończynową [Hoffman i wsp. 1988, Norman, Coakley, Thomas i Harper 1989, Beyenburg 1994]. Dane ilościowe uzyskane w tych badaniach zależały od selekcji badanych pacjentów i zastosowanych metod. Stosowano jedynie analizę DNA [Norman, Coakley, Thomas i Harper 1989], tylko badanie dystrofiny mięśniowej [Hoffman i wsp. 1988] lub analizę DNA i dystrofiny [Arikawa i wsp. 1991]. Okazało się, że sporadyczne przypadki DMB/DMD i objawowe nosicielki DMD były szczególnie często rozpoznawane błędnie jako LGMD [Arikawa i wsp. 1991, Hoffman i wsp. 1992]. W tej pracy w większości przypadków chorych płci męskiej zastosowano

zarówno analizę DNA jak i ocenę dystrofiny mięśniowej (metodą immunofluorescencyjną i „western”) (tabela 5.2). U części chorych, w pierwszej kolejności wykryto delecje genu dystrofiny i wówczas nie wykonywano już biopsji mięśniowej ze względu na inwazyjność procedury. W tych przypadkach rozpoznanie zmieniono jedynie na podstawie analizy DNA. U niektórych chorych nie wykazano delecji dostępnymi metodami: hybrydyzacji Southerna i PCR, co nie wyłącza jednak obecności mutacji ponieważ technikami tymi nie można wykryć mutacji punktowych. Delecje stanowią jedynie 60% mutacji tego genu [Forrest i wsp. 1988] natomiast uważa się, że mutacje punktowe występują w 30% przypadków. W rodzinach, w których nie stwierdzono delecji, rozpoznanie postawiono na podstawie badania dystrofiny (tabela 5.2). W większości przypadków dystrofinopatii u chorych płci męskiej, u których stwierdzono delecje nie zaburzające fazy odczytu, przebieg był zgodny z hipotezą wg. Monaco [Monaco i wsp. 1988]. Zakłada ona, że delecje, które nie wpływają na fazę odczytu są przyczyną łagodnej postaci choroby, tj. dystrofii mięśniowej typu Beckera, natomiast te, które zaburzają ramkę odczytu są przyczyną dystrofii Duchenne’a. W badanych rodzinach wyjątek stanowi pacjent, nr. 2 (tabela 5.2 i 5.3), u którego stwierdzona delecja powoduje zmianę fazy odczytu, jednak przebieg schorzenia jest względnie łagodny, wobec tego rozpoznano DMB. U pacjenta nr. 18 (tabela 5.2 i 5.3), wykazano pośrednio możliwość duplikacji odcinka genu ponieważ w badaniu „western” wykazano większy niż w normie (427 kDa) ciężar dystrofiny. Ilość mutacji powstałych w wyniku duplikacji odcinka DNA oceniana jest na kilka procent uszkodzeń genu [Den Dunnen i wsp.

1989 i Hu i wsp. 1990]. Zastosowanymi w tej pracy metodami nie można ich jednak wykazać.

Analiza DNA, u kobiet nosicielek jest trudna, ze względu na obecność prawidłowego chromosomu X, który maskuje obecność delekcji na drugim chromosomie X [Bonilla i wsp. 1988]. Wobec tego, rozpoznanie u objawowych nosicielek postawiono jedynie na podstawie oceny dystrofiny w biopsji mięśniowej (tabela 5.2 i 5.4). W tych przypadkach dokonano jednak analizy kariotypów, ze względu na konieczność wyłączenia bardzo rzadkich aberracji chromosomalnych manifestujących się u kobiet zespołem obręczowo - kończynowym [Boyd i wsp. 1986, Greenstein i wsp 1980]. W sześciu przypadkach kariotyp oceniono jako prawidłowy, a w dwóch wykazano obecność translokacji (tabela 5.2). Objawy kliniczne u nosicielek genu dystrofiny są wynikiem nielosowej inaktywacji (lyonizacji) chromosomów X we wczesnym okresie embriogenezy [Migeon 1994], w wyniku czego w większości komórek nieaktywny jest ten chromosom X, który ma prawidłowy gen. U większości objawowych nosicielek, w badaniu immunofluorescencyjnym dystrofiny stwierdzono charakterystyczną mozaikę (rys. 5.1a). W dwóch przypadkach chorych płci żeńskiej stwierdzono obecność translokacji obejmującej chromosom X i jeden z autosomów (w jednym przypadku chromosom 2, a w drugim 22), z pęknięciem w miejscu genu dystrofiny (tab. 5.2). W takich przypadkach inaktywacji ulega prawidłowy chromosom X, dlatego nie ma kompensacji uszkodzonego genu prawidłowym allelem, w wyniku czego dochodzi do manifestacji objawów chorobowych. W przypadkach nieprawidłowej dystrofiny, w dystrofii mięśniowej u kobiet,

konieczne jest badanie kariotypu dla ustalenia ostatecznego rozpoznania, co jest niezbędne dla poradnictwa genetycznego.

U niektórych chorych (z 18 rodzin) nie udało się wyłączyć dystrofinopatii. W rodzinach tych nie stwierdzono delecji genu dystrofiny w badaniach DNA. DNA tych pacjentów badano w kierunku mutacji na chromosomie 15q, wykazując obecność mutacji w genie kalpajny 3 u sześciu z nich.

Obecnie postępowaniem rutynowym i niezbędnym dla rozpoznania dystrofii obręczowo - kończynowej stało się wyłączenie mutacji genu dystrofiny. Należy podkreślić, że ustalenie prawidłowego rozpoznania ma praktyczne znaczenie dla poradnictwa genetycznego i ewentualnej diagnostyki prenatalnej.

Na podstawie kontrolnych badań klinicznych, wyłoniono grupę chorych (obraz kliniczny opisano na str. 64), w której uznano za niezbędne, dokonanie molekularnej diagnostyki różnicowej pomiędzy LGMD i FSHD. Konieczność różnicowania pomiędzy tymi dwoma formami dystrofii, u pacjentów ze znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej, wykazano już we wcześniejszych badaniach [Jardine i wsp. 1994, van der Kooi i wsp. 1996].

Wyniki badań metodą hybrydyzacji Southerna są interesujące, ale trudne do interpretacji. Wykazano, że sonda molekularna P13E - 11 rozpoznaje charakterystyczny wzór hybrydyzacji, po trawieniu genomowego DNA, dwoma enzymami restrykcyjnymi EcoRI i BlnI [Deidda, Cacurri, Piazza i Felicetti 1996]. U zdrowych osób, sonda wykrywa fragment o wielkości 50 kb - 300 kb, natomiast delecja w przypadku pacjentów z FSHD, powoduje zmniejszenie jego długości do 10 kb - 35 kb [Fisher i Upadhyaya 1997].

U czternastu pacjentów nie wykazano charakterystycznego wzorca hybrydyzacji, jednakże, nie można z całą pewnością wyłączyć FSHD z dwóch powodów. Największy fragment, jaki można uwidocznic w elektroforezie agarozowej, ma długość 23 kb, dlatego, nie można wyłączyć obecności prążków o długości 23 - 35 kb. Ponadto, w FSHD stwierdzono także heterogenność *locus*, ponieważ w kilku rodzinach z typowym obrazem klinicznym, wyłączono mapowanie do 4q35 [Gilbert i wsp. 1993].

Z piętnastu badanych pacjentów, u jednego tylko stwierdzono obecność charakterystycznego dla FSHD wzorca hybrydyzacji (rys 5.5, str. 83). Pacjentka P1 jest przypadkiem rodzinnym (prawdopodobnie chora siostra babki ze strony ojca chorej, dane kliniczne nie były dostępne - nie badana) uprzednio zdiagnozowana jako LGMD. Podczas badań kontrolnych stwierdzono charakterystyczne „terasowanie” łopatek (tworzenie się trójkąta nadobojczykowego przy odwodzeniu ramion). Stan kliniczny i wyniki badań dodatkowych tej chorej przedstawiono w tabeli 5.14, a wyniki analizy DNA w tabeli 5.13. Pierwszymi objawami były trudności w chodzeniu i we wchodzeniu na schody. Po upływie półtora roku od osłabienia mięśni ksoonych obręczy biodrowej, wystąpiły objawy osłabienia mięśni kończyn górnych. Po następnych pięciu latach ujawniło się osłabienie mięśni tułowia i zginaczy grzbietowych stóp. Nie stwierdzano przerostu mięśni i osłabienia mięśni twarzy. Nie stwierdzano również osłabienia mięśni u badanych członków rodziny.

Mimo wykrycia delecji w miejscu 4q35 nie można u chorej rozpoznać dystrofii twarzowo - łopatkowo - ramieniowej. Sonda molekularna P13E - 11, wykrywa

jedynie charakterystyczny dla FSHD polimorfizm, który stwierdza się w populacji zdrowych ludzi najprawdopodobniej w około 10% przypadków [Deidda, Cacurri, Piazzo, Felicetti 1996]. Z tego powodu, a także ze względu na „dwuznaczność” obrazu klinicznego, DNA pacjentki badano także w kierunku mutacji na chromosomie 15q. W wyniku tych badań, stwierdzono homozygotyczną mutację (delecję adeniny w pozycji 550) w genie kalpajny 3 (ryc 5.31, tab. 5.13) i rozpoznano LGMD2A.

Mutacje przynajmniej siedmiu genów odpowiadają za różne warianty LGMD o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym [Bashir i wsp. 1994, Beckmann i wsp. 1991, Ben Othmane i wsp. 1995, Bonnemann i wsp. 1995, Lim i wsp. 1995, Noguchi i wsp. 1996, Passos - Bueno i wsp. 1996, Moreira i wsp. 1997].

Te różne warianty są fenotypowo podobne, dlatego różnicowanie w obrębie grupy LGMD, jedynie na podstawie obrazu klinicznego jest praktycznie niemożliwe [Bushby 1995]. W niektórych postaciach obserwuje się jednakże charakterystyczny rozkład osłabienia mięśni (LGMD2A i 2B) [Fardeau i wsp. 1996a i 1996b, Mahjneh i wsp. 1996], w rzadkich postaciach o dziedziczeniu autosomalnie dominującym współistnieje dysartria (LGMD1A) [Speer i wsp. 1992] a w innej postaci, kardiomiopatia (LGMD1B) [van der Kooi i wsp. 1997]. Te subtelne różnice nie ułatwiają jednak rozpoznania w przypadku poszczególnych rodzin, dlatego też konieczne jest zastosowanie badań z dziedziny biochemii i biologii molekularnej.

Z tych też względów w diagnostyce LGMD, szerokie zastosowanie znalazły i niezbędne są: badania genetyczne i analiza białek zlokalizowanych w błonie

komórkowej komórki mięśniowej [Bushby 1996a, Anderson 1996]. W momencie rozpoczęcia badań przeciwciała przeciwko sarkoglikanom, nie były dostępne, dlatego jedynym sposobem różnicowania w obrębie grupy rodzin z LGMD, stały się badania genetyczne, a w szczególności eliminowanie poszczególnych rodzin z poszczególnych *loci*, po uprzednim ustaleniu haplotypów.

Jednym z celów niniejszej pracy, było wykazanie niejednorodności genetycznej (heterogenności *locus*) w badanej grupie rodzin. Dokonano tego na podstawie analizy haplotypów. Haplotypy ustalono dla pięciu *loci* LGMD (markery flankujące *locus* LGMD2F i 2G, w owym czasie nie były dostępne). Jednakże heterogenność *locus* dla dystrofii obręczowo - kończynowej, dostępność rodzin jedynie o małej liczebności (załącznik 1), ponadto brak danych wskazujących na to, że rodziny te były spokrewnione lub że pochodziły z wsobnej populacji, uniemożliwiały zastosowanie metod: klasycznej analizy sprzężeń, jak i jej szczególnego wariantu - homozygotycznego mapowania.

W obu metodach: analizie sprzężeń i badaniu haplotypów, zarówno zasady stosowania jak i trudności, które mogą być napotkane są podobne. W tej pracy były to: dostępność rodzin jedynie o małej liczebności, nieinformatywność badanych mejoz, nie zawsze wystarczająca zawartość polimorficznej informacji (polymorphic information content-PIC) użytych markerów, ograniczona dostępność wysoko informatywnych, multiallelicznych, wewnątrzgenowych markerów. Te czynniki często wpływały negatywnie na uzyskanie końcowych wyników.

Jak powyżej wspomniano, badane rodziny były małe (załącznik 1), z dwoma lub trzema chorymi. W większości przypadków, nie uzyskano próbek DNA od dziadków pacjentów, co uniemożliwiało ustalenie fazy alleli, w wyniku czego powstawały trudności w rozpoznawaniu rekombinantów.

W dwóch rodzinach z autosomalnie recesywnie dziedziczącą się dystrofią o fenotypie miopatii Miyoshi stwierdzono obecność rekombinanów (ryc. 5.18 i ryc. 5.19). Miopatię Miyoshi (MM) zmapowano do chromosomu 2p13 [Bejaoui i wsp. 1995 i Illarioshkin i wsp. 1997] i jest ona bardzo rzadko spotykaną postacią dystrofii, w której jak dotychczas, nie opisano heterogenności *locus*. Ujawnienie rekombinantów w tych rodzinach może sugerować taką niejednorodność. Zaznaczyć jednak należy, że ten region genomu charakteryzuje się znaczną częstością występowania rekombinacji, a kolejność markerów nie została ostatecznie ustalona. Istnieje więc możliwość, że obecność rekombinantów nie wyłącza rodzin z fenotypem MM, z badanego *locus*. Wyłączenie lub potwierdzenie mapowania do 2p13 można stwierdzić poprzez genotypowanie tych rodzin z użyciem większej liczby mikrosatelitarnych markerów, zlokalizowanych bliżej i dalej w stosunku do genu.

Nieinformatywność mejoz stwierdzono w trzydziestu siedmiu przypadkach (w siedemnastu rodzinach), chociaż markery których użyto charakteryzowały się wysoką polimorficznością z wartością PIC zwykle powyżej 0.7. Uzyskanie ostatecznych i konkluzywnych wyników w tych przypadkach wymagałoby dokonania genotypowania większą liczbą markerów.

Wysoko informatywne, mikrosatelitarne, wewnątrzgenowe markery nie były dostępne dla dwóch loci (LGMD2A, LGMD2B). Przykłady nieinformatywnych mejoz, przy genotypowaniu markerami ściśle sprzężonymi z LGMD2A i 2B przedstawiono między innymi na ryc.: 5.8, 5.18, 5.13, 5.15, 5.17. Zastosowanie nawet wewnątrzgenowych markerów dla *loci*: 2C, 2D, 2E, nie pozwoliło na wyłączenie pewnej liczby rodzin z z różnych loci. (tabela 5.6 - 5.8, np.: ryc.: 5.6, 5.7, 5.9). W tych przypadkach zwiększenie liczby użytych do badań markerów, również pozwoliłoby na wyłączenie większej liczby rodzin z tych trzech *loci*.

Analiza haplotypów umożliwiła ponadto, wyłonienie rodzin, w których należało poszukiwać mutacji w genie CANP3 (tabela 5.6 - 5.8). Były to rodziny, których nie wyłączono z *locus* LGMD2A.

Mimo tych licznych trudności, pewna liczba rodzin została wyłączona z poszczególnych loci (tabela 5.5). Dane te dowodzą heterogenności genetycznej (*locus*), w zebranej grupie pacjentów. Będą one pomocne w dalszych badaniach nad dystrofią obręczowo - kończynową w populacji polskiej i ułatwią poszukiwania mutacji w poszczególnych genach. Badania te mogą się ponadto przyczynić, do ustalenia względnej częstości występowania poszczególnych wariantów LGMD w populacji polskiej.

Jak przedstawiono powyżej, analiza haplotypów, w znacznym stopniu umożliwia ustalenie wstępnych danych dotyczących identyfikacji genów, w których należy poszukiwać mutacji w poszczególnych rodzinach. Jest to jednak metoda trudna i nie zawsze umożliwia uzyskanie zadowalających wyników. Z tych względów podkreśla się ważność i przydatność badań biochemicznych w

diagnostyce dystrofii obręczowo - kończynowej [Anderson 1996]. Identyfikacja komponentów glikoproteinowego kompleksu dystrofiny i kalpajny 3 oraz możliwość ich wykrywania przy pomocy monoklonalnych przeciwciał [Anderson 1996, Spencer i wsp. 1997], doprowadziły do znacznego udoskonalenia diagnostyki różnych form dystrofii mięśniowych, a w szczególności diagnostyki różnicowej w obrębie grupy dystrofii obręczowo - kończynowej. Badania biochemiczne pozwalają na zidentyfikowanie pacjentów, u których komponenty DGC są prawidłowe oraz tych, z deficytem DGC. Ponadto całkowity brak jednego z komponentów DGC może wskazywać na to, że pierwotny defekt genetyczny dotyczy genu kodującego ten konkretny sarkoglikan. Dostępność tych danych umożliwia ograniczenie analizy haplotypów tylko do wybranych *loci*. Następnie rezultaty analizy haplotypów mogą dalej ograniczyć liczbę genów, w których należy poszukiwać mutacji. Przykład takiego postępowania przedstawiony jest w tabeli 5.7, rodzina 12. Komponenty DGC były prawidłowe, dlatego analiza haplotypów dokonana została markerami ściśle sprzężonymi z *loci* LGMD2B i 2A. Rodzina ta została wyłączona z LGMD2A w związku z tym pacjenci będą badani w kierunku mutacji w genie dla LGMD2B (po identyfikacji tego genu). Podjęte zostały także wstępne próby zastosowania przeciwciał przeciwko kalpajnie 3, jednak jak dotychczas nie są one rutynowo stosowane w diagnostyce LGMD [Spencer i wsp. 1997].

Ostatecznie wybrano rodziny, z których pacjenci byli badani w kierunku mutacji w genie CANP3. Grupa ta składała się z dziewięciu pacjentów, których zidentyfikowano na podstawie analizy haplotypów, chorych z dziesięciu rodzin

(materiał Zakładu Genetyki Medycznej, Uniwersytetu Newcastle), u których komponenty DGC oceniono jako prawidłowe i pacjentów z trzydziestu rodzin, u których dane dotyczące DGC nie były dostępne, a rodziny były zbyt małe aby zastosować analizę haplotypów.

Analiza metodami: heterodupleksów (HET) i polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (SSCP) zastosowane zostały w celu poszukiwania mutacji w genie kalpajny 3. Zaletami tych technik biologii molekularnej są: ich prostota i szybkość, a to ze względu na to, że oparte są na reakcji łańcuchowej polimerazy. Ponadto mogą one być stosowane do badania genomowego DNA, zaś dodatkowo są wystarczająco czułe aby rozpoznać zmiany nawet jednej zasady. Metody SSCP i HET mają kilka wad: nie rozpoznają miejsca mutacji, zmiany ruchliwości nie są charakterystyczne dla konkretnej mutacji, wykrywają mutacje i polimorfizmy nie różnicując pomiędzy nimi. Metody te mogą być także bardzo czasochłonne szczególnie gdy stosowane są do badania dużych genów. Wynika to z faktu, że ich czułość maleje gdy długość badanego odcinka DNA przekracza 400 nukleotydów. Dla poszukiwania mutacji w genie CANP3 startery były zsyntetyzowane tak, aby flankowały sekwencje egzonowe oraz miejsca donorowe i akceptorowe. [Richard i wsp. 1995]. Dlatego też, zastosowanymi metodami nie można było wykryć miejsc donorowych, ani akceptorowych, które w wyniku mutacji powstały „ektopowo”, np. wewnątrz sekwencji intronowych. Tego typu mutacje mogą być rozpoznane tylko na poziomie mRNA poprzez metodę nieuprawnionej transkrypcji z limfocytów krwi obwodowej lub badanie mięśniowego mRNA [Richard i Beckmann 1995]. Tkanka mięśniowa i linie komórkowe z krwi

obwodowej pacjentów nie były dostępne w tym projekcie badawczym dlatego nie można było oczekiwać, że zastosowane metody umożliwią wykrycie wszystkich mutacji w badanym odcinku genu CANP3. Ponadto obie metody: SSCP i HET nawet gdy zastosowane razem i jednocześnie, nie są wystarczająco czułe dla wykrycia wszystkich zmian.

Mimo to, liczba wykrytych zmian ruchliwości jest zaskakująco wysoka. Mogłoby to wynikać ze starannego doboru pacjentów. To wyjaśnienie może dotyczyć pacjentów z dziewiętnastu rodzin, które były najpierw analizowane pod kątem haplotypów lub/i dokonano oceny komponentów DGC. Jednak w trzydziestu pozostałych rodzinach dostępne dane nie były kompletne ponieważ rodziny były zbyt małe aby zastosować analizę haplotypów, ponadto nie oceniano u tych pacjentów komponentów kompleksu sarkoglikanowego. Wobec tego, każda z tych rodzin, mogła teoretycznie reprezentować jakikolwiek wariant dystrofii obręczowo - kończynowej, nawet o dziedziczeniu autosomalnie dominującym w przypadkach sporadycznych (nie można wyłączyć możliwości nowej mutacji). W tej pracy dziedziczenie autosomalnie dominujące nie było brane pod uwagę, ze względu na brak przekonujących dowodów i rzadkość występowania postaci o tym sposobie dziedziczenia (5% - 10%) [Bushby i Beckmann 1995].

Większość zmian ruchliwości zostało stwierdzonych w grupie pacjentów z tych trzydziestu rodzin bez pełnych danych dotyczących haplotypów i obecności sarkoglikanów. Niektóre ze zmian występowały w stanie heterozygotycznym, a inne w stanie homozygotycznym (tabela 5.13), co ustalono na podstawie

segregowania ich w poszczególnych rodzinach, tworzenia heterodupleksów częściowo także na podstawie sekwencjonowania.

Należy zaznaczyć, że większość zmian ruchliwości stwierdzono w egzonie czwartym genu kalpiny 3: u jednego pacjenta pochodzącego z Francji i dwudziestu trzech pochodzenia polskiego. Egzon czwarty zsekwencjonowano u dziewięciu z tych pacjentów. W pięciu przypadkach stwierdzono delecję pojedynczego nukleotydu - adeniny w stanie heterozygotycznym, a u trzech w stanie homozygotycznym (ryc.: 5.30, 5.31, 5.33). Delecja ta powoduje zmianę ramki odczytu w pozycji 550 sekwencji kodującej genu, w wyniku czego powstaje przedwcześnie kodon terminacyjny i zakończenie syntezy białka na aminokwasie 219. Mutacja ta została wcześniej opisana, zarówno w stanie heterozygotycznym [Richard i wsp. 1995], jak i homozygotycznym [Restagno i wsp. 1996]. Obie opisane rodziny były pochodzenia francuskiego o fenotypie względnie łagodnym i początku w 12 - stym roku życia. Pozostałe dwie mutacje: w egzonie czwartym i piątym (ryc.: 5.32 i 5.34) nie zostały dotychczas opisane. Mutacja w egzonie czwartym jest delecją piętnastu nukleotydów, nie powoduje więc zmiany ramki odczytu. Nie wiadomo co reprezentują inne zmiany ruchliwości elektroforetycznej i konieczne jest sekwencjonowanie dla określenia ich charakteru.

Zmiany te mogą reprezentować np. częsty dla populacji polskiej polimorfizm. Polimorfizm w egzonie czwartym nie został do tej pory opisany ale liczba zbadanych osób jest wciąż ograniczona i nie można wyłączyć takiej możliwości. Gdyby przyjąć, że zmiany te reprezentowałyby mutacje, mogłoby to znaczyć, że egzon czwarty jest gorącym miejscem dla mutacji w genie CANP3. Początkowo

uważano, że stosunkowo częstsze jest występowanie mutacji w egzonach kodujących domenę II (egzon 2 - 9) i IV (egzon 18 - 24) genu CANP3 [Richard i wsp. 1995]. Jednakże w toku dalszych badań, naukowcy grupy francuskiej znaleźli podobną ilość mutacji w innych regionach sekwencji kodującej genu CANP3 [Fardeau i wsp. 1996a, Fardeau i wsp. 1996b, Beckmann i wsp. 1996, Richard i wsp. 1997]. W świetle danych uzyskanych w tej pracy, istnienie gorącego miejsca w egzonie czwartym genu kalpainy 3, w populacji polskiej jest możliwe, jednakże dla potwierdzenia tego konieczne byłyby dalsze badania.

Wstępne dane dotyczące względnych proporcji poszczególnych wariantów LGMD zostały przedstawione przez Bushby i Beckmann'a [Bushby i Beckmann 1995]. Oceniono, że LGMD2A stanowi około 33% wszystkich postaci LGMD. Na podstawie danych uzyskanych w niniejszej pracy, można hipotetycznie przyjąć, że typ LGMD2A mógłby być częstszy w populacji europejskiej lub w określonych częściach Europy (np. w Polsce). Być może, że częstość występowania jest większa niż oczekiwana chociaż należy pamiętać, że badana populacja pacjentów jest mała i może nie być reprezentatywna dla populacji europejskiej (prawdopodobnie jest jednak reprezentatywna dla populacji polskiej). Jeśli większa częstość występowania zostałaby stwierdzona w określonym regionie Europy, to dwugenowy sposób dziedziczenia mógłby to teoretycznie tłumaczyć. Dwugenowy model dziedziczenia jest dyskutowany w dalszej części tego rozdziału. Hipotetyzując dalej, sekwencjonowanie mogłoby wykazać tą samą mutację w większości polskich rodzin. Jeśli taki byłby rezultat badań, to sugerowałoby to efekt założycielski w polskiej populacji chociaż nie ma danych na to, że populacja

ta jest wsobna, a z całą pewnością nie jest genetycznie odizolowana. Można przyjąć, że prawdopodobieństwo istnienia mutacji o tym samym charakterze istnieje tym bardziej, że na dziesięć zsekwencjonowanych zmian, w ośmiu wykazano delecję adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej genu CANP3. Ponadto należy dodać, że już uprzednio w populacji polskiej wykazano istnienie nierównowagi sprzężeń sugerującej efekt założyciela w innym schorzeniu, a mianowicie w autosomalnie recesywnym dziecięcym rdzeniowym zaniku mięśni [Brzustowicz i wsp. 1995].

Zmiany ruchliwości wykazane metodami SSCP/HET poddano manualnemu sekwencjonowaniu. Analizowanie sekwencji obu nici DNA jest trudne, a sama metoda bardzo czuła na zmiany warunków: np. czas reakcji, artefakty wynikające z warunków elektroforezy. Aby uniknąć artefaktów, sekwencjonowania dokonano oddzielnie z dwoma starterami F i R, ale nawet wtedy nie udało się określić wielkości delecji w egzonie piątym u pacjenta P39. Dla ostatecznego ustalenia wielkości delecji konieczne jest wykonanie automatycznego sekwencjonowania.

Obraz kliniczny w dystrofii obręczowo - kończynowej typu 2A zależy w znacznym stopniu od rodzaju mutacji [Bushby 1996a] i chociaż korelacje kliniczno - genetyczne są złożone, to wydaje się, że u pacjentów z mutacjami zmiany sensu, przebieg kliniczny jest łagodniejszy niż w przypadkach, w których stwierdzono mutacje zerowe [Fardeau i wsp. 1996b, Beckmann i wsp. 1996].

Obraz kliniczny w grupie pacjentów z prawdopodobnym typem 2A wyłonionych z niejednorodnego materiału zebranego w tej pracy jest podobny do tego, opisanego przez Fardeau i wsp. [Fardeau i wsp. 1996a i 1996b]. W

większości przypadków pierwsze objawy wystąpiły przed 15 r.ż (początek między 2 - 25 r.ż) i wyrażały się niezgrabnym chodem, a w niektórych przypadkach tendencją do chodzenia na palcach. Zaobserwowano, że im później wystąpiły pierwsze objawy choroby, tym przebieg jej był bardziej łagodny (ryc. 5.36, 5.37). Utrata zdolności samodzielnego chodzenia nastąpiła w wieku około 20 lat (18 - 25 r.ż.). Osłabienie i zanik mięśni dotyczyły najwcześniej mięśni ksobnych obręczy biodrowej, a następnie barkowej. We wczesnych stadiach choroby obserwowano także osłabienie mięśni tułowia oraz łopatek. W kończynach górnych osłabienie początkowo dominowało w prostownikach i przywodzicielach stawów barkowych. W późniejszym okresie osłabieniu ulegały zginacze w stawach łokciowych i kolanowych. Podobny rozkład osłabienia mięśni opisał Fardeau i wsp. [Fardeau i wsp. 1996a i 1996b]. Jednakże w grupie pacjentów opisanych przez Fardeau i wsp., osłabienie mięśni dominowało w prostownikach i przywodzicielach stawów biodrowych, podczas gdy u pacjentów badanych w niniejszej pracy zarówno zginacze jak i prostowniki zajęte były w równym stopniu, w następnej kolejności osłabieniu ulegały odwodziciele i przywodziciele. Jak wyżej wykazano, stwierdzono pewne różnice w rozkładzie osłabienia mięśni u chorych badanych w tej pracy i pacjentów opisanych przez Fardeau. Może to wynikać z faktu, że pacjenci oceniani byli za pomocą testu mięśniowego w różnych stadiach zaawansowania choroby (tabela 5.14), nie zawsze w jej początkowym okresie.

Przerost mięśni łydek obserwowano rzadko, często stwierdzano niewielką hyperlordozę w odcinku lędźwiowym i odstawanie łopatek. Przykurcze we

wczesnych stadiach choroby ograniczone były na ogół do ścięgien Achillesa, natomiast w innych stawach pojawiały się po unieruchomieniu chorego. U niektórych chorych (ośmiu) stwierdzano obecność przykurczów także w innych stawach we względnie wczesnych stadiach choroby (kolanowych, biodrowych łokciowych i barkowych). Pacjentów o podobnym obrazie klinicznym opisał także Fardeau [Fardeau i wsp. 1996b].

Poziom sprawności umysłowej chorych był na ogół prawidłowy, nie stwierdzano zajęcia procesem chorobowym mięśnia serca. Aktywność kinazy kreatynowej miała tendencje spadkowe wraz z zaawansowaniem procesu chorobowego. U jednego pacjenta stwierdzono ginekomastię, podobnie u dwóch chorych w populacji Reunion [Fardeau i wsp. 1996a].

W badanej grupie chorych u trzech (nr. 50, P1 i P4, tabela 5.14) pacjentów stwierdzono ten sam rodzaj mutacji - 550deltaA w stanie homozygotycznym. Mutację taką opisano już uprzednio w spokrewnionej rodzinie, w której dokonano pierwszej, udanej próby diagnostyki prenatalnej [Restagno i wsp. 1996]. W rodzinie tej przebieg kliniczny dystrofii był względnie łagodny, a pierwsze objawy wystąpiły w wieku około 12 r.ż. (u jednego chorego płci męskiej w przeszłości rozpoznano DMB) i dotyczyły mięśni obręczy biodrowej. Podobnie u naszych chorych, pierwsze objawy wystąpiły między 8 a 12 rokiem życia i wynikały z osłabienia mięśni ksobnych kończyn dolnych, a przebieg dystrofii był także względnie łagodny (tabela 5.14). U wszystkich chorych wcześnie stwierdzano przykurcze ścięgien Achillesa, ponadto u pacjenta nr. 50, także przykurcze w stawach łokciowych. Nie obserwowano przerostu mięśni łydek. Interesującym

objawem było „terasowanie” łopatek u dwóch pacjentek (P1 i P4) dlatego też diagnozowane były one w kierunku FSHD i jak opisano wyżej u jednej (P1) wykryto charakterystyczny dla FSHD polimorfizm, którego w przypadku P4, nie stwierdzono. W rodzinie opisanej przez Restagno i wsp. nie obserwowano „terasowania” łopatek. Pacjentka P1 jest przypadkiem rodzinnym, chora P4 jest przypadkiem sporadycznym, a rodzice pacjenta nr. 50 są spokrewnieni.

Wyłonienie pacjentów z prawdopodobnym typem 2A nie jest doskonałe. Wynika to z faktu włączenia do tej grupy chorych także pacjentów, u których stwierdzono mutacje w stanie heterozygotycznym oraz z tego, że nie wszystkie zmiany wzorca ruchliwości elektroforetycznej wykazane metodami SSCP i HET zostały zsekwencjonowane (tabela 5.13). Z tych względów należy zaznaczyć, że badania te, jak również wyłonienie grupy chorych z typem 2A mają charakter jedynie pilotarsowy. W dalszej analizie należałoby uwzględnić pozostałe egzony genu kalpajny 3, a także wykonanie automatycznego raczej, niż manualnego sekwencjonowania stwierdzonych zmian. Umożliwiłoby to zidentyfikowanie pozostałych mutacji, a także drugiej mutacji w przypadkach chorych będących złożonymi heterozygotami. Jednak trudność badania tego genu wynika z jego wielkości (długość powyżej 40 kb) jak i z faktu, że dotychczas nie stwierdzono aby szczególny rodzaj mutacji występował częściej niż pozostałe. Dlatego obecnie jedyną stosowaną metodą poszukiwania mutacji jest sekwencjonowanie poszczególnych odcinków genu, metoda która jest niesłychanie czasochłonna, a ponadto kosztowna.

Praktyczne znaczenie wyłonienia grupy rodzin z prawdopodobnym typem 2A jest duże. Na trzydzieści dziewięć badanych w kierunku mutacji genu CANP3 polskich rodzin (w sumie badano chorych z czterdziestu dziewięciu rodzin), wyodrębniono dwadzieścia pięć z LGMD2A, stanowi to aż 64%. Niewątpliwie grupa chorych badanych jest zbyt mała dla statystycznej oceny. Gdyby jednak w dalszych badaniach wyniki te zostały potwierdzone, to można by sądzić, że mutacje genu kalpajny 3 są odpowiedzialne za znaczącą liczbę przypadków z fenotypem dystrofii obręczowo - kończynowej w populacji polskiej. Miałyby to istotne implikacje diagnostyczne. A mianowicie: po wykonaniu badań immunochemicznych białek kompleksu DGC i stwierdzeniu obecności sarkoglikanów, w następnym etapie można byłoby zastosować badanie genu CANP3 lub analizę kalpajny 3 przy użyciu przeciwciał (po udoskonaleniu metody), z pominięciem pracochłonnej analizy haplotypów.

Na dziesięć zsekwencjonowanych zmian wzorca migracji wykazanych metodami SSCP i HET, aż w ośmiu przypadkach stwierdzono delecję adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej genu CANP3. Zaznaczyć należy, że ilość wykazanych mutacji jest zbyt mała dla wysuwania wniosków. Gdyby jednak u większej liczby pacjentów stwierdzono tą samą mutację, to w pierwszym etapie badania genu można by zastosować jedną, określoną metodę molekularną wykrywającą znaczącą liczbę mutacji. W przypadku wyżej opisanej delecji adeniny metodą tą mogłaby być np. allelo - specyficzna hybrydyzacja oligonukleotydom [Saiki i wsp. 1986]. Taka metodyka badania umożliwiłaby ograniczenie sekwencjonowania jako jedynej metody ostatecznie wykrywającej mutacje.

Wykazanie korelacji kliniczno - genetycznych, u pacjentów z dystrofią obręczowo - kończynową, wymaga dalszych badań, zarówno genetycznych jak i szczegółowych badań klinicznych. Będą miały one praktyczne znaczenie dla poradnictwa genetycznego w LGMD, a także mogą umożliwić prognozowanie przebiegu choroby w poszczególnych rodzinach.

Grupa francuska [Richard i wsp. 1995] zaproponowała dwugenowy model dziedziczenia dla dystrofii obręczowo - kończynowej typu 2A. Był on próbą wyjaśnienia sposobu dziedziczenia LGMD w populacji Reunion. Szczególnie zaskakujące było wykazanie sześciu różnych mutacji, które stwierdzono w sąsiedztwie sześciu różnych nosicielskich haplotypów w tej, jak się wydawało homogenicznej pod względem genetycznym populacji [Allamand i wsp. 1995b]. Nie zgadzało się to z oczekiwanym i przewidywanym efektem założyciela w tym regionie geograficznym. Nieoczekiwana obecność niezależnych mutacji we wsobnej populacji nazwana została „paradoksem Reunion”. Hipoteza dwugenowego sposobu dziedziczenia miała na celu wyjaśnienie wyżej opisanego paradoksu. Zakładała ona, że istnieje drugi nie zidentyfikowany gen, który kontroluje lub modyfikuje fenotypową ekspresję genu kalpajny 3. Ten drugi gen miałby być zlokalizowany w DNA jądrowym lub mitochondrialnym. Dotychczas nie wykazano istnienia drugiego takiego *locus*, a w świetle ujawnienia różnych mutacji w licznych badanych populacjach (nie tylko w populacjach wsobnych) [Richard i wsp. 1995, Restagno i wsp. 1996, Fardeau i wsp. 1996a i 1996b, Beckmann i wsp. 1997, Richard i wsp. 1997], wydaje się, że koncepcja dziedziczenia dwugenowego nie ma racji bytu. Richard i wsp. przewidywali, że

jeśli rzeczywiście dwugenowy model dziedziczenia odpowiada za wariant LGMD2A, wówczas w populacji powinni być zdrowi osobnicy z mutacją w obu allelach genu kalpiny 3. Jak dotychczas, nie ma doniesień w piśmiennictwie na ten temat. Przeciwno dwugenowemu modelowi dziedziczenia przemawia także wykazanie braku CANP3 w tkance mięśniowej chorych z dystrofią LGMD2A i stwierdzenie obecności CANP3 u pacjentów z innymi postaciami dystrofii mięśniowej postępującej oraz u zdrowych osobników [Spencer i wsp. 1997].

Zarówno substraty dla enzymu CANP3 jak i jego funkcje nie są znane. Zaproponowano dwie hipotezy, tłumaczące funkcje CANP3 w mięśniach (opisane we wstępie pracy) [Richard i wsp. 1995]. Szczególnie interesująca jest hipoteza, w której sugeruje się, że CANP3 może wpływać na ekspresję jakiegoś genu poprzez regulację aktywności czynników transkrypcyjnych lub ich inhibitorów. Podobnie, tkankowo nieswoiste kalpiny mogą modyfikować transkrypcję. Nie wiadomo także, jak długi jest okres półtrwania białka CANP3. Sugerowano, że jest on krótszy niż jedna godzina [Sorimachi i wsp. 1993]. W późniejszych doniesieniach wykazano jednak, że enzym CANP3 jest wystarczająco stabilny, aby wykazać jego obecność w tkance mięśniowej za pomocą przeciwciał [Spencer 1997].

Ostatnio sklonowano gen kalpiny 3 u myszy [Richard i Beckmann 1996]. W przyszłości, badania modelu zwierzęcego (np. transgenicznej myszy) będącego wzorcem LGMD typu 2A umożliwią badania nad ekspresją genu kodującego CANP3 w różnych okresach rozwoju i poznanie patomechanizmu tej postaci dystrofii. Dane te mogą przyczynić się do rozpoczęcia badań nad terapią genową tej postaci dystrofii.

Podsumowanie

7. Podsumowanie:

1. Wykazano, że do grupy pacjentów z rozpoznaniem dystrofii obręczowo - kończynowej postawionym w latach 1980-1995 zakwalifikowano przypadki dystrofinopatii. Obraz kliniczny w poszczególnych rodzinach jest podobny w LGMD i dystrofinopatiach, a diagnostyka różnicowa jest możliwa jedynie przy zastosowaniu metod genetyki molekularnej.
2. Niejednorodność genetyczną zebranego materiału wykazano na podstawie analizy haplotypów, która umożliwiła wyłączenie mapowania do określonych *loci* w poszczególnych rodzinach. Heterogenność genetyczna i podobieństwo w obrazie klinicznym uniemożliwiają różnicowanie w obrębie grupy miopatii LGMD, bez szczegółowych badań genetycznych.
3. W niniejszej pracy, u 55% spośród badanych pacjentów wykryto mutacje lub/i polimorfizm, w poszczególnych egzonach genu CANP3. Liczebność grupy jest zbyt mała dla statystycznej oceny. Dane te mogą jednak sugerować znacznie częstsze, w porównaniu z pierwszymi wstępnymi doniesieniami literaturowymi występowanie typu 2A w ogólnej populacji pacjentów z LGMD.
4. Wykazano szczególnie częste (z 31 zmian ruchliwości elektroforetycznej, aż 24 stwierdzono w egzonie czwartym) występowanie mutacji w egzonie czwartym genu kodującego CANP3, co może sugerować, że stanowi on tzw. „gorące miejsce” dla mutacji.
5. Identyfikacja mutacji w genie kalpajny 3 umożliwiła próbę klinicznej charakterystyki pacjentów z LGMD2A, głównie z rodzin mało licznych pochodzenia polskiego. Dane te przyczynią się do ustalania korelacji kliniczno - genetycznych u chorych z tą postacią dystrofii mięśniowej postępującej.

Piśmiennictwo

8. Piśmiennictwo:

Ahn A. H. i wsp.: The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations and each bind to dystrophin and its relatives. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 2724.

Akaike M., Kawai H.: Gene analysis in patients with muscular dystrophy: alpha - sarcoglycan (adhalin) gene mutations in patients with malignant limb - girdle muscular dystrophy. *Rinsho Byori - Japanese Journal of Clinical Pathology.* 1997; 45: 136.

Allamand V. i wsp.: Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the genetic isolate (Amish) and the evidence for a new locus. *Human Molecular Genetics* 1995a; 4 : 459.

Allamand V. i wsp.: Preferential localisation of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of 1-cM 15q15.1 - q15.3. *American Journal of Human Genetics* 1995b; 56: 1430.

Anderson L.V. B.: Optimised protein diagnosis in the autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 443.

Angelini C. i wsp.: Clinical presentation of α , β , γ - sarcoglycanopathies. 1st. International Congress of the World Muscle Society (streszczenia) London 1996.

Archibald K. C. i Vignos P. J.: A study of contractures in muscular dystrophy. *Archives of Physical Medicine* 1959; 40: 150.

Arikawa E. i wsp.: The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patients population. *Neurology* 1991;41:1491.

Azibi K. i wsp.: Linkage analysis of 19 families with autosomal recessive (Duchenne-like) muscular dystrophy from Algeria. *Cytogenetics Cell Genetics* 1991; 58: 1907.

Azibi K. i wsp.: Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin - associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 1423.

Bacon P. A., Smith B.: Familial muscular dystrophy of late onset. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1971; 34: 93.

Bashir R. i wsp.: Gene for autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Human Molecular Genetics* 1994;3:455

Bashir R. i wsp.: Genetic and physical mapping at the limb - girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* 1996; 33: 46.

Beckmann J. S. i wsp.: A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *CR. Acad. Sci. Paris* 1991;312:141

Beckmann J. S. i wsp.: Identification of muscle - specific calpain and β - sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 455.

Beckmann J. S.: Progressive myopathies: calpainopathy and sarcoglycanopathies. *Seminar on Clinical Neurophysiology, VII Alyn Symposium on Neuromuscular Diseases.* 1997, Abstracts, 47.

Bejaoui K. i wsp.: Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12 - 14. *Neurology* 1995; 45: 768.

Ben Hamida M., Fardeau M, Attia N.: Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle and Nerve* 1983; 6: 469.

Ben Hamida M. i wsp.: Limb - girdle muscular dystrophy 2C: clinical aspects. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 493.

Ben Jelloun-Dellagi S. i wsp.: Presence of normal dystrophin in Tunisian severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1990;40:1903.

Ben Othmane K. i wsp.: Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics* 1992; 2: 315.

Ben Othmane K. i wsp.: Evidence of linkage disequilibrium in chromosome 13 - linked Duchenne - like muscular dystrophy (LGMD2C) *American Journal of Human Genetics* 1995; 57: 732.

Beyenburg S. i wsp.: Abnormal dystrophin expression in patients with limb girdle syndromes. *Journal of Neurology* 1994; 241: 210.

Bonilla E. i wsp.: Normal and dystrophin - deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne. *American Journal of Pathology* 1988, 133: 440.

Bonnemann C. G. i wsp.: β - sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genetics* 1995; 11: 266

Boyd Y. i wsp.: Muscular dystrophy in girls with X : autosom translocation. *Journal of Medical Genetics* 1986; 23: 484.

Bushby K. M. D.: Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC consortium on limb-girdle dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1995;2:72.

Bushby K. M. D., Beckmann J. S.: Workshop report. The limb - girdle muscular dystrophies - proposal for a new nomenclature. *Neuromuscular Disorders* 1995; 5: 337.

Bushby K. M. D. i wsp.: The molecular biology of LGMD2B - towards the identification of the LGMD gene on chromosome 2p13. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 491.

Bushby K. M. D.: Towards the classification of the autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1996a; 6: 439.

Brzustowicz L. M. i wsp.: Linkage disequilibrium and haplotype analysis among Polish families with spinal muscular atrophy. *American Journal of Human Genetics* 1995; 56: 210.

Campbell K. P., Kahl S. D.: Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; 338: 259.

Campbell K. P.: Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton - extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80: 675.

Cheveron M. P. i wsp.: Becker muscular dystrophy: demonstration of the carrier status of a female by immunoblotting and immunostaining. *Neuromuscular Disorders* 1992; 2: 47.

Chiannikulchai N. i wsp.: A primary expression map of the chromosome 15q15 region containing the recessive form of limb - girdle muscular dystrophy (LGMD2A) gene. *Human Molecular Genetics* 1995; 4: 717.

Chutkow J. G., Heffner R. R., Kramer A. A., Edwards J. A.: Adult - onset autosomal limb - girdle dominant muscular dystrophy. *Annals of Neurology* 1986; 20: 240.

Claustres M. i wsp.: Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in southern France. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 1209.

Clerk A. i wsp.: Characterisation of dystrophin in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurological Sciences* 1991; 102: 197.

Cong J., Thompson V. F., Goll D. E.: Effect of monoclonal antibodies specific for 28 kDa subunit on catalytic properties of calpains. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 25740.

Cotton R. G. H.: Current methods of mutation detection. *Mutation Research* 1993; 285: 125.

De Coster W., De Reuck J., Thiery E.: A late autosomal dominant form of limb - girdle muscular dystrophy. *European Neurology* 1974; 12: 159.

Deidda G. i wsp.: Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the FSHD locus on chromosome 4qter. *European Journal of Human Genetics* 1995; 3: 155.

Deidda G., Cacurri S., Piazza N., Felicetti L.: Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Journal of Medical Genetics* 1996; 33: 361

Den Dunnen J. T. i wsp.: Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *American Journal of Human Genetics*. 1989; 45: 835.

Dubowitz V.: Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In *Muscle biopsy: a practical approach*. 1985, Bailliere - Tindall, London.

Duggan D. J. i wsp.: Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336: 618.

Duggan J. D., Hoffman E. P.: Autosomal recessive muscular dystrophy and mutations of the sarcoglycan complex. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 475.

El Kerch F. i wsp.: Linkage analysis of families with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy in Marocco indicates genetic homogeneity of the disease in North Africa. *Journal of Medical Genetics* 1994; 31: 342.

Emery A. E. H.: *Duchenne Muscular Dystrophy*, Oxford University Press, New York, Churchill Livingstone. 1987.

Emery A. E. H.: Population frequencies of inherited neuromuscular diseases: a world survey. *Neuromuscular Disorders* 1991; 1: 19.

Eymard B. i wsp.: Primary adhalinopathy (α - sarcoglycanopathy): Clinical, pathologic and genetic correlation in 20 patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1997; 48: 1227.

Fang W. i wsp.: Childhood - onset autosomal - dominant limb - girdle muscular dystrophy with cardiac conduction block. *Muscle & Nerve* 1997; 20: 289.

Farag T. L., Teebi A. S.: Duchenne - like muscular dystrophy in the arabs. *American Journal of Medical Genetics* 1990; 37: 290.

Fardeau M. i wsp.: Juvenile limb - girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996a; 119: 295.

Fardeau M. i wsp.: Chromosome 15 - linked limb - girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscular Disorders* 1996b; 6: 447.

Fisher J. i Upadhyaya M.: Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscular Disorders* 1997; 7: 55.

Forrest S. M. i wsp.: Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988; 2: 109.

Fougerousse A. i wsp.: Mapping of a chromosome 15 region involved in limb girdle muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 1994;3: 285

Gilbert J. R. i wsp.: Linkage studies in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *American Journal of Human Genetics*. 1992; 51: 424.

Gilbert J. R. i wsp.: Evidence for heterogeneity in facioscapular muscular dystrophy (FSHD). *American Journal of Human Genetics*. 1993; 53: 401.

Gilchrist J. M., Pericak - Vance M., Silverman L., Roses A. D.: Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb - girdle muscular dystrophy. *Neurology* 1988; 38: 5.

Greenstein R. M. i wsp.: An (X:11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. *Cytogenetics Cell Genetics* 1980; 27: 268.

Grompe M.: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993; 5: 111.

Gyapay G. i wsp.: The 1993-1994 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genetics*. 1994; 7: 246 i 219.

Hastings B. A., Groothuis D. R., Vick N. A.: Dominantly inherited pseudohypertrophic muscular dystrophy with internalized capillaries. *Archives of Neurology* 1980; 37: 709.

Hausmanowa - Petruszewicz I.: Choroby mięśni. Wydawnictwo Naukowe. PWN 1993. Wyd. III zm.

Hausmanowa - Petruszewicz I., Fidziańska A., Niebrój - Dobosz I., Zimowski J., Fidziańska E., Bisko M., Kozłowska M., Zaremba J.: Interrelationship between clinical features, genetic mutation and dystrophin expression in patients with Becker muscular dystrophy. *Acta Cardiologica* 1995; 7: 95.

Helene M. i wsp.: Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found in the *Torpedo* electric organ post-synaptic membrane. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 489.

Henry M. D., Campbell K. P.: Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 1996; 8: 625.

Higuchi I. i wsp.: New missense mutation in the alpha - sarcoglycan gene in a Japanese patient with severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with incomplete alpha - sarcoglycan deficiency. *Journal of Neurological Sciences* 1997; 153: 100.

Hoffman E. P. i wsp.: Characterisation of dystrophin in muscle biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine* 1988; 318: 1363.

Hoffman E. P. i wsp.: Dystrophinopathy in isolated cases of myopathy in females. *Neurology* 1992;42:967.

Hoffman E. P., Brown R. H., Kunkel L. M.: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919.

Hu X. i wsp.: Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: Its frequency, distribution, origin and phenotype genotype correlation. *American Journal of Human Genetics*. 1990; 46: 682.

Ilarioshkin S. N. i wsp.: Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain* 1996; 119: 1895.

Ilarioshkin S. N. i wsp.: Refined genetic location of the chromosome 2p - linked progressive muscular dystrophy gene. *Genomics* 1997; 42: 345.

Jackson C. E., Carey J. H.: Progressive muscular dystrophy: autosomal recessive type. *Pediatrics* 1961; 28: 77.

Jardine P. E. i wsp.: A scapular onset muscular dystrophy without facial involvement: posible allelism with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 1994; 4: 477.

Jung D. i wsp.: Characterization of delta - sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb - girdle muscular dystrophy. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 32321.

Keen J. i wsp.: Rapid detection of single - base mismatches as heteroduplexes on HydroLink gels. *Trends in Genetics* 1991; 7: 5.

Kishimoto A. i wsp.: Limited proteolysis of protein kinase C by calcium - activated neutral protease (calpain). *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 4088.

Koenig M., Monaco A. P., Kunkel L. M.: The complete sequence of dystrophin predicts a rod - shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53: 219.

Kunkel L. M. i wsp.: Analysis of human Y - chromosome - specific reiterated DNA in chromosome variants. *PNAS* 1977; 74: 1245.

Lim L. E. i wsp.: β - sarcoglycan: characterization and role in limb - girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genetics* 1995; 11: 257.

Love D. R. i wsp.: Dystrophin and dystrophin - related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscular Disorders* 1993; 3: 5.

Mahjneh I. i wsp.: The phenotype of chromosome 2p - linked limb - girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 1996a; 6: 483.

Mahjneh I. i wsp.: Limb - girdle muscular dystrophy: a follow - up study of 79 patients. *Symposium on Recent Advances in Diagnosis Therapy of Neuromuscular Diseases (abstracts)*. *Neuromuscular Disorders* 1996b; 6: S9.

Marconi G.P. i wsp.: Limb girdle muscular dystrophy with autosomal dominant inheritance. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1991;83:234.

Marconi G., Pizzi A., Arimondi C. G., Vannelli B.: Limb girdle muscular dystrophy with autosomal dominant inheritance. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1991; 88: 234.

Mathews K. D. i wsp.: Linkage localisation of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) in 4q35. *American Journal of Human Genetics* 1992; 51: 428.

Matsumura K. i wsp.: Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992;359:320.

McNally E. M. i wsp.: Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma - sarcoglycan mutation. *American Journal of Human Genetics* 1996; 59: 1040.

Meola G. i wsp.: Computerized tomography and magnetic resonance muscle imaging in Miyoshi's myopathy. *Muscle and Nerve* 1996; 19: 1476.

Michalak M. i Opas M.: Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Current Opinion in Neurology* 1997; 10: 436.

Michaud J. i wsp.: Strand - separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine δ - aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13: 389.

Migeon B. R.: X - chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends in Genetics* 1994; 10: 230.

Mills K. A. i wsp.: Genetic and physical mapping on chromosome 4 narrows the localisation of the gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *American Journal of Human Genetics* 1992; 51: 423.

Miller G., Beggs A. H., Towfighi J.: Early onset dominant progressive muscular dystrophy presenting in childhood as a Becker phenotype - the importance of dystrophin and molecular genetic analysis. *Neuromuscular Disorders* 1992; 2: 121.

Minetti C. i wsp.: Dystrophin deficiency in young girls with sporadic myopathy and normal karyotype. *Neurology* 1991;41:1288.

Miyoshi i wsp.: Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 1986; 109: 31.

Monaco A. P. i wsp.: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90.

Moreira E. S. i wsp.: The seventh form of autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *American Journal of Human Genetics*. 1997; 61: 151.

Nagamine C. M., Chan K., Lau Y. F. C.: A PCR artifact: Generation of heteroduplexes. *American Journal of Human Genetics* 1989; 45: 337.

Ng W., Lau C. P.: Cardiac arrhythmias as presenting symptoms in patients with limb - girdle muscular dystrophy. *International Journal of Cardiology* 1997; 59: 157.

Nigro V. i wsp.: Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Human Molecular Genetics* 1996; 5: 1179.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group.: A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 1992; 258: 67

Noguchi S. i wsp.: Mutations in the dystrophin - associated protein γ - sargoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995; 270: 819.

Norman A., Coakley J., Thomas N., Harper P.: Distinction of Becker from limb - girdle muscular dystrophy by means of dystrophin cDNA probes. *The Lancet* 1989; 3: 466.

Ohlendieck K., Campbell K. P.: Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1991; 283: 230.

Ohno S. i wsp.: Evolutionary origin of calcium - dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and calcium - binding protein ?. *Nature* 1984; 312: 566.

Ohno S. i wsp.: Four genes for the calpain family locate on four different chromosomes. *Cytogenetics Cell Genetics* 1989; 51: 1054.

Orita M. i wsp.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single - strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1989; 86: 2766.

Ozawa E. i wsp.: Dystrophin - associated proteins in muscular dystrophy. *Human Molecular genetics* 1995; 4: 1711.

Padberg G.W., Lunt P.W., Koch M., Fardeau M.: Diagnostic criteria for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 1991; 1: 231.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: Limb - girdle syndrome: a genetic study of 22 large Brazilian families - comparison with X - linked Duchenne and Becker dystrophies. *Journal of Neurological Sciences* 1991; 103: 65.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal adult forms of limb girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *Journal of Medical Genetics* 1993a;30:385.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: Genetic heterogeneity for Duchenne-like muscular dystrophy (DLMD) based on linkage and 50 DAG analysis. *Human Molecular Genetics* 1993b; 2: 1945.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: Exclusion of the 15q locus as a candidate gene for severe childhood autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy in Brazilian families. *Human Molecular Genetics* 1993c; 2: 201.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: A common missense mutation in the adhalin gene in three unrelated Brazilian families with a relatively mild form of autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 1995a; 4: 1163.

Passos-Bueno M. R. i wsp.: Confirmation of the 2p locus for the late - onset autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophy and refinement of the candidate region. *Genomics* 1995b; 27: 192.

Passos - Bueno M. R. i wsp.: Main clinical features for the three mapped autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families. *Journal of Medical Genetics*; 1996a; 33: 97.

Passos - Bueno M. R. et al.: Linkage analysis in autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33 - 34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Human Molecular Genetics* 1996b; 5 : 815.

Piccolo P. i wsp.: Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature Genetics* 1995; 10: 243.

Pogue R.: Molecular investigation of gene involvement in the autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophies. P.hD. w przygotowaniu 1995 - 1998.

Restagno G. i wsp.: Prenatal diagnosis of limb - girdle muscular dystrophy type 2A. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 173.

Richard I. i Beckmann J. S.: How neutral are synonymous codon mutations?. *Nature Genetics* 1995; 10: 259.

Richard I. i Beckmann J. S.: Molecular cloning of mouse canp3, the gene associated with limb - girdle muscular dystrophy 2A in human. *Mammalian Genome* 1996; 7: 377.

Richard I. i wsp.: Regional localization of human chromosome 15 loci. *Genomics* 1994; 23: 619.

Richard I. i wsp.: Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995; 81: 27.

Richard I. i wsp.: Multiple independent molecular etiology for limb - girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. *American Journal of Human Genetics*. 1997; 60: 1128.

Roberds S. L. i wsp.: Primary structure and muscle - specific expression of 50 - kDa dystrophin associated glycoprotein (adhalin). *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 23739.

Roberds S. L. i wsp.: Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994; 78: 625.

Romero N. B. i wsp.: Genetic heterogeneity of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with adhalin (50kDa dystrophin - associated glycoprotein) deficiency. *CR Acad. Sci (Paris)* 1994; 317: 70.

Rybakova I. N., Amann K. J., Ervasti J. M.: A new model for the interaction between dystrophin with F - actin. *Journal of Cell Biology* 1996; 135: 661.

Saido T. C., Sorimachi H., Suzuki K.: Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological - pathological involvement. *The FASEB Journal* 1994; 8: 814.

Saiki R. K. i wsp.: Analysis of enzymatically amplified beta - globin and HLA DQ alfa DNA with allele - specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986, 324: 163.

Salih M. A. M. i wsp.: Muscular dystrophy associated with β - dystroglycan deficiency. *Annals of Neurology* 1996; 40: 925.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.: DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1977; 74: 5463.

Sarfarazi M. i wsp.: Regional mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on 4q35: combined analysis of an international consortium. *American Journal of Human Genetics*. 1992; 51: 396.

Sarkar G., Yoon H. S., Sommer S. S.: Screening for mutations by RNA single - strand conformation polymorphism (SSCP): Comparison with DNA - SSCP. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 871.

Schneidermann L. J. i wsp.: Genetic studies of a family with two unusual autosomal dominant conditions: muscular dystrophy and Pelger - Huet anomaly. *American Journal of Medicine* 1969; 46: 380.

Sewry C.A. i wsp.: Abnormalities in α -, β -, γ - sarcoglycan in patients with limb - girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 1996; 6: 467.

Sheffield V. C. i wsp.: The sensitivity of single - strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325.

Somer H. i wsp.: Benign muscular dystrophy with autosomal dominant inheritance. *Neuromuscular Disorders* 1991; 1: 267.

Sorimachi H. i wsp.: Molecular cloning of a novel mammalian calcium - dependent protease distinct from both m- and mu- type: specific expression of mRNA in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 20106.

Sorimachi H. i wsp.: Muscle - specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 10593.

Sorimachi H. i wsp.: Muscle - specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94 - specific sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 31158.

Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K.: A novel tissue - specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²⁺ - binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 19476.

Sorimachi H., Saïdo T. C., Suzuki K.: New era of calpain research - discovery of tissue - specific calpains. *FEBS Lett.* 1994; 343: 1.

Sorimachi H., Suzuki K.: Sequence comparison among muscle - specific calpain, p94, and calpain subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992; 1160: 55.

Soto D., Sukumar S.: Improved detection of mutations in the p53 gene in human tumors as single - stranded conformation polymorphs and double - stranded heteroduplex DNA. *PCR Methods and Applications* 1992; 2: 96.

Southern E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975; 98: 503.

Speer M.C. i wsp.: Confirmation of genetic heterogeneity in limb-girdle muscular dystrophy: linkage of an autosomal dominant form to chromosome 5q. *American Journal of Human Genetics* 1992;50:1211.

Speer M. C. i wsp.: Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant limb - girdle muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics* 1995; 57: 1371.

Spencer M. J. i wsp.: Absence of calpain 3 in a form of limb - girdle muscular dystrophy (LGMD2A). *Journal of the Neurological Sciences* 1997; 146: 173.

Stevenson A.C.: Muscular dystrophy in Northern Ireland. *Annals of Eugenics* 1953;18:50.

Stec I. i wsp.: Estimate of severe autosomal recessive limb - girdle muscular dystrophy (LGMD2C, LGMD2D) among sporadic muscular dystrophy males: a study of 415 families. *Journal of Medical Genetics* 1995; 32: 930.

Stroińska - Kusiowa B., Jędrzejowska H., Kopec A.: Postępująca dystrofia mięśniowa - postać kończynowo - obręczowa i twarzowo - ramieniowo - łopatkowa. *Neurologia, Neurochirurgia i Psychiatria Polska* 1966, 11, 1257.

Sunada Y., Campbell K. P.: Dystrophin - glycoprotein complex: molecular organization nad critical role in skeletal muscle. *Current Opinion in Neurology* 1995; 8: 379.

Suzuki K., Ohno S.: Calcium - activated neutral protease: structure - function relationship and functional implications. *Cell Structure and Function*. 1990; 15: 1.

Taratuto A. L. i wsp.: Adhalin (50 DAG, alpha sarcoglycan) deficiency, two novel mutations. 1st International Congress of the World Muscle Society, streszczenia 1996.

Trinick J.: Cytoskeleton: Tinin as a scaffold and spring. *Current Biology* 1996; 6: 258.

Tome F. M. S. i wsp.: Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *CR Acad. Sci. (Paris)* 1994; 317: 351.

Upadhyaya M. i wsp.: The mapping of chromosome 4q markers in relation to facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *American Journal of Human Genetics* 1992; 51: 404.

Walton J. N., Gardner - Medwin D.: Progressive muscular dystrophy and the myotonic disorders. In: Walton J. N. (ed) *Disorders of voluntary muscles*. 1981. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 502 - 505.

Walton J. N., Nattrass F. J.: On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 1954;77:169.

Van der Kooi A. J. i wsp.: The clinical spectrum of limb - girdle muscular dystrophy. A survey in the Netherlands. *Brain* 1996; 119: 1471.

Van der Kooi A. J. i wsp.: Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb - girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11 - 21. *American Journal of Human Genetics* 1997; 60: 891.

Van Deutekom J. C. T. i wsp.: FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of 3.3 kb tandemly repeated unit. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 2037.

Weiffenbach B. i wsp.: Linkage analyses of five chromosome 4 markers localises the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) gene to distal 4q35. *American Journal of Human Genetics*. 1992; 51: 416.

Weissenbach J. i wsp.: A second - generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 359: 794.

White M. B. i wsp.: Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992; 12: 301.

Wijmenga C. i wsp.: Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35 - qter. *American Journal of Human Genetics* 1992a; 41: 411.

Wijmenga C. i wsp.: Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics* 1992b; 3: 26.

Wijmenga C. i wsp.: The FSHD locus (p13E - 11) on 4qter shows high homology with 10qter. *Muscle and Nerve* 1994; suppl 1: S177.

Wijmenga C. i wsp.: Pulsed - field gel electrophoresis of the D4F104S1 locus reveals the size and the parental origin of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) - associated deletions. *Genomics* 1994a; 19: 21.

Wilson R. K. i wsp.: Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics* 1990; 6: 626.

Young K. i wsp.: Confirmation of linkage of limb - girdle muscular dystrophy, type 2, to chromosome 15. *Genomics* 1992; 13: 1370.

Zubrzycka - Gaarn E. E. i wsp.: The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988; 333: 466.

Streszczenie

9. Streszczenie

Analiza heterogenności genetycznej i klinicznej dystrofii typu obręczowo-kończynowego.

Wstęp:

Dystrofie obręczowo - kończynowe (LGMD-Limb-Girdle Muscular Dystrophy) stanowią niejednorodną grupę różnych chorób dziedziczących się głównie w sposób autosomalnie recesywny. Miopatie te, zostały wyodrębnione po raz pierwszy w klasyfikacji Stevensona oraz Waltona i Natrassa [Stevenson 1953, Walton & Natrass 1954]. Już wówczas, autorzy podkreślali niejednorodność tej grupy dystrofii. Wyróżniano postacie o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym, obok znacznie radszych, o dziedziczeniu autosomalnie dominującym. Początkowo LGMD dzielono na podstawie objawów klinicznych, wyróżniając postacie o przebiegu szybkim lub względnie łagodnym i różnym wieku występowania pierwszych objawów.

Następnie z LGMD zaczęły być eliminowane przypadki należące do zupełnie innej grupy dystrofii, sprzężonej z chromosomem X. Stało się to możliwe po identyfikacji genu dystrofiny i jego produktu. Okazało się, że sporadyczne przypadki DMB/DMD (DMB - dystrofia mięśniowa Beckera, DMD - dystrofia mięśniowa Duchenne'a) i objawowe nosicielki DMD, często rozpoznawane były uprzednio błędnie jako LGMD.

Postęp badań genetycznych umożliwił dalszą charakterystykę LGMD i pozwolił na stworzenie nowej klasyfikacji opartej na danych molekularnych. Heterogenność genetyczna tej grupy dystrofii wyraża się obecnością kilku *loci*, na różnych chromosomach, których mutacje powodują powstanie fenotypu LGMD. Badano

pacjentów z licznych rodzin, o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym. Uzyskano wstępne dane dotyczące względnych proporcji występowania poszczególnych wariantów, w ogólnej populacji chorych z LGMD. Około 33% rodzin z różnych populacji i grup etnicznych, zmapowano do chromosomu 15q (LGMD2A), a 40% do chromosomu 2p (LGMD2B). Pozostałe warianty były znacznie rzadsze i występowały głównie w określonych regionach świata. Gen dla LGMD2B, nie został do tej pory zidentyfikowany. Natomiast typ LGMD2A jest wynikiem mutacji genu kodującego aktywowaną wapniem neutralną proteazę 3 (Calcium - Activated Neutral Protease 3 - CANP3). Szczególnie istotny jest fakt, że część mutacji zidentyfikowano u pacjentów pochodzących z centralnej Europy. Początkowo większość mutacji stwierdzono w egzonach kodujących domeny: II i IV genu kalpiny 3 (CANP3).

Cel pracy:

Celem pracy jest charakterystyka genetyczna i kliniczna grupy chorych z rozpoznaniem LGMD postawionym w latach 1980 - 1995.

1. Zrewidowanie rozpoznania LGMD i wyłączenie z badanej grupy przypadków innych dystrofii.
2. Wykazanie niejednorodności genetycznej w grupie zebranych rodzin, po uprzednim ujednoczeniu tej grupy.
3. Wykazanie obecności ewentualnych mutacji w genie dla CANP3, na przykładzie badania wybranych egzonów, kodujących domenę drugą genu kalpiny 3, po uwzględnieniu wstępnych danych świadczących o dość częstym występowaniu w nich mutacji.
4. Charakterystyka kliniczna pacjentów z LGMD2A.

Material:

Material stanowi grupa chorych ze 106 rodzin, z rozpoznaniem dystrofii obręczowo - kończynowej. 88 rodzin polskich, u których rozpoznanie LGMD postawione zostało w latach 1980-1995, a więc przed i po wprowadzeniu do diagnostyki, metod biologii molekularnej: analizy DNA i oceny dystrofiny mięśniowej. Natomiast 18 rodzin, stanowiło część materiału zgromadzonego przez Zakład Genetyki Medycznej (Department of Medical Genetics) Uniwersytetu w Newcastle upon Tyne, w Wielkiej Brytanii.

Sposób analizy materiału i metodyka:

1. Pacjenci byli badani ponownie w rok do 12 lat po postawieniu rozpoznania LGMD (badanie neurologiczne, ocena postępu choroby, test mięśniowy, ocena stanu funkcjonalnego wg. Archibalda i Vignosa [Archibald i Vignos 1959], badanie aktywności kinazy kreatynowej w surowicy).

2. Rozpoznanie LGMD weryfikowano na podstawie:

2a. analizy DNA (poszukiwanie delecji genu dystrofiny) i oceny dystrofiny mięśniowej w celu wyłączenia dystrofinopatii.

2b. hybrydyzacji Southerna z sondą molekularną P13E-11, po uprzednim trawieniu enzymami restrykcyjnymi (EcoRI/BlnI), co umożliwia wykrycie polimorfizmu ściśle związanego z dystrofią twarzowo - łopatkowo - ramieniową (Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy - FSHD). Przy pomocy tej metody dokonano próby molekularnej diagnostyki różnicowej pomiędzy LGMD i FSHD u pacjentów ze znacznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej.

3. Analizę haplotypów zastosowano w celu wyłonienia pacjentów, u których LGMD może mapować się do chromosomu 15q i wyłączenia rodzin z poszczególnych *loci* (reakcja łańcuchowa polimerazy z użyciem mikrosatelitarnych markerów ściśle sprzężonych z pięcioma *loci*).

4. Zastosowano analizę polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP) i heterodupleksów (Heteroduplex Analysis - HET) do badań genu kodującego CANP3, u pacjentów wyłonionych na podstawie analizy haplotypów i u pacjentów z rodzin małych, w których analiza haplotypów była niemożliwa.

5. Sekwencjonowanie, umożliwiło wykrycie mutacji i ich zcharakteryzowanie.

Rezultaty:

1. Ujednoczenie grupy pacjentów z rozpoznaniem LGMD:

1a. Powtórne badania 88 rodzin, uprzednio rozpoznanych jako LGMD, umożliwiły wyłączenie 30 rodzin, u których rozpoznano dystrofinopatie.

1b. U jednej pacjentki spośród 15 badanych - stwierdzono obecność charakterystycznego dla FSHD polimorfizmu.

2. Analiza haplotypów umożliwiła wykazanie niejednorodności genetycznej w grupie zebranych rodzin.

3. Na podstawie analizy SSCP i HET ośmiu egzonów genu CANP3 u pacjentów z czterdziestu dziewięciu rodzin stwierdzono zmiany ruchliwości elektroforetycznej u dwudziestu siedmiu chorych.

4. Na podstawie sekwencjonowania stwierdzono niezależne mutacje u 9 pacjentów.

5. Wyłoniono grupę pacjentów z LGMD typem 2A i dokonano jej charakterystyki klinicznej

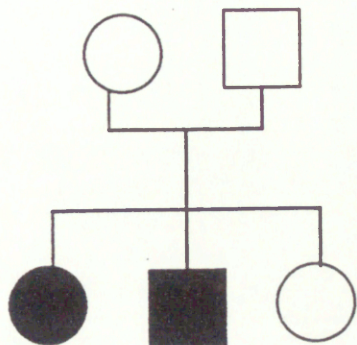
Podsumowanie:

1. Wykazano, że do grupy pacjentów z rozpoznaniem dystrofii obręczowo - kończynowej zakwalifikowano przypadki dystrofinopatii. Obraz kliniczny w poszczególnych rodzinach jest podobny w LGMD i dystrofinopatiach, a diagnostyka różnicowa jest możliwa jedynie przy zastosowaniu metod genetyki molekularnej.
2. Niejednorodność genetyczną zebranego materiału wykazano na podstawie analizy haplotypów. Heterogenność genetyczna i podobieństwo w obrazie klinicznym uniemożliwiają różnicowanie w obrębie grupy miopatii LGMD, bez szczegółowych badań genetycznych.
3. W niniejszej pracy, u 55% spośród badanych pacjentów wykryto mutacje lub/i polimorfizm, w poszczególnych egzonach genu CANP3. Mała liczebność grupy uniemożliwia statystyczną ocenę. Dane te mogą jednak sugerować częstsze w porównaniu z pierwszymi wstępnymi doniesieniami literaturowymi występowanie typu 2A w ogólnej populacji pacjentów z LGMD.
4. Wykazano szczególnie częste (z 31 zmian ruchliwości elektroforetycznej, aż 24 stwierdzono w egzonie czwartym) występowanie mutacji w egzonie czwartym genu kodującego CANP3, co może sugerować, że stanowi on tzw: „gorące miejsce” dla mutacji.
5. Identyfikacja mutacji w genie kalpajny 3 umożliwiła próbę klinicznej charakterystyki pacjentów z LGMD2A, głównie z rodzin mało licznych pochodzenia polskiego. Dane te przyczynią się do ustalania korelacji kliniczno - genetycznych u chorych z tą postacią dystrofii mięśniowej postępującej.

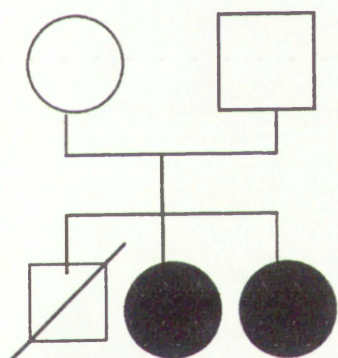
Załączniki

Załącznik 1

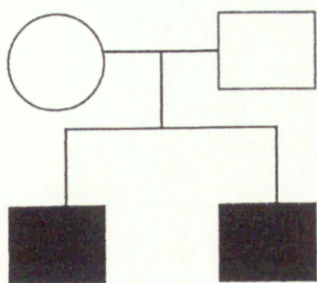
Rodzina 1 - LGMD



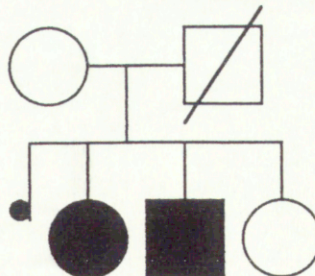
Rodzina 2 - LGMD2A



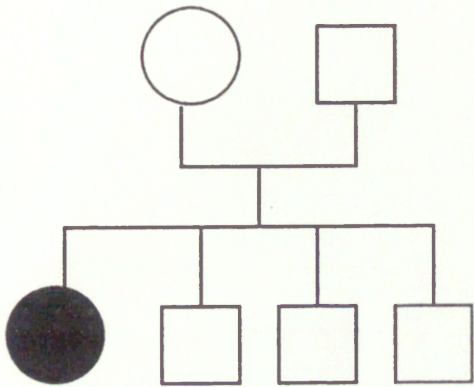
Rodzina 5 - LGMD2A



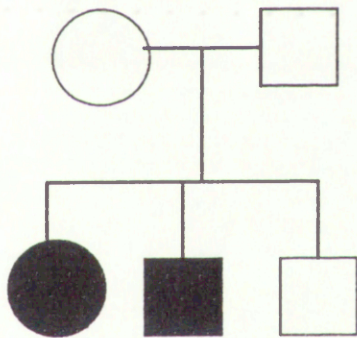
Rodzina 6 - LGMD



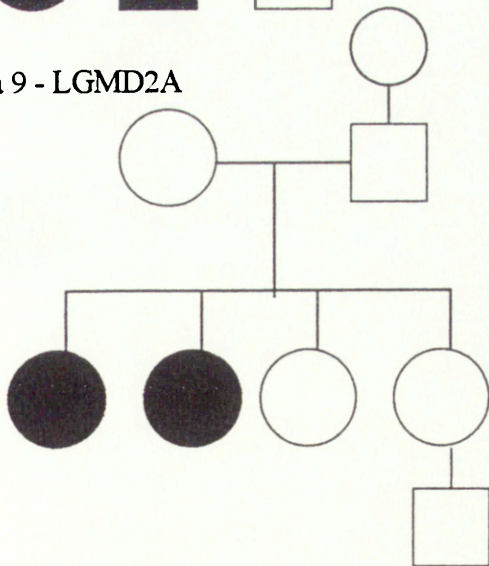
Rodzina 7 - LGMD



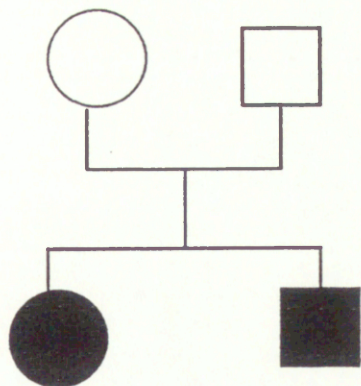
Rodzina 8 - LGMD2A



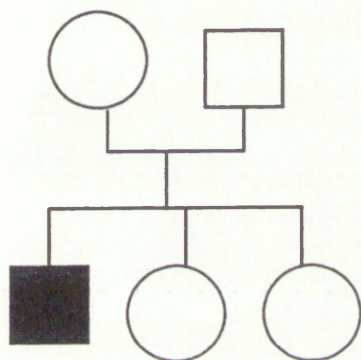
Rodzina 9 - LGMD2A



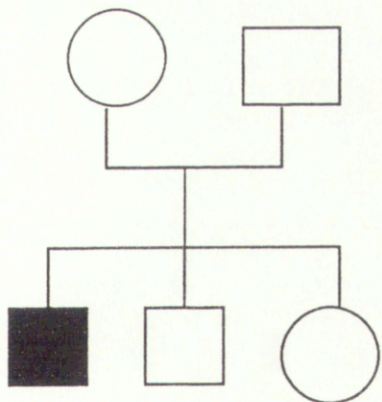
Rodzina 10 - LGMD



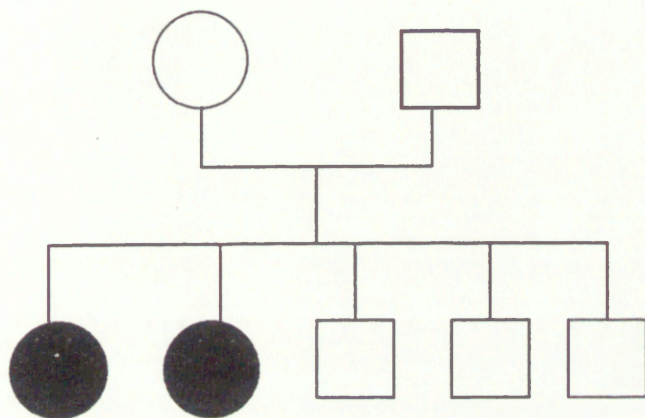
Rodzina 11 - LGMD2A



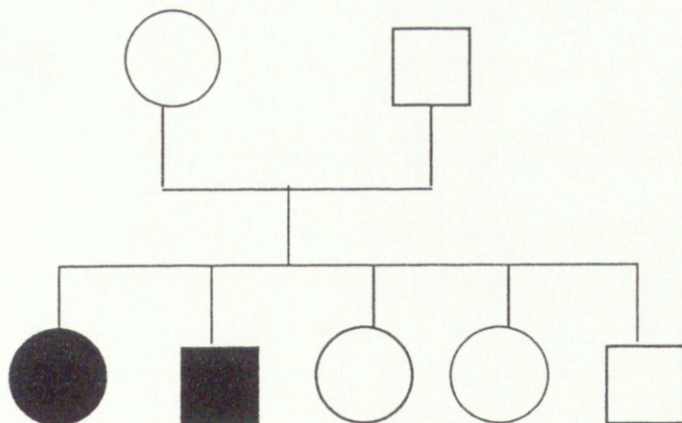
Rodzina 12 - LGMD



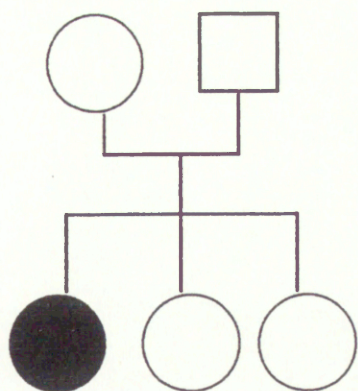
Rodzina 13 - LGMD



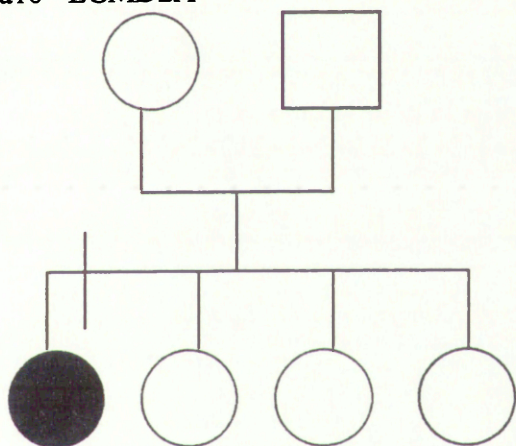
Rodzina 14 - LGMD



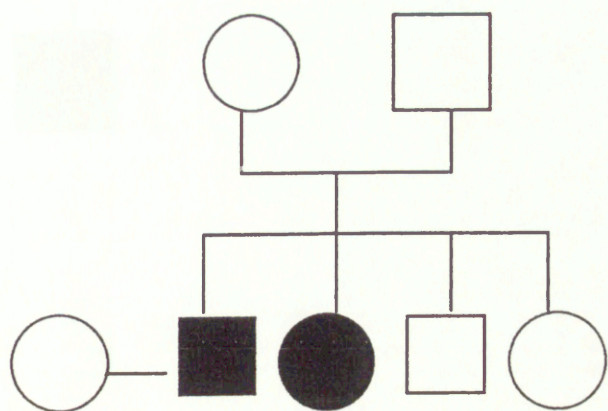
Rodzina 15 - LGMD2A



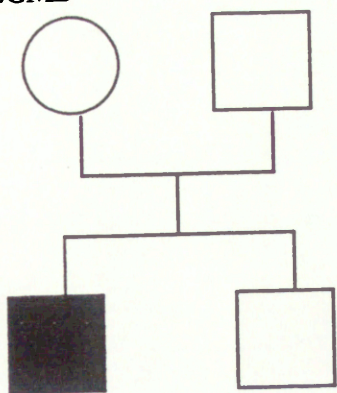
Rodzina 16 - LGMD2A



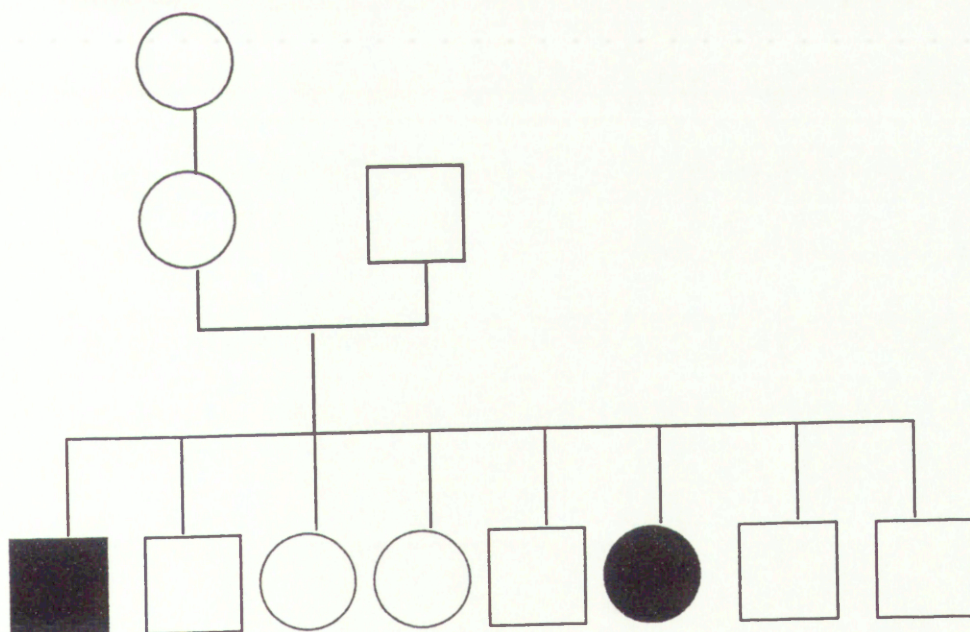
Rodzina 17 - LGMD



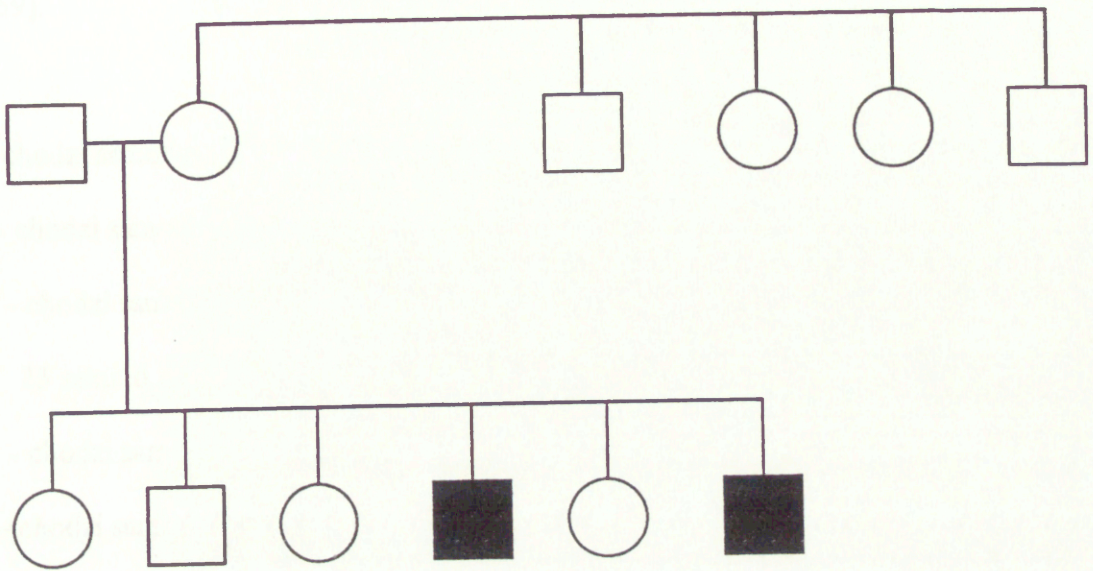
Rodzina 18 - LGMD



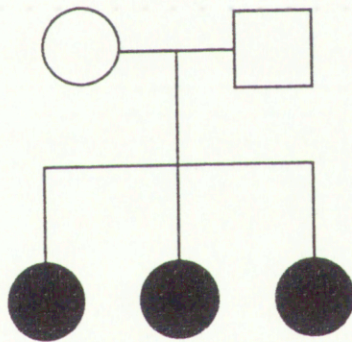
Rodzina 19 - fenotyp miopatii Miyoshi



Rodzina 20 - fenotyp miopatii Miyoshi.



Rodzina 21 - LGMD



Załącznik 2

Skala stanu funkcjonalnego według Archibald'a i Vignos'a [Archibald i Vignos 1959].

- I - chodzi samodzielnie i wchodzi na schody bez pomocy.
- II - chodzi samodzielnie i wchodzi na schody trzymając się o poręcz.
- III - chodzi samodzielnie i wchodzi na schody trzymając się o poręcz (powyżej 25 sekund na osiem standardowych stopni).
- IV - chodzi samodzielnie, ale nie wchodzi na schody.
- V - chodzi samodzielnie, ale nie wchodzi na schody lub nie wstaje z krzesła.
- VI - chodzi tylko z pomocą kul.
- VII - Nie chodzi, siedzi sam wyprostowany w fotelu, może sam kierować wózkiem inwalidzkim, jeść i pić.
- VIII - siedzi bez podparcia, ale nie może sam kierować wózkiem inwalidzkim, podnosić szklanki lub łyżki do ust.
- IX - nie może siedzieć bez podparcia, sam jeść i pić.
- X - przykuty do łóżka, wymaga pomocy we wszystkich czynnościach.

Spis tabel i rycin

11. Spis tabel i rycin.

tabele	strony	ryciny	strony
tab. 1.1	5	ryc. 1.1	9
tab. 1.2	15	ryc. 1.2	10
tab. 1.3	21	ryc. 1.3	11
tab. 1.4	29	ryc. 1.4	20
tab. 5.1	68	ryc. 5.1a	70
tab. 5.2	72	ryc. 5.1b	71
tab. 5.3	76	ryc. 5.2	71
tab. 5.4	79	ryc. 5.3	73
tab. 5.5	86	ryc. 5.4	82
tab. 5.6	87	ryc. 5.5	83
tab. 5.7	87	ryc. 5.6	89
tab. 5.8	88	ryc. 5.7	90
tab. 5.9	88	ryc. 5.8	91
tab. 5.10	103	ryc. 5.9	92
tab. 5.11	104	ryc. 5.10	93
tab. 5.12	104	ryc. 5.11	94
tab. 5.13	123	ryc. 5.12	95
tab. 5.14	128	ryc. 5.13	96
		ryc. 5.14	97
		ryc. 5.15	98
		ryc. 5.16	99
		ryc. 5.17	99
		ryc. 5.18	100
		ryc. 5.19	101
		ryc. 5.20	105
		ryc. 5.21	106
		ryc. 5.22	107
		ryc. 5.23	109
		ryc. 5.24	110
		ryc. 5.25	111
		ryc. 5.26	112
		ryc. 5.27	113
		ryc. 5.28	114
		ryc. 5.29	115
		ryc. 5.30	117
		ryc. 5.31	118
		ryc. 5.32	118
		ryc. 5.33	120
		ryc. 5.34	121
		ryc. 5.35	129
		ryc. 5.36	130
		ryc. 5.37	131