

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

**ANALISI DI MUTAZIONI NEL GENE DELLA DISTROFINA IN 507 GIOVANI PAZIENTI COREANI CON DISTROFIA MUSCOLARE
DI DUCHENNE /BECKER**
**CONSECUTIVE ANALYSIS OF MUTATION SPECTRUM IN THE DYSTROPHIN GENE OF 507 KOREAN BOYS WITH DUCHENNE/
BECKER MUSCULAR DYSTROPHY IN A SINGLE CENTER**

(CHO A. et al., 2017 Muscle Nerve 55: 727–734)

Tesi di Laurea di:
Alessandra Pia Bisceglia

Docente Referente:
Dott.ssa Maura Benedetti

Sessione Autunnale
2018/2019



ABSTRACT

INTRODUZIONE: le distrofie muscolari di Duchenne e Becker (DMD e BMD) sono malattie muscolari alleliche recessive legate al cromosoma X e causate da mutazioni nel gene distrofina.

METODI: è stata effettuata l'analisi del gene della distrofina (DMD) in 507 pazienti coreani con DMD/BMD mediante la tecnica MLPA (amplificazione multipla di sonde ligazione-dipendente) e sequenziamento diretto con metodica di Sanger.

RISULTATI: identificazione di 117 differenti delezioni, 48 differenti duplicazioni e 90 varianti di sequenza patogenetiche, tra cui 30 nuove (mai descritte precedentemente in letteratura). Si evidenzia che l'incidenza dei grandi riarrangiamenti nel gene distrofina è simile nei diversi gruppi etnici.

CONCLUSIONI: la precisa caratterizzazione genetica nei pazienti con DMD/BMD è urgente e importante per la realizzazione e l'implementazione dei registri nazionali e per le future sperimentazioni per terapie molecolari sia in Corea sia in tutto il mondo.



INTRODUZIONE



Le **distrofie muscolari di Duchenne e Becker (DMD e BMD)** sono malattie muscolari recessive alleliche causate da mutazioni nella distrofina, un gene localizzato sul cromosoma X , formato da 79 esoni e che codifica per una proteina costituita da 3685 aminoacidi.



La **DMD** è tra i più comuni disturbi neuromuscolari con prevalenza di circa 1 su 3.500 maschi nati vivi. L'assenza di distrofina nel muscolo porta ad una malattia rapida e progressiva e i soggetti affetti perdono la capacità di camminare prima dei 12 anni.



La **BMD**, invece, mostra una progressione della malattia più lenta e variabile con una parziale residua funzione della distrofina muscolare tanto che e i pazienti possono deambulare anche oltre i 16 anni.



INTRODUZIONE

Poiché la maggior parte delle mutazioni che portano a **DMD/BMD** sono delezioni o duplicazioni intrageniche (70% circa) la diagnosi molecolare di **DMD/BMD** è notevolmente progredita negli ultimi 15 anni grazie all'introduzione della tecnica **MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)**: una tecnica in grado di identificare selettivamente i riarrangiamenti intragenici.

Il rimanente 30% di casi è causato da mutazioni puntiformi identificabili mediante il sequenziamento del DNA. La crescente applicazione del sequenziamento di nuova generazione, NGS (next generation sequencing), più rapido ed relativamente più economico rispetto al tradizionale sequenziamento con metodo di Sanger, costituisce la via più efficace per arrivare alla corretta diagnosi di **DMD/BMD**.

Questo studio descrive un'ampia analisi dello spettro di mutazioni che colpiscono il gene della distrofina in 507 ragazzi coreani affetti da **DMD/BMD**.

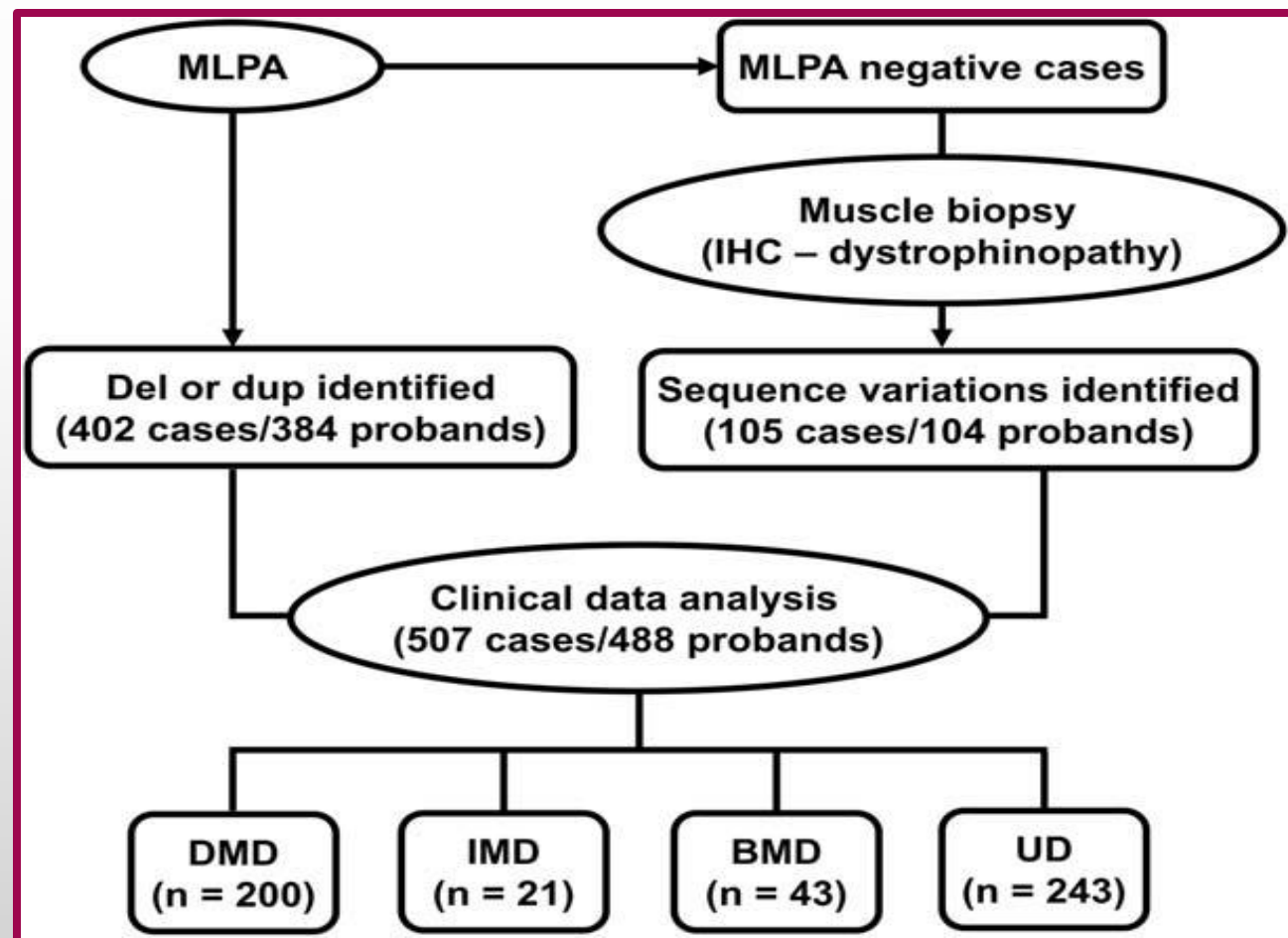
DISEGNO DEL PROCESSO DIAGNOSTICO

Lo studio è stato
approvato dal
Comitato di Revisione
dell'Ospedale
dell'Università
Nazionale di Seoul.



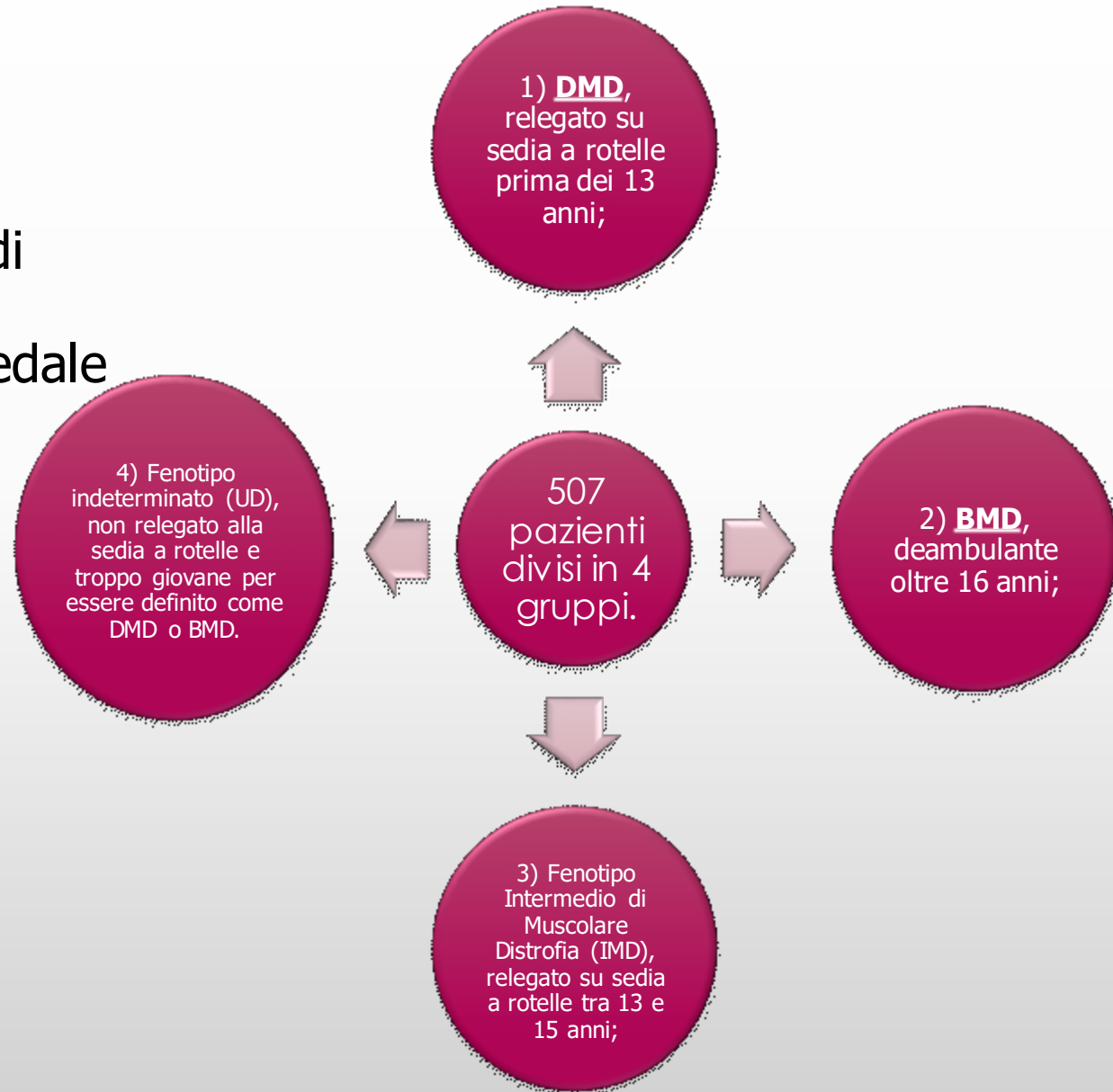
FIGURA 1. Diagramma di flusso del processo diagnostico e analisi clinica di 507 pazienti coreani DMD/ BMD.

Cho et al., 2017. Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center. *Muscle Nerve*. 55(5):727-734.



PAZIENTI

- Sono stati inclusi 507 pazienti maschi di **488** famiglie coreane, geneticamente confermati come **DMD/BMD** dall'Ospedale pediatrico dell'Università nazionale di Seoul.





MATERIALI E METODI

I. Estrazione del DNA genomico da sangue periferico.

II. Analisi delle delezioni e duplicazioni mediante MLPA (SALSA P034 Kit DMD mix 1 e P035 Kit DMD mix 2 della MRC-Holland) e separazione elettroforetica dei frammenti generati dall'amplificazione delle sonde mediante PCR su sequenziatore automatico ABI3130.

Sui **pazienti risultati negativi** alla MLPA è stata eseguita la biopsia muscolare ed esame immunohistochimico per la conferma della diagnosi di distrofinopatia.

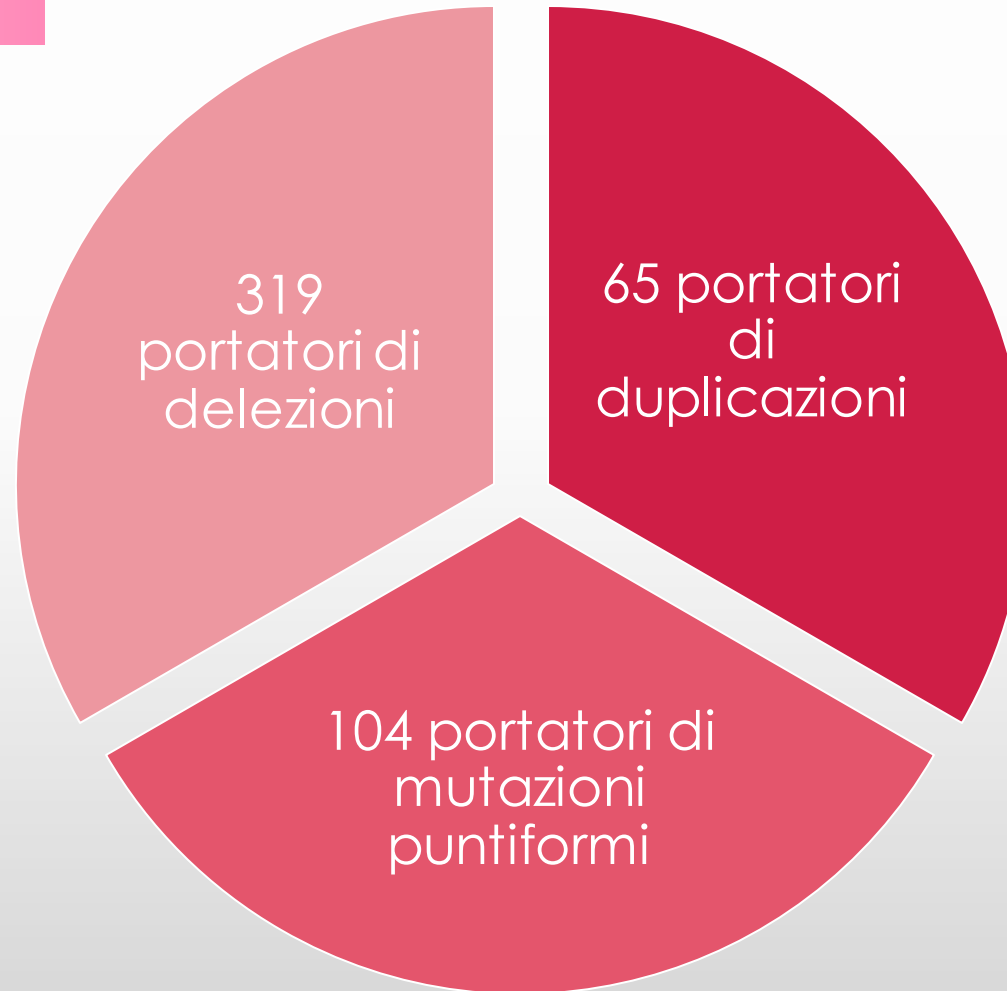
Nei **pazienti con una diagnosi di DMD/BMD** confermata, il gene della distrofina è stato sottoposto a sequenziamento diretto con metodo di Sanger.

Le nuove mutazioni identificate sono state classificate come patogenetiche (o verosimilmente patogenetiche) utilizzando alcuni softwares di predizione e seguendo le Linee Guida dell'American College of Medical Genetics.



RISULTATI

- Sono stati analizzati e caratterizzati 488 probandi:



RISULTATI

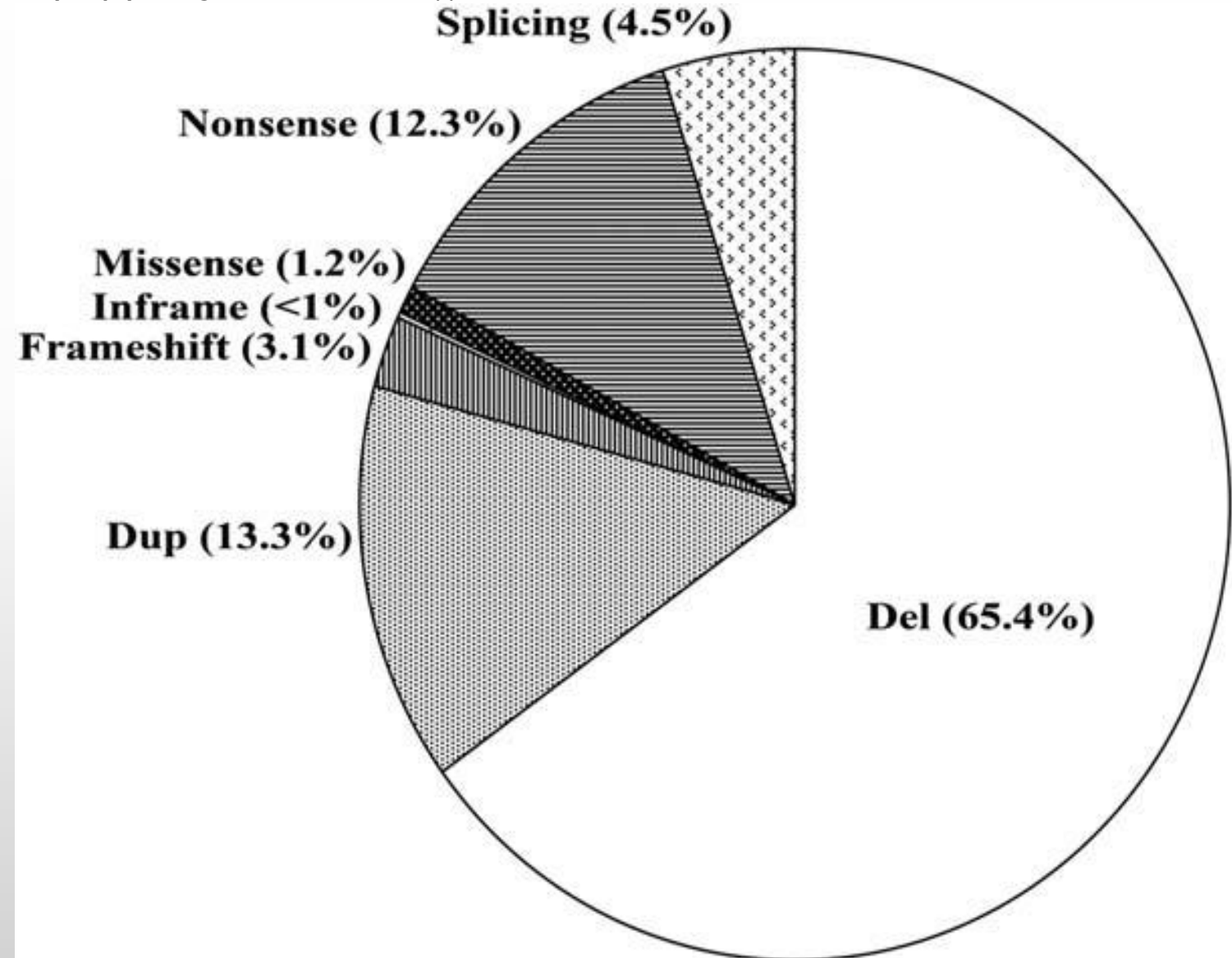
- Delezioni = 65,4%
- Duplicazioni = 13,3%
- Mutazioni Nonsense = 12,3%
- Mutazioni di Splicing = 4,5%
- Mutazioni Frameshift = 3,1%
- Mutazioni Missenso = 1,2%

Le grandi delezioni sono più frequenti nella **BMD** rispetto alla **DMD** (77,5% vs. 67,2%).

Le mutazioni nonsense sono più frequenti nella **DMD** che nella **BMD** (5,0% vs. 15,4%).

FIGURA 2. Spettro delle mutazioni nel gene della distrofina identificate in questo studio.

Cho et al., 2017. Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center. *Muscle Nerve*. 55(5):727-734.



RISULTATI

- **Frequenza delle delezioni/duplicazioni identificate in 319 probandi:**

- Delezione degli esoni 45–47 (6,3%; n=20),
- Delezione dell'esone 45 (5,6%; n=18)
- Delezione degli esoni 45–50 (5,6%; n=18)
- Duplicazione dell'esone 2 (20,0%; n=13),
- Duplicazione degli esoni 2-4 (4,6%; n=3)
- Duplicazione degli esoni 2–7 (4,6%; n=3)

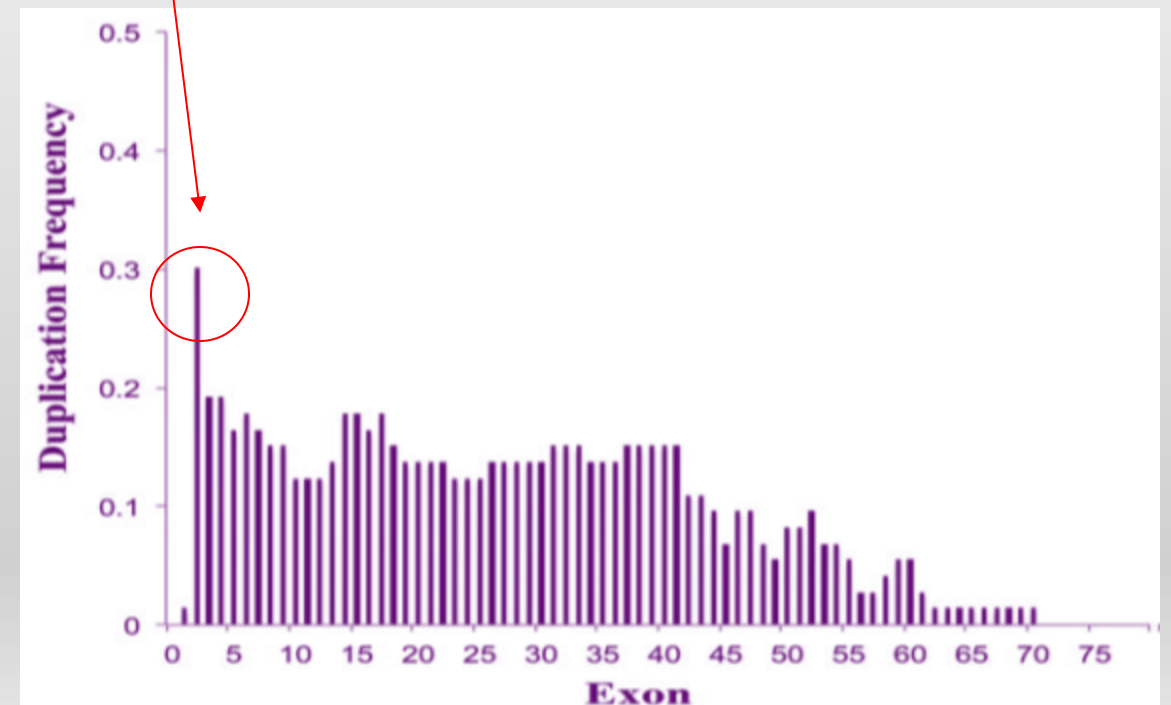
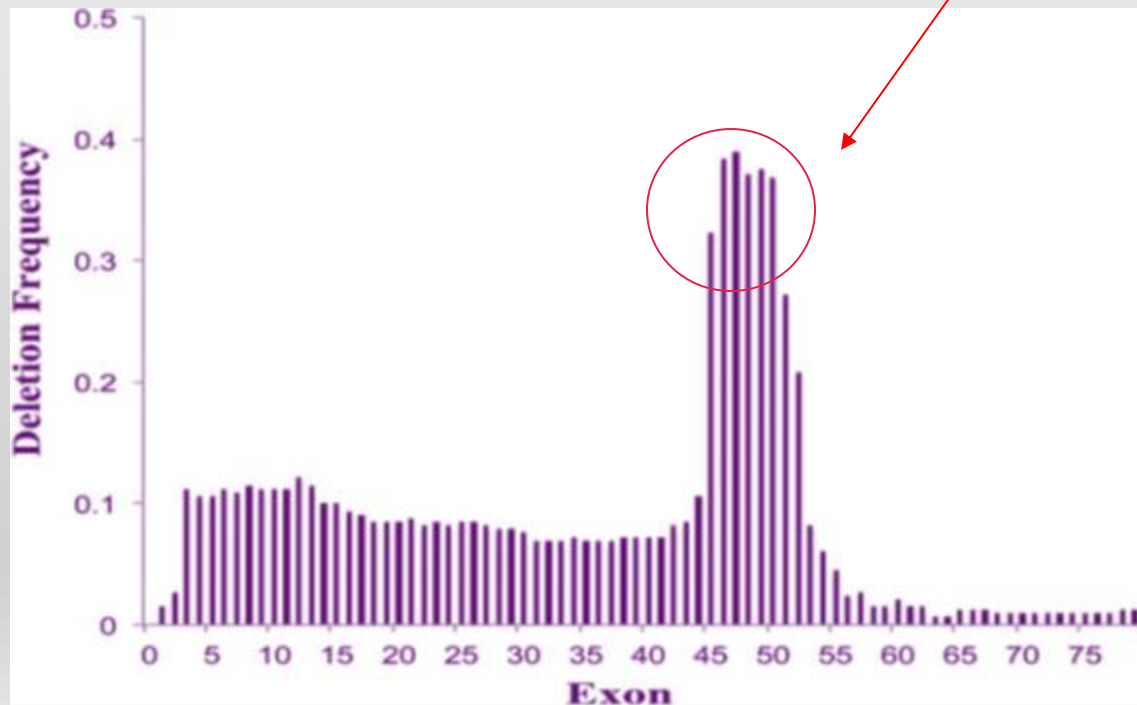


FIGURA 3. Frequenza relativa degli esoni coinvolti nelle delezioni (a sinistra) e nelle duplicazioni (a destra) rilevate in questo studio.

RISULTATI

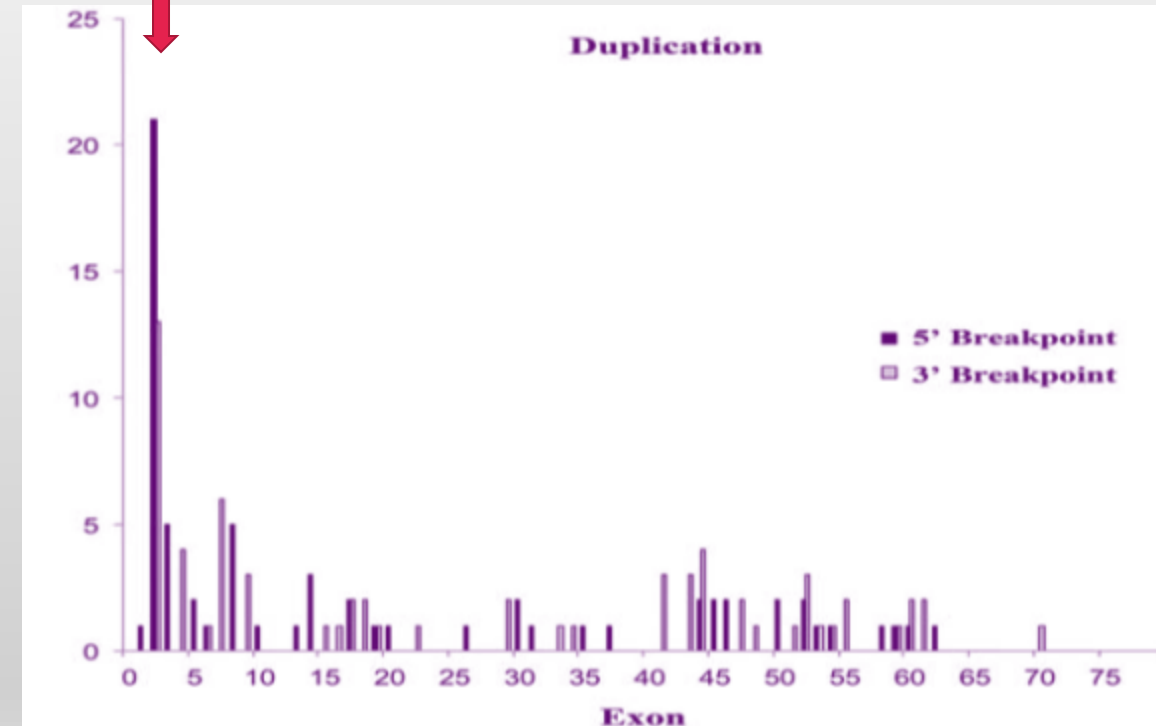
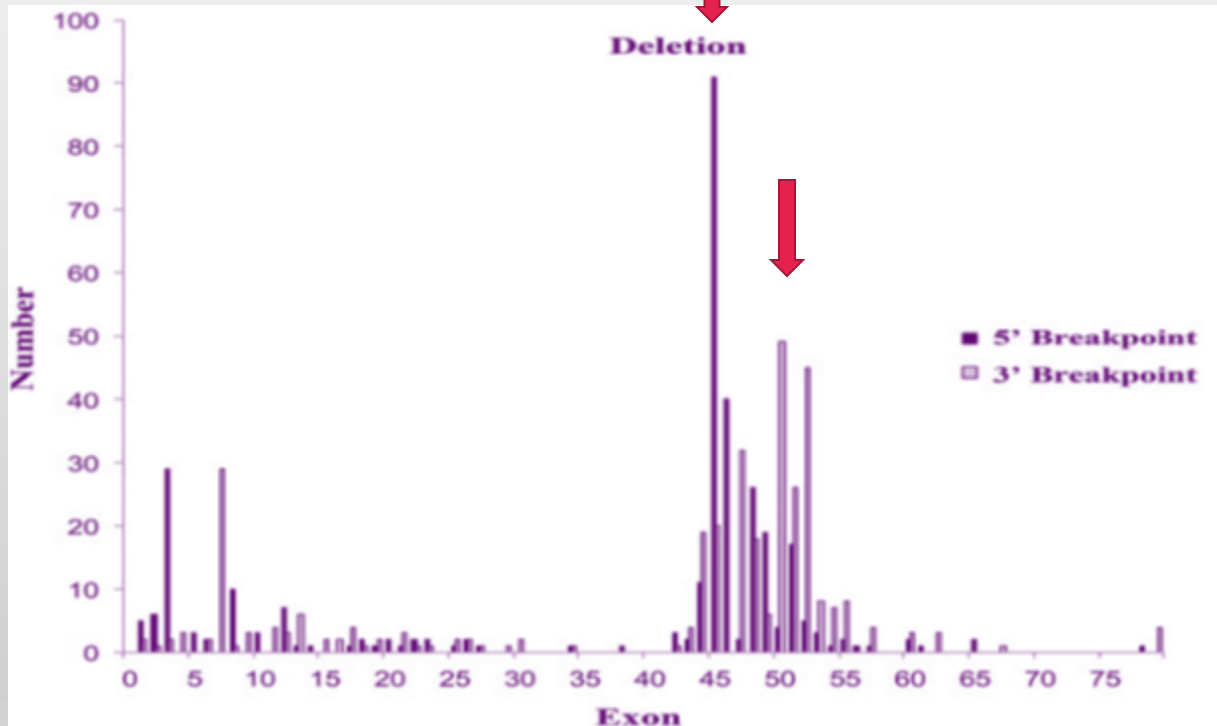


FIGURA 4. Distribuzione dei punti di rottura (breakpoints) 5' e 3' nelle delezioni (a sinistra) e nelle duplicazioni (a destra) identificati in questo studio.

CONCLUSIONI 1/2

L'introduzione di nuovi test genetici, MLPA (identificazione di delezioni e duplicazioni) e Sequenziamento di nuova generazione, NGS (identificazione di mutazioni puntiformi), ha permesso a molti pazienti di evitare una biopsia muscolare, che è uno strumento diagnostico relativamente invasivo.

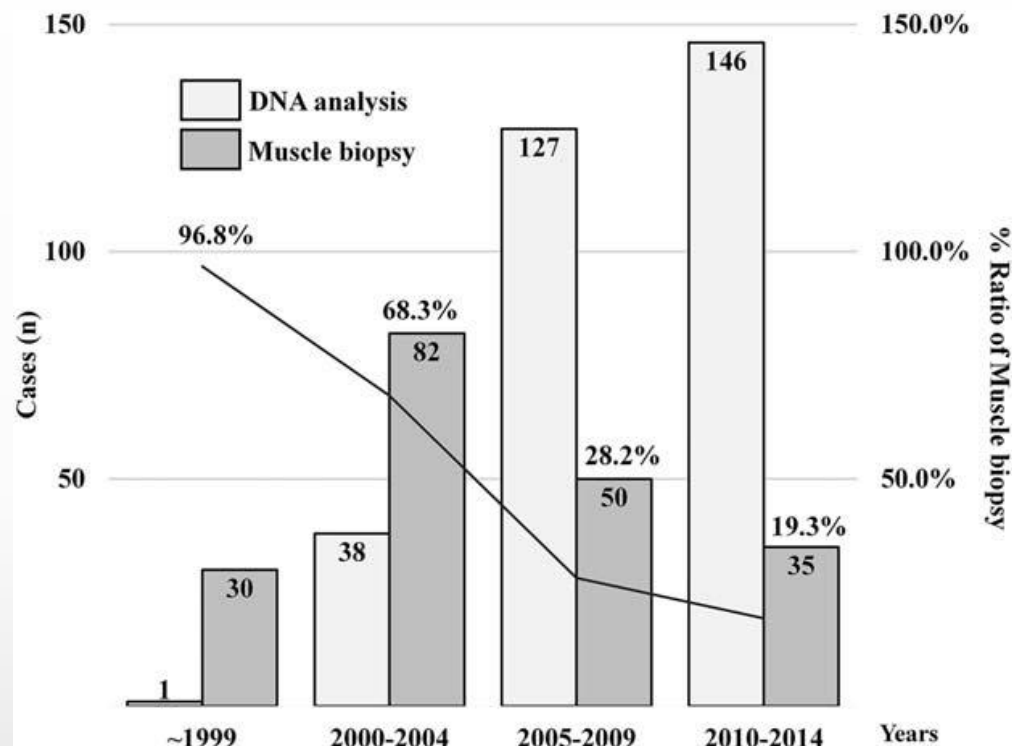


FIGURA 5. Transizione cronologica degli strumenti diagnostici in DMD/BMD. I progressi tecnici nella diagnosi molecolare hanno notevolmente ridotto la necessità di biopsie muscolari nei pazienti affetti da DMD/BMD.

Cho et al., 2017. **Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center.** *Muscle Nerve*. 55(5):727-734.

CONCLUSIONI 2/2

La precisa caratterizzazione genetica e la definizione del genotipo dei pazienti affetti da **DMD/BMD** favorisce la compilazione di Registri nazionali e internazionali da cui selezionare i pazienti che possono accedere alle sperimentazioni cliniche (Trials) per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sullo specifico genotipo (per es. la possibilità di correggere il difetto delle mutazioni nonsense sopprimendo la terminazione prematura della traduzione ristabilendo una proteina di lunghezza

normale)[Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2010;67:771-780.]

Table 1. Summary of clinical features in 507 Korean DMD/BMD patients*

	DMD	IMD	BMD	UD	Total
Number	200	21	43	243	507
Age (years)	17.0 ± 4.0	20.1 ± 4.6	24.2 ± 8.7	9.2 ± 4.2	14.0 ± 6.8
Wheelchair bound	200	21	7		228
Age (years)	9.7 ± 1.6	13.8 ± 0.8	24.7 ± 15.5		10.6 ± 4.1
CK (IU/L)	13083 ± 12222	10513 ± 8183	6113 ± 5882	14668 ± 22166	13169 ± 17633
Steroid therapy	146 (73.0%)	16 (76.2%)	20 (46.5%)	154 (63.4%)	336 (66.3%)
Age (years)	6.6 ± 3.3	7.4 ± 3.4	8.4 ± 4.8	5.8 ± 2.6	6.2 ± 3.7
Cardiomyopathy	94 (47.0%)	12 (57.1%)	15 (34.9%)	14 (5.8%)	135 (26.6%)
ACE inhibitor	87 (43.5%)	10 (47.6%)	14 (32.6%)	14 (5.8%)	125 (24.7%)
Age (years)	13.9 ± 3.2	16.8 ± 4.8	18.5 ± 2.5	11.1 ± 6.0	14.5 ± 3.9
Scoliosis	135 (67.5%)	11 (52.4%)	10 (23.3%)	28 (11.5%)	184 (36.3%)
Brace or surgery	40 (20.0%)	1 (4.8%)	1 (2.3%)	0 (0.0%)	42 (8.3%)
Age (years)	14.5 ± 1.9	18.2	21.8		14.7 ± 2.3
Respiratory dysfunction	130 (65.0%)	11 (52.4%)	4 (9.3%)	11 (4.5%)	156 (30.8%)
Ventilator support	29 (14.5%)	0 (0.0%)	1 (2.3%)	0 (0.0%)	30 (5.9%)
Age (years)	20.4 ± 4.4		23.5		

*All 507 patients were classified into 4 groups. DMD: wheelchair bound before age 13 years; BMD: ambulatory beyond age 16 years; IMD (intermediate): wheelchair bound between ages 13 and 15 years; and UD (undetermined): not wheelchair bound and too young to be diagnosed as BMD.

Cho et al., 2017. **Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center.** *Muscle Nerve*. 55(5):727-734.



BIBLIOGRAFIA



LAVORI SCIENTIFICI: Cho A^{1,2}, Seong MW³, Lim BC¹, Lee HJ³, Byeon JH^{1,4}, Kim SS^{1,5}, Kim SY¹, Choi SA¹, Wong AL¹, Lee J^{1,6}, Kim JS^{1,7}, Ryu HW¹, Lee JS^{1,8}, Kim H^{1,9}, Hwang H^{1,9}, Choi JE^{1,10}, Kim KJ¹, Hwang YS¹, Hong KH¹¹, Park S¹², Cho SI³, Lee SJ³, Park H¹³, Seo SH³, Park SS³, Chae JH¹. **Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center.** *Muscle Nerve.* 2017 May;55(5):727-734. doi: 10.1002/mus.25396.



IMMAGINI: Cho A^{1,2}, Seong MW³, Lim BC¹, Lee HJ³, Byeon JH^{1,4}, Kim SS^{1,5}, Kim SY¹, Choi SA¹, Wong AL¹, Lee J^{1,6}, Kim JS^{1,7}, Ryu HW¹, Lee JS^{1,8}, Kim H^{1,9}, Hwang H^{1,9}, Choi JE^{1,10}, Kim KJ¹, Hwang YS¹, Hong KH¹¹, Park S¹², Cho SI³, Lee SJ³, Park H¹³, Seo SH³, Park SS³, Chae JH¹. **Consecutive analysis of mutation spectrum in the dystrophin gene of 507 Korean boys with Duchenne/Becker muscular dystrophy in a single center.** *Muscle Nerve.* 2017 May;55(5):727-734. doi: 10.1002/mus.25396.