

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie a lékařské genetiky



Mgr. Zuzana Mušová

**Molekulárně genetická analýza
syndromu fragilního chromozomu X
a myotonické dystrofie**

Disertační práce

Praha 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

V Praze, 4.3.2010

Zuzana Mušová

Poděkování

Děkuji především svému školiteli prof. Ing. Zdeňku Sedláčkovi, DrSc. za odborné vedení. Děkuji, že mi umožnil nahlédnout do svého přístupu k poznání a zažít trochu vědeckého dobrodružství.

Práce vznikla v Laboratoři lékařské molekulární genetiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol. Ráda bych poděkovala přednostovi ÚBLG prof. MUDr. Milanu Mackovi, DrSc. za umožnění postgraduálního studia na ÚBLG a trvalou podporu, dále vedoucí Oddělení lékařské molekulární genetiky MUDr. Anně Křepelové, CSc. za odbornou pomoc a podporu a též kolektivu genetické poradny ÚBLG pod vedením prim. MUDr. Markéty Havlovicové.

Děkuji také kolegům neurologům MUDr. Radimu Mazancovi, CSc., MUDr. Josefu Krausovi, CSc., doc. MUDr. Edvardu Ehlerovi, CSc. a MUDr. Aleně Zumrové, PhD. za pomoc při zpracování souboru pacientů.

Dále děkuji svým kolegům RNDr. Petře Hedvičákové, RNDr. Petru Vasovčákovi, Mgr. Alžbětě Vážné, PhD., Mgr. Šárce Bendové, Mgr. Kristýně Pavlíkové a Mgr. Martě Kopečkové, PhD. za cenné rady a odbornou i lidskou pomoc a Ing. Arpádu Bódayovi a Mgr. Markétě Šutajové, PhD. za provedení DNA diagnostiky u části pacientů s myotonickou dystrofií.

Děkuji své rodině za trpělivost a stálou podporu.

Práce byla finančně podporována z výzkumného záměru MZ ČR MZOFNM2005.

Použité zkratky

A	adenin
ADHD	attention deficit/hyperactivity disorder - porucha pozornosti spojená s hyperaktivitou
APS	amonium persulfate - persulfát amonný
AR	androgenový receptor
bp	pár bází
C	cytozin
dATP	deoxyadenozin trifosfát
dCTG	deoxycytozin trifosfát
dGTP	deoxyguanozin trifosfát
DM1	myotonická dystrofie typ 1
DM2	myotonická dystrofie typ 2
DMPK	myotonic dystrophy protein kinase - protein kináza pro myotonickou dystrofii
DMSO	dimetylsulfoxid
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
DRPLA	dentatorubrání pallidolysická atrofie
dTTP	deoxytymidin trifosfát
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid - kyselina etylendiamintetraoctová
EKG	elektrokardiografie
EMG	elektromyografie
EMQN	The European Molecular Genetics Quality Network
EPM1	progresivní myoklonická epilepsie 1
FMRP	fragile X mental retardation protein - protein mentální retardace spojené s fragilním X
FRAXE	fragilní místo FRAXE asociované s mentální retardací
FRDA	Friedreichova ataxie
FSHMD1A	Facioscapulohumeral muscular dystrophy - facioskapulohumerální muskulární dystrofie 1A
FXS	syndrom fragilního chromozomu X
FXN	frataxin (inhibice exprese tohoto genu a proteinu podmiňuje FRDA)
FXTAS	Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome - syndrom tremoru/ataxie asociovaný s fragilním X
G	guanin
HD	Huntingtonova chorea
MR	mentální retardace
miRNA	mikro RNA
LR-PCR	long – range PCR
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man - databáze lidských genů a genetických chorob
OPMD	Oculopharyngeal muscular dystrophy - okulo-pharyngeální myotonická dystrofie
PCR	polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce
POF	premature ovarian failure - předčasné selhání funkce ovarií
RFLP	restriction fragment length polymorphism - polymorfismus délky restričních fragmentů
RP-PCR	repeat-primed PCR
SBMA	spinální a bulbární muskulární atrofie
SCA	spinocerebelární ataxie
SDS	sodium dodecyl sulphate - dodecylsulfát sodný
SNP	single nucleotide polymorphism - bodový polymorfismus
SPD	synpolydaktylie
STR	short tandem repeat - krátká tandemová repetice
T	tymin
TEMED	tetramethylethylenediamine - tetrametyletylendiamin
TMSO	tetrametylen sulfoxid
TP-PCR	triplet-primed PCR

Obsah

POUŽITÉ ZKRATKY	4
1. TEORETICKÝ ÚVOD	6
1.1. NEMOCI S EXPANZÍ REPETITIVNÍ SEKVENCE	6
1.2. SYNDROM FRAGILNÍHO CHROMOZOMU X	11
1.2.1. <i>Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění</i>	11
1.2.2. <i>Možnosti molekulárně genetické diagnostiky FXS</i>	14
1.3. MYOTONICKÁ DYSTROFIE TYP 1	16
1.3.1. <i>Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění</i>	16
1.3.2. <i>Možnosti molekulárně genetické diagnostiky DM1</i>	19
1.4. MYOTONICKÁ DYSTROFIE TYP 2	21
1.4.1. <i>Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění</i>	21
1.4.2. <i>Možnosti molekulárně genetické diagnostiky DM2</i>	22
2. CÍLE PRÁCE	23
3. MATERIÁL A METODY	24
3.1. SOUBORY PACIENTŮ	24
3.2. METODY	25
3.2.1. <i>Obecný popis základních metod</i>	25
3.2.2. <i>Specifikace a kombinace metod použitých k analýze FXS</i>	29
3.2.3. <i>Specifikace a kombinace metod použitých k analýze DM1</i>	31
3.2.4. <i>Specifikace a kombinace metod použitých k analýze DM2</i>	33
4. VÝSLEDKY	34
4.1. SYNDROM FRAGILNÍHO CHROMOZOMU X	34
4.1.1. <i>Optimalizace a zavedení nových metod</i>	34
4.1.2. <i>Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru</i>	37
4.1.3. <i>Doporučený algoritmus vyšetření</i>	40
4.1.4. <i>Kazuistiky FXS</i>	42
4.2. MYOTONICKÁ DYSTROFIE TYP 1	49
4.2.1. <i>Optimalizace a zavedení nových metod</i>	49
4.2.2. <i>Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru</i>	51
4.2.3. <i>Doporučený algoritmus vyšetření</i>	55
4.2.4. <i>Kazuistiky DM1</i>	56
4.3. MYOTONICKÁ DYSTROFIE TYP 2	66
4.3.1. <i>Optimalizace a zavedení nových metod</i>	66
4.3.2. <i>Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru</i>	67
4.3.3. <i>Doporučený algoritmus vyšetření</i>	68
4.3.4. <i>Kazuistiky DM2</i>	69
5. DISKUSE	71
6. ZÁVĚRY	87
7. POUŽITÁ LITERATURA	88
8. PŘÍLOHY	98
8.1. PUBLIKACE V ČASOPISECH S IF VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU PRÁCE	98
8.2. PUBLIKACE V ČASOPISECH S IF S VOLNÝM VZTAHEM K TÉMATU PRÁCE	98
8.3. PUBLIKACE V ČASOPISECH BEZ IF	99
8.4. PŘEDNÁŠKY A POSTERY	99

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Nemoci s expanzí repetitivní sekvence

Expanze nestabilních jednoduchých repetitivních sekvencí v genomové DNA představují výjimečný mechanismus vzniku lidských onemocnění. Tento typ mutace byl poprvé popsán v roce 1991 jako molekulární příčina syndromu fragilního chromozomu X a spinální bulbární muskulární atrofie (Kremer et al. 1991; La Spada et al. 1991). Od té doby bylo popsáno víc než 40 závažných neurologických, neurodegenerativních a neuromuskulárních onemocnění, která jsou zapříčiněna expanzí jednoduchých tandemových repetitivních sekvencí na specifických chromozomálních lokusech (shrnutí v Pearson et al. 2005). Pro téměř všechny tyto choroby je typická široká symptomatická variabilita od mírných forem s pozdním nástupem v dospělém věku k těžkým kongenitálním nebo dětským formám (Gomes-Pereira a Monckton 2006).

Většina těchto onemocnění je spojena s expanzí trinukleotidových repetitivních sekvencí. Do této skupiny patří syndrom fragilního chromozomu X (FXS) (Kremer et al. 1991; Verkerk et al. 1991; Yu et al. 1991) a FRAXE (Knight et al. 1993), Friedreichova ataxie (FRDA) (Campuzano et al. 1996), myotonická dystrofie typ 1 (DM1) (Fu et al. 1992; Harley et al. 1992; Mahadevan et al. 1992), spinální bulbární muskulární atrofie (SBMA) (La Spada et al. 1991), Huntingtonova nemoc (HD) (MacDonald et al. 1993), spinocerebelární ataxie typ 1, 2, 3, 6, 7, 17 (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17), dentatorubrální pallidolysická atrofie (DRPLA) a další choroby (viz review Gatchel a Zoghbi 2005; Pearson et al. 2005; Brouwer et al. 2009). Kromě trinukleotidových repetitivních sekvencí expandují ale i motivy tvořené tetranukleotidy (myotonická dystrofie typ 2, DM2) (Liquori et al. 2001), pentanukleotidy (spinocerebelární ataxie typ 10, SCA10) (Matsuura et al. 2000) nebo minisatelity (progresivní myoklonická epilepsie 1, EPM1) (Pennacchio et al. 1996). Kontrakce megasatelitu byla popsána u facioskapulohumerální muskulární dystrofie 1A (FSHMD1A) (Wijmenga et al. 1992). V Tab. 1 je uveden přehled onemocnění způsobených expanzí jednoduchých repetitivních sekvencí.

Tandemové repetitivní sekvence v genech asociovaných s těmito chorobami jsou obvykle polymorfní v obecné populaci. Normální alely mají obvykle méně než 30 repetitivních sekvencí. Expanze, které již způsobují chorobu, tzv. plné mutace, jsou nejčastěji v rozmezí 40-80 repetitivních sekvencí, ale mohou být i delší, někdy až tisíce repetitivních sekvencí. U některých

Tabulka 1: Přehled nestabilních expandujících jednoduchých repetic a asociovaných onemocnění

Patogenní mechanismus	Repetitivní sekvence	Gen	Lokus	Pozice	Normální délka	Patologická délka	Nemoc	Vliv rodiče na expanzi	Dědičnost
Ztráta funkce proteinu	(CGG) _n	<i>FMR1</i>	Xq27.3	5'UTR	5–55	>200	FXS Syndrom fragilního chromozomu X	M	X-LR
	(GGC) _n	<i>FMR2</i>	Xq28	5'UTR	6–60	>200	FRAXE MR asociovaná s FRAXE	ND	X-LR
	(GAA) _n	<i>FXN</i>	9q13	Intron 1	3-33	200–1700	FRDA Friedreichova ataxie	M	AR
Toxická RNA	(CTG) _n	<i>DMPK</i>	19q13	3'UTR	5–37	50–3000	DM1 Myotonická dystrofie typ 1	M	AD
	(CCTG) _n	<i>ZNF9</i>	3q21	Intron 1	<74	75–11000	DM2 Myotonická dystrofie typ 2	ND	AD
	(CGG) _n	<i>FMR1</i>	Xq27.3	5'UTR	5–54	55–200	FXTAS Syndrom tremoru/ataxie asociovaný s fragilním X	na	X-LD
Toxický protein	(CAG) _n	<i>AR</i>	Xq13-21	CR	9–36	38–62	SBMA Kennedyho nemoc/Spinální a bulbární muskulární atrofie	ND	X-LSL
	(CAG) _n	<i>HD</i>	4p16.3	CR	6–35	36–121	HD Huntingtonova chorea	P	AD
	(CAG) _n	<i>ATXN1</i>	6p23	CR	6–44	39–82	SCA1 Spinocerebelární ataxie typ 1	P	AD
	(CAG) _n	<i>ATXN2</i>	12q24.1	CR	14–31	34–62	SCA2 Spinocerebelární ataxie typ 2	P	AD
	(CAG) _n	<i>ATXN3</i>	14q32.1	CR	12–43	>60	SCA3 Spinocerebelární ataxie typ 3	P	AD
	(CAG) _n	<i>CACNA1A</i>	19p13	CR	5–18	20–33	SCA6 Spinocerebelární ataxie typ 6	ND	AD
	(CAG) _n	<i>ATXN7</i>	3p12-21.2	CR	7–34	>37	SCA7 Spinocerebelární ataxie typ 7	P	AD
	(CAG) _n	<i>TBP</i>	6q27	CR	25–44	45–66	SCA17 Spinocerebelární ataxie typ 17	ND	AD
	(CAG) _n	<i>DRPLA</i>	12p13.31	CR	7-25	49-88	DRPLA Dentatorubrální pallidolysická atrofie	P	AD
	(GCG) _n	<i>PABPN1</i>	14q11.2-q13	CR	10	12-17	OPMD Okulofaryngeální muskulární dystrofie	na	AD/AR
Nejistý	(CTG) _n	<i>KLHL1AS</i>	13q21	3'UTR	16–34	>100	SCA8 Spinocerebelární ataxie typ 8	M	AD
	(ATTCT) _n	<i>ATXN10</i>	22q13	Intron 1	<29	>800	SCA10 Spinocerebelární ataxie typ 10	ND	AD
	(CAG) _n	<i>PPP2R2B</i>	5q31-32	5'UTR	<32	51–78	SCA12 Spinocerebelární ataxie typ 12	ND	AD
	(CTG) _n	<i>JPH3</i>	16q24.3	CR/3'UTR	6–27	41–58	HDL2 Huntingtonova nemoc typ 2	ND	AD

Převzato a upraveno z review (Brouwer et al. 2009) a doplněno z (Pearson et al. 2005; Gomes-Pereira a Monckton 2006; Slean et al. 2008).

Legenda: CR kódující oblast, UTR nepřekládaná oblast, M k expanzím dochází přednostně a/nebo jsou větší při maternálním přenosu alely, P při paternálním přenosu, AR autozomálně recesivní, AD autozomálně dominantní, X-LR X-vázaná recesivní, X-LD X-vázaná dominantní, X-LSL= X-vázaná limitovaná pohlavím, ND nedostatečné údaje, na neaplikovatelné

nemocí existuje ještě kategorie premutací. Jsou to obvykle repetice střední délky, které jsou vysoce nestabilní při mezigeneračním přenosu, ale samy onemocnění nezpůsobují (i když někdy mohou být spojeny s určitým charakteristickým fenotypem) (Gatchel a Zoghbi 2005).

Molekulární patogeneze těchto onemocnění je primárně závislá na lokalizaci repetice uvnitř příslušných genů. U polyglutaminových onemocnění jsou expandované repetice CAG lokalizovány v kódujících exonech a způsobují vznik abnormálních proteinů obsahujících polyglutaminový segment, které se stávají pro buňku toxickými. Do této skupiny chorob patří např. HD, SCA1, SCA2, SCA3, SCA7, SCA17, SBMA a DRPLA. Expandované repetice v nekódujících oblastech genů (promotory, nepřekládané oblasti, introny) buď suprimují expresi genů a způsobují recesivní choroby jako FXS nebo FRDA, nebo produkují mRNA se změněnými vlastnostmi, které v buňkách vychytávají RNA-vázající proteiny. To může vést ke vzniku ribonukleárních inkluzí a poruch alternativního sestřihu jiných transkriptů (např. u DM1 a DM2 nebo u syndromu tremoru/ataxie asociovaném s fragilním X (FXTAS)) (Gatchel a Zoghbi 2005). Polyalaninová onemocnění vykazují expanze motivů tvořených různými tripletami kódujícími alanin, zejména v genech pro transkripční faktory, jejichž změněná funkce pak ovlivňuje vývojovou expresi celých skupin genů, např. u synpolydaktylie (SPD) a okulo-pharyngeální myotonické dystrofie (OPMD) (shrnutí v Messaed a Rouleau 2009). OPMD je ale jedinou nemocí z této skupiny, na jejímž vzniku se podílí výhradně zmnožení tripletů. U dalších polyalaninových nemocí se uplatňují také jiné mutace, jako delece, duplikace a substituce (Messaed a Rouleau 2009). Na vzniku FSHMD1A se podílí epigenetický mechanismus - kontrakce megasatelitu ovlivňuje regulaci genů vzdálených až megabáze od této mutace a zároveň je snížen počet kopií homeoboxového genu *DUX4* vloženého do megasatelitu (Slean et al. 2008).

Na rozdíl od klasických stabilních mutací, které se nemění při přenosu na potomstvo a udržují se v nezměněném stavu i v somatických tkáních, jsou expanzní mutace nestabilní při přenosu na potomstvo (intergenerační instabilita) a délka elongované repetice se může lišit v různých tkáních jedince (somatický mozaicismus). Míru intergenerační instability v délce repetice ovlivňují kombinace cis-faktorů, jako jsou délka, typ, sekvenční kontext a možné vyšší struktury DNA repetice nebo její sekvenční čistota, a trans-faktorů, jako je pohlaví rodiče,

epigenetické prostředí, transkripční aktivita buněk a tkání, dostupnost replikačních, transkripčních a reparačních faktorů a přítomnost vazebných míst pro regulační proteiny v okolí repetice (Gomes-Pereira a Monckton 2006; Libby et al. 2008). Zásadní vliv na stabilitu repetice při přenosu na další generaci má ale délka alely. Krátké normální alely jsou při přenosu na potomstvo velmi stabilní. Mutační frekvence však dramaticky narůstá se zvyšující se délkou repetice. U delších normálních alel stoupá pravděpodobnost délkové změny na 5 nebo i více procent na generaci, ale délkové změny jsou omezeny na jednu nebo několik málo repetitivních jednotek (Zhang et al. 1994; Leeflang et al. 1999). Jakmile však délka repetice přesáhne určitou hranici, alela se stane vysoce nestabilní a má silnou tendenci se dále prodlužovat (Fu et al. 1991; Brook et al. 1992; Orr et al. 1993). Tato tendence k prodlužování elongovaných alel při přenosu na další generaci spolu s pozorovanou skutečností, že čím je expanze větší, tím je onemocnění závažnější a nástup prvních symptomů časnější, zapříčiňují jev známý jako genetická anticipace (Harper et al. 1992). Tu poprvé popsal v roce 1918 švýcarský oftalmolog Bruno Fleitcher u DM1, ale příčina tohoto fenoménu byla pochopena až po odhalení molekulární podstaty trinukleotidových chorob počátkem devadesátých let 20. století (Kremer et al. 1991; La Spada et al. 1991; Verkerk et al. 1991; Yu et al. 1991).

V závislosti na typu repetitivní sekvence vytvářejí úseky s opakujícími se trinukleotidy, tetranukleotidy či pentanukleotidy různě stabilní non-B konformační struktury DNA, které jsou pokládány za hlavní příčinu genetické instability. Tyto struktury, jako vlásenky, sklouznutá vlákna, triplexy, tetraplexy a tzv. lepivá DNA jsou typické pro danou repetici a mají různou stabilitu (Wells et al. 2005). Tvoří se při rozplétání dvoušrobovice (např. při replikaci či transkripci) a jsou též cílem různých proteinů včetně reparačních (Jaworski et al. 1995; Pearson et al. 1997; Jung a Bonini 2007; Lin et al. 2009). Proto se tedy dle současných představ repetice prodlužují zejména právě při procesech replikace, transkripce a reparace. Do tvorby expanze se ale zapojují i proteiny fungující v procesech remodelování chromatinu nebo regulační faktory genomového imprintingu (Libby et al. 2008).

Samotná nukleotidová sekvence repetice také ovlivňuje její stabilitu. Pokud je trinukleotidová repetice přerušena jinými triplety, mohou tyto sloužit jako kotva a stabilizovat repetici vůči slouznutí a expanzi (Chung et al. 1993; Eichler et al. 1994).

Většina normálních alel genů *FMR1*, *ATXN1* a *ATXN2* má pravidelnou strukturu repetice CGG resp. CAG přerušenu aspoň jedním tripletem AGG, CAT nebo CAA. Většina expandovaných alel naopak obsahuje čistou, nepřerušenu repetici, ve které dochází k expanzi (Chung et al. 1993; Eichler et al. 1994; Choudhry et al. 2001).

Bylo zjištěno, že mezigenerační změna délky alel může být také ovlivněna pohlavím rodiče, který alelu předává. Například u FXS se premutace prodlužuje do plné mutace výhradně při přenosu přes matku (Fu et al. 1991). U HD se naopak elongovaná alela zpravidla více prodlužuje při přenosu přes otce a způsobuje závažnější juvenilní formu onemocnění u potomků těchto mužů (Telenius et al. 1993; Trottier et al. 1994). Jsou však popsány i juvenilní formy HD pocházející z maternální expanze (Nahhas et al. 2005). U DM1 se expanze s 40-80 CTG prodlužují při přenosu od otce, zatímco alely delší než 80 CTG expandují zejména při přenosu přes matku (Brunner et al. 1993). U FRDA mají expanze kratší než 100 repetit tendenci k prodlužování od obou pohlaví, ale alely delší než 200 GAA se prodlužují při maternálním přenosu a při paternálním mají naopak tendenci kontrahovat (De Michele et al. 1998). Mechanismus vlivu pohlaví na intergenerační dynamiku alel zatím nebyl objasněn. Předpokládá se, že zvyšující se tendence k prodlužování u žen ve srovnání s muži by mohla být výsledkem účinnější selekce proti dlouhé alele ve spermatogenezi (Jansen et al. 1994). Proti tomu ale svědčí fakt, že velké germinální expanze byly popsány i u mužů s DM1. Nebyl ani prokázán účinek věku na germinální mutační frekvenci u HD a DM1 (Martorell et al. 2004).

Další obecnou vlastností expandovaných repetit je somaticky mozaicismus, tj. různá délka expanze v různých somatických buňkách. Somatický mozaicismus může být tkáňově specifický a může narůstat s věkem. Ve specifických tkáních mají některé expanze tendenci k extrémnímu prodloužení, např. expanze u pacientů s HD v buňkách bazálních ganglií mozku (Kennedy et al. 2003) nebo expanze u pacientů s DM1 ve skeletálních svalech (Anvret et al. 1993). Prodlužování expanzí v těchto postmitotických tkáních, kde jsou příslušné geny obzvláště aktivní, svědčí pro významnou roli transkripce při tvorbě expanzí (Gomes-Pereira a Monckton 2006). U některých onemocnění expanze v určitých tkáních naopak kontrahují, např. u FRDA v periferních leukocytech (Sharma et al. 2002) a u mužů s plnou mutací FXS v germinálních buňkách (Reyniers et al. 1999).

1.2. Syndrom fragilního chromozomu X

1.2.1. Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění

Syndrom fragilního chromozomu X (FXS, OMIM 300624) je nejčastější monogenní příčinou mentální retardace s odhadovanou četností 1 na 4000-9000 mužů a 1 na 7000-15000 žen (Crawford et al. 2001). V roce 1969 byl odhalen aberantní chromozom X u pacienta z rodiny s gonozomálně dědičnou mentální retardací popsané v r. 1943 Martinem a Bellovou (Martin a Bell 1943; Lubs 1969). Až o 10 let později byl tento nález reprodukován v médiu chudém na kyselinu listovou (Sutherland a Ashforth 1979). Poté byla tato jednotka, předtím označovaná jako syndrom Martina a Bellové, pojmenována syndrom fragilního chromozomu X. Také v naší populaci byl FXS cytogeneticky potvrzen u mnoha pacientů (Seemanova et al. 1982; Macek et al. 1983; Seemanova et al. 1985; Seemanova et al. 1987). Pozorování rodin s FXS odhalilo některé zvláštní jevy, jako že nemoc je přenášena nejen asymptomatickými ženami, ale i muži (normální transmitující muži) (Fryns a van den Berghe 1982). Proto byla vyslovena hypotéza premutace, která vysvětlovala přenašečství u mužů (Pembrey et al. 1985). Stále ale bylo zvláštní, že dcery normálních transmitujících mužů nejsou nikdy postižené, ale jsou často matkami závažně postižených mužů, a že riziko manifestace onemocnění se zdálo být závislé na pozici v rodokmenu a zvyšovalo se v následujících generacích (Sherman et al. 1985).

Vysvětlení přišlo až v roce 1991 s odhalením molekulární podstaty této afekce, která je způsobená expanzí polymorfní repetice trinukleotidu CGG v 5' nepřekládané oblasti genu *FMR1*. Gen je 38 kb dlouhý, obsahuje 17 exonů a je lokalizován v chromozomální oblasti Xq27.3 (Verkerk et al. 1991; Yu et al. 1991). FXS tak byl prvním onemocněním, u kterého byla prokázána expanze trinukleotidů s klinickými následky. Normální alely jsou polymorfní s délkou 6-50 tripletů CGG, převážně obsahující přerušení AGG, a jsou stabilní při přenosu do následující generace (Fu et al. 1991; Eichler et al. 1994). Alely v rozmezí 51-58 CGG (intermediární alely) jsou mírně nestabilní a donedávna nebyla v jedné generaci zaznamenána taková změna délky, která by vedla k plné mutaci a FXS (Eichler et al. 1994; Biancalana et al. 2006). Nově byl ale takový případ popsán u alely s délkou 55 CGG bez přerušení AGG (Fernandez-Carvajal et al. 2009). Naproti tomu alely s 59-200 CGG

(premutace) jsou velmi nestabilní a prodlužují se do plné mutace (počet CGG větší než 200) výhradně při maternálním přenosu (Fu et al. 1991), přičemž riziko expanze do plné mutace stoupá s velikostí maternální premutace (Heitz et al. 1992; Fisch et al. 1995). Plné mutace jsou obvykle spojeny s hypermetylací genu *FMR1*, která způsobuje jeho inaktivaci a nedostatek jeho proteinového produktu, RNA-vázacího proteinu FMRP (Heitz et al. 1991; Oberle et al. 1991). Byly popsány vzácné případy FXS způsobené delecí části nebo celého genu *FMR1*, která se obvykle objevuje v kontextu s expanzí (Coffee et al. 2008), nebo bodové mutace v kódující oblasti genu *FMR1*, které mají za následek chybění FMRP a fenotyp identický s FXS způsobeným expanzí repetice CGG (De Boulle et al. 1993; Lugenbeel et al. 1995; Wang et al. 1997). FMRP působí jako translační represor na synapsích, zejména v mozkové kůře, mozečku a hipokampu (Laggerbauer et al. 2001; Zalfa et al. 2003), kde ovlivňuje jejich plasticitu a funkci regulací translace proteinů, které se podílejí na růstu, morfologii a fungování synapsí (Bagni a Greenough 2005).

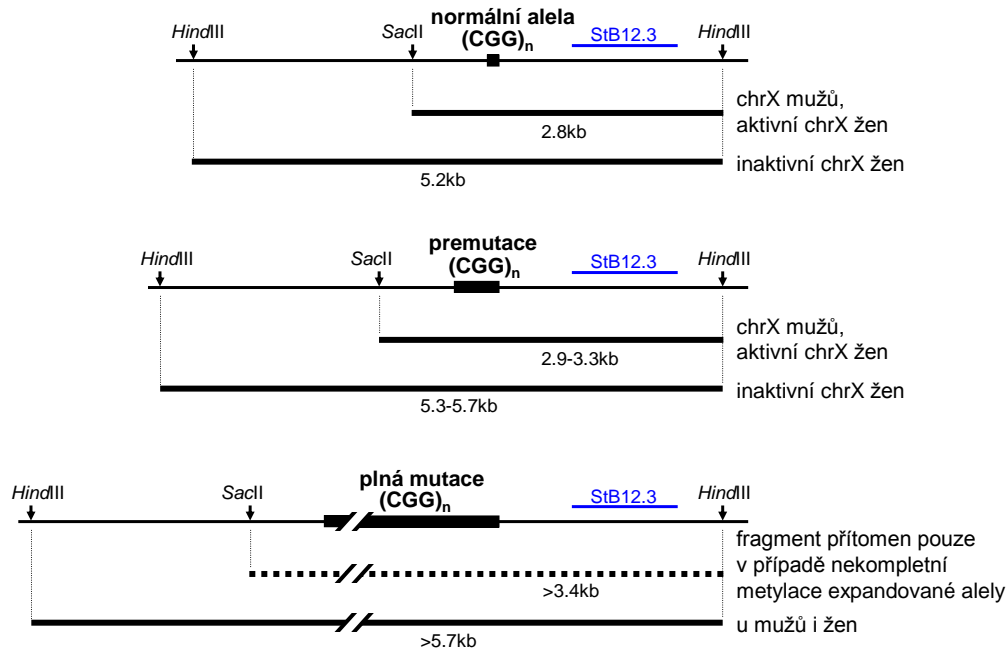
Postižení chlapci s plnou mutací mají mírné dysmorfické črty (protáhlý obličej, makrocefalii s prominencí čela a brady, velké a antevertované uši), abnormality pojivové tkáně (hyperextenzibilitu kloubů, zejména ruky), prolaps mitrální chlopně a makroorchismus konstantně přítomný po pubertě. V raném dětství se může projevat hypotonie. Přibližně u 2% chlapců s FXS se vyskytuje rozštěp patra. Děti s FXS mají také charakteristický behaviorální profil, někdy s autistickými rysy, a zaostávají vývojově, kognitivně, jazykově (dyslalie, echolalie, logorhea) i motoricky. S FXS je také často spojena hyperaktivita a porucha soustředění, chybění očního kontaktu, stydlivost, agresivita, sebepoškozování, epilepsie, úzkost a deprese (Garber et al. 2008). Ženy s plnou mutací mají variabilní, vesměs mírnější fenotyp díky částečné aktivitě normální alely genu *FMR1* z druhého chromozomu X. Přibližně 25% z nich má mentální retardaci (IQ<70) (Bennetto et al. 2001), ale většina má IQ na spodní hranici normálu (75-90) a behaviorální problémy (Jacquemont et al. 2007). Mozaicismus v délce repetice a případně i metylační mozaicismus mohou vést k méně závažnému fenotypu i u mužů s plnou mutací. Stupeň IQ u pacientů s FXS koreluje u obou pohlaví s koncentrací FMRP v krvi (Tassone et al. 1999; Loesch et al. 2004).

Alely v premutačním rozmezí (59-200 opakování CGG) mají prevalenci v kavkazské populaci 1/1000 u mužů a 1/246-1/468 u žen (Crawford et al. 2001). Premutace nebyly dle původní definice spojovány s klinickým fenotypem, ale pouze s nestabilitou při maternálním přenosu a možností expandovat v další generaci do plné mutace. Později se ale zjistilo, že asi u 20% přenašeček premutace se objeví předčasné selhání funkce ovárií (POF, ukončení periody ve věku 40 let nebo dříve) nebo časná menopauza (menopauza ve věku 45 let nebo dříve), obzvláště u premutací delších než 70 CGG (Allingham-Hawkins et al. 1999; Sherman 2000; Sullivan et al. 2005). V roce 2001 bylo u starších mužů s premutací popsáno neurodegenerativní onemocnění FXTAS (syndrom tremoru/ataxie asociovaný s fragilním X), charakterizované progresivním akčním tremorem, ataxií a kognitivním deficitem (Hagerman et al. 2001). Později bylo upřesněno, že onemocnění se objevuje převážně u mužů s premutací delší než 70 CGG (Jacquemont et al. 2006), a pravděpodobnost projevu onemocnění s věkem stoupá (Jacquemont et al. 2004). Na patogenezi FXTAS se pravděpodobně podílejí toxicita mRNA nesoucí premutaci a zvýšení hladiny *FMR1* mRNA nebo také mírné snížení hladiny FMRP u přenašečů premutace (Tassone et al. 2000; Jacquemont et al. 2007). Toxický efekt mRNA podporují též nálezy intranukleárních inkluzí v neuronech a astrocytech mozku, které obsahují *FMR1* mRNA (Greco et al. 2002). Studie na drozofilách exprimujících transkripty s prodlouženými trakty repeticí CGG poukazují na narušení funkce některých RNA-vázajících proteinů (Jin et al. 2007; Sofola et al. 2007).

1.2.2. Možnosti molekulárně genetické diagnostiky FXS

Molekulárně genetická analýza FXS je možná metodou přímé amplifikace repetice CGG v genu *FMR1* pomocí primerů komplementárních k jedinečným sekvencím ležícím na protilehlých stranách repetice metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Standardní PCR však amplifikuje pouze normální alely a krátké premutace do délky asi 100 tripletů CGG. Proto byly vyvinuty různé modifikace PCR, které amplifikují i delší expanze. Pro přesnou analýzu počtu opakování CGG u kratších hraničních alel je možno použít sekvenování PCR produktu. Tato metoda poskytne i informaci o přítomnosti či nepřítomnosti přerušení repetice jinými triplety (AGG), které mají zásadní vliv na stabilitu repetice při přenosu do další generace.

Dlouhé expanze repetice CGG v genu *FMR1* je možno detekovat též metodou Southernova blotu. Ta se používá zejména u mužů, u kterých se nedaří amplifikovat žádný produkt. Využívá se ale také u žen, u kterých PCR prokáže přítomnost jedné normální alely, a je třeba rozhodnout, zda se jedná o homozygotku pro normální alely identické délky, nebo o heterozygotku s normální alelou na jednom a neamplifikovatelnou expanzí na druhém chromozomu X. K analýze se nejčastěji využívá restriční štěpení enzymy *HindIII* nebo *EcoRI*, které produkují normální fragmenty přibližné délky 5,2 kb, nebo patřičně prodloužené fragmenty (u premutací na 5,3-5,7 kb, u plných mutací na více než 5,7 kb). Naštěpená genomová DNA je separována v agarózovém gelu a poté přenesena na membránu. Specifické fragmenty genu *FMR1* pak mohou být vizualizovány hybridizací s některou ze sond, např. StB12.3, pE5.1, Ox1.9 nebo Ox0.55, vyvinutou pro diagnostiku FXS (Rousseau et al. 1992). Kromě identifikace expanzí a určení jejich přibližné velikosti umožňuje Southernova metoda také zjištění metylačního stavu alel genu *FMR1*. Dvojitě štěpení kombinací enzymů *HindIII* (alternativně *EcoRI*) a metylsenzitivního enzymu *SacI* (alternativně *BssHII*, *EagI*) a detekce příslušnou sondou (např. StB12.3, Ox1.9 nebo Ox0.55) umožňuje rozlišení metylovaných a nemetylovaných fragmentů (Rousseau et al. 1991; Rousseau et al. 1992). To má diagnostický význam, protože plná mutace v genu *FMR1* je obvykle asociována s metylací expandované alely. Situaci při použití enzymů *HindIII* a *SacI* a sondy StB12.3 znázorňuje Obr. 1.



Obrázek. 1: Schematické znázornění restričních fragmentů, vznikajících po štěpení *HindIII* a *SacI* a jsou detekovány hybridizací se sondou *StB12.3*. Absence metylace vede u mužů s normální alelou genu *FMR1* ke vzniku fragmentu délky 2,8 kb. U mužů s premutací, která je také nemetylovaná, má fragment délku 2,9-3,3 kb. Muži s plnou mutací mají v důsledku metylace *SacI* místa pouze fragment delší než 5,7 kb, ale v případě somatického mozaicismu se mohou objevit různé další metylované i nemetylované fragmenty. Žena se dvěma normálními alelami *FMR1* má díky metylaci inaktivního chromozomu X fragmenty o délce 2,8 kb a 5,2 kb. Žena s premutací má navíc prodloužené fragmenty o délce 2,9-3,3 kb a 5,3-5,7 kb. Žena s plnou mutací má navíc fragmenty delší než 5,7 kb, v případě mozaicismu i další fragmenty.

Pro zjištění metylačního stavu promotoru genu *FMR1* byly vyvinuty i různé metylsensitivní PCR (Weinhausel a Haas 2001). Jejich použití je však problematické zejména u žen s FXS, protože analýzu komplikuje metylovaná normální alela na inaktivním chromozomu X.

Vazebná analýza pomocí polymorfních DNA markerů z oblasti Xq27.3 se využívá zejména při prenatální diagnostice pro vyloučení kontaminace materiálu plodu mateřskou DNA, nebo v případech, kdy je třeba zjistit rodičovský původ alel nebo ověřit sdílení jednotlivých alel mezi sourozenci. Jsou využívány zejména mikrosatelitové polymorfní markery (DXS548, DXS297, FRAXAC1, FRAXAC2, DXS8091), které přiléhají k repetici CGG v genu *FMR1* (Richards et al. 1991a; Richards et al. 1991b; Riggins et al. 1992; Zhong et al. 1993; Vaisanen et al. 1996).

1.3. Myotonická dystrofie typ 1

1.3.1. Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění

Myotonická dystrofie typ 1 (DM1, OMIM 160900), poprvé popsána v roce 1909 Steinertem a nezávisle na něm Battenem a Gibbem (Batten a Gibb 1909; Steinert 1909), je autozomálně dominantně dědičné multisystémové onemocnění postihující kosterní i hladké svaly, ale také oči, srdce, endokrinní systém a centrální, případně periferní nervový systém. Patří mezi nejčastější formy muskulární dystrofie dospělých s odhadovanou incidencí 1:8000 (Harper 2001). Vyznačuje se neúplnou penetrancí s typickým nástupem mezi 20. až 40. rokem života a vysoce variabilním klinickým obrazem. Postižení svalů je charakterizované myotonií, která se projevuje poruchou relaxace svalu po volné kontrakci, slabostí začínající od distálních svalů, která se postupně rozšiřuje i na proximální svaly, atrofií distálních svalů rukou a nohou a atrofií svalů obličeje, která způsobuje typickou facies s častou ptózou očních víček. U pacientů s DM1 se mohou objevit také katarakta (často jako jediný příznak), diabetes, hypogonadismus, atrofie gonád a frontální pleš u mužů, dysfunkce štítné žlázy, porucha srdečního rytmu, kardiomyopatie či ischemická choroba srdeční, polyneuropatie, snížené IQ, poruchy socializace, deprese i hypersomnolence (Harper 2001). Kongenitální forma je spojená s těžkou respirační insuficiencí a s „hadrovitou“ svalovou hypotonií novorozence („floppy infant“) a může být letální. Postiženým rodičem je vždy matka a kongenitální forma se vyskytuje u 25% potomstva matek postižených DM1 (Harper 2001), přičemž matky nemusí mít v době porodu rozvinuté svalové obtíže. Genetická anticipace charakterizovaná dřívějším nástupem nemoci a těžšími symptomy v následujících generacích byla v rodinách s DM1 popsána již v druhé dekádě 20. století, avšak příčina tohoto jevu byla zjištěna až na počátku 90. let 20. století s objevem molekulární podstaty onemocnění (Fu et al. 1992; Harley et al. 1992; Mahadevan et al. 1992; Shaw et al. 1993).

DM1 je zapříčiněná expanzí repeticce CTG lokalizované v 3' netranslatované oblasti terminálního 15. exonu genu *DMPK*. Gen má délku 13 kb a mapuje na chromozom 19 do regionu 19q13.2-13.3 (Fu et al. 1992; Harley et al. 1992; Mahadevan et al. 1992; Shaw et al. 1993). V normální populaci počet opakování CTG kolísá mezi 5-35 CTG. Za patologickou se považuje délka překračující 50 CTG (Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992; IDMC 2000). Byla

pozorována korelace mezi délkou alely a závažností a věkem nástupu nemoci. Pacienti s minimální formou DM1 mají 50-150 repetit CTG, pacienti s klasickými projevy DM1 mají 100-1000 repetit CTG, u kongenitálních forem choroby překračují expanze délku 2000 repetit CTG (IDMC 2000; Salehi et al. 2007). Délka repetice mezigeneračně narůstá, což je příčinou genetické anticipace (Ashizawa et al. 1992; Harley et al. 1992). Alely s délkou 40-80 CTG expandují, pokud jsou přenášeny muži, zatímco delší alely výrazněji expandují při maternálním přenosu (Brunner et al. 1993). Méně častou událostí je kontrakce expandované repetice, ke které dochází v rodinách s DM1 s frekvencí 4,2-6,4% (Ashizawa et al. 1994; Salehi et al. 2007).

Mutace v genu *DMPK* je rozšířená po celém světě (shrnutí v Tishkoff et al. 1998). Kromě jediného případu rodiny ze subsaharské Afriky se všechny expandované alely vyskytují na haplotypu s Alu(+) variantou polymorfni inzerce bloku repetit Alu 5 kb telomericky od repetice CTG (Harley et al. 1992; Imbert et al. 1993; Mahadevan et al. 1993; Neville et al. 1994) a s alelami HinfI(+) a TaqI(+) dvou klasických RFLP z této oblasti. Tento haplotyp (+++) označily srovnávací studie jako ancentrální (Tishkoff et al. 1998). Je přitom ale zajímavé, že 15% alel genu *DMPK* delších než 18 CTG se v neafrických populacích vyskytuje na jiném haplotypu než (+++). Otázka predispozice haplotypu (+++) k expanzi je sporná, protože je s ním spojena také nejčastější alela 5 CTG (Tishkoff et al. 1998). Nejpravděpodobnější je, že původní událostí byla změna na jediném nebo několika málo chromozomech (Imbert et al. 1993; Goldman et al. 1994), s velmi pozvolným driftem delších normálních alel do instabilního rozsahu, přičemž novější haplotypy pravděpodobně neměly dostatek času pro dosažení expanze (Tishkoff et al. 1998).

Gen *DMPK* kóduje serin-treoninovou protein kinázu DMPK (myotonic dystrophy protein kinase) (Dunne et al. 1994; Timchenko et al. 1995). Exprimuje se zejména ve specializovaných buněčných strukturách kosterních a srdečních svalů, kde se účastní intracelulárního vedení a přenosu signálu. Kináza DMPK je úzce spojená s cAMP-dependentními a Rho-vázajícími protein kinázami, které hrají důležitou roli v organizaci cytoskeletu a v dalších buněčných procesech včetně intracelulárního transportu a metabolismu (Ridley 2001; Furukawa et al. 2005). Bylo prokázáno, že substrátem DMPK *in vitro* je např. phospholemman, membránový protein, který indukuje tok Cl⁻ iontů (Mounsey et al. 2000), a též fosfatáza myozinu,

kteřá inhibuje kontrakci hladkého svalstva defosforylací myozinových vláken (Muranyi et al. 2001).

Vliv expandované repetice CTG na klinickou manifestaci onemocnění vysvětlují v současnosti tři základní modely, které pravděpodobně fungují simultánně (Kaliman a Llagostera 2008). Jednak je to snížená hladina *DMPK* mRNA a proteinu ve svalech pacientů s DM1 (Fu et al. 1993; Hofmann-Radvanyi et al. 1993), která je způsobena zadržováním expandovaných transkriptů v buněčném jádře (Davis et al. 1997). Druhým mechanismem je změněná exprese sousedních genů *SIX5* (sine oculis homeobox, homolog 5), který kóduje homeodoménu transkripčního faktoru (Winchester et al. 1999), a *DMWD* (myotonic dystrophy gene with WD repeats), exprimovaného v testes a mozku (Alwazzan et al. 1999). Snížení exprese těchto dvou genů a genu *DMPK* je zřejmě způsobeno změnou v organizaci chromatinu, kterou expanze repetice CTG indukuje (Junghans et al. 2001). Třetím mechanismem je toxický vliv mRNA nesoucí expanzi CUG na fungování RNA-vázajících proteinů, které následně ovlivňují regulaci alternativního sestřihu. Exprese prodloužených transkriptů obsahujících CUG vede zatím neznámým způsobem ke zvýšení hladin CUG-vázajících proteinů, zejména CUG-BP1 (Timchenko et al. 1996), a k poklesu koncentrace proteinu muscleblind-like 1 (MBNL1) v důsledku jeho vychytávání v ribonukleárních inkluzích (Miller et al. 2000). Tato změna způsobuje v dospělé tkáni nepatřičnou expresi fetálních sestřihových forem některých proteinů. Jsou to například svalově specifický chloridový kanál (CLCN1) (Mankodi et al. 2002), inzulinový receptor (Savkur et al. 2001) a srdeční troponín (Philips et al. 1998). Ribonukleární inkluze jsou též nalézány ve svalové tkáni pacientů s velmi podobným multisystémovým onemocněním, myotonickou dystrofií typu 2 (DM2), která je podmíněna expanzí repetice CCTG v nekódující oblasti genu *ZNF9* na chromozomu 3q21 (viz níže). I když jsou DM1 a DM2 podmíněny dvěma různými funkčně odlišnými geny, obě tyto klinické jednotky patrně sdílejí společné patogenní dráhy vedoucí k podobnému fenotypu, ve kterých zřejmě dominuje vliv toxické RNA (Ranum a Day 2004; Ranum a Cooper 2006). Další typ myotonické dystrofie (typ 3) spojený s frontotemporální demencí byl mapován do oblasti 15q21-24 (Le Ber et al. 2004). Dosud však nebyl izolován gen, který ji podmiňuje.

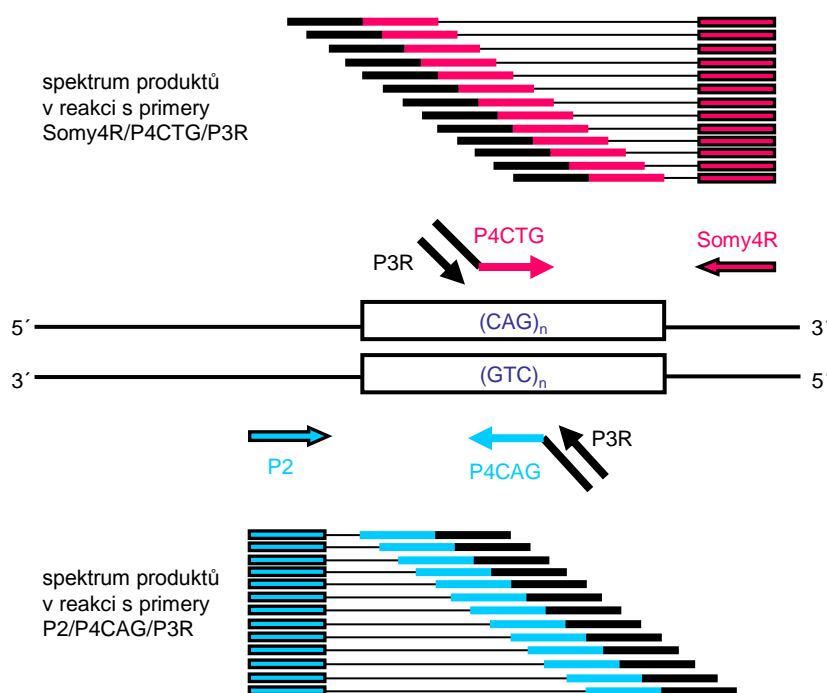
1.3.2. Možnosti molekulárně genetické diagnostiky DM1

Molekulárně genetická analýza DM1 je založena na přímé detekci expanzí v genu *DMPK*. Analýza kombinuje metody PCR pro detekci normálních alel a krátkých expanzí do 100 repetice CTG a triplet-primed PCR (TP-PCR), případně Southernovu hybridizaci nebo long-range PCR pro detekci dlouhých expanzí.

Vyšetření klasickou PCR s primery vázajícími se na opačné strany repeticce umožňuje vyloučení přítomnosti expanze v genu *DMPK* u pacientů se dvěma různě dlouhými normálními alelami. Produkty jsou separovány v denaturačním polyakrylamidovém gelu, pro přesné určení délky v kapilární elektroforéze. Jestliže je amplifikována pouze jedna normální alela, není jasné, zda je tato v homozygotním stavu nebo ve stavu heterozygotním spolu s neamplifikovatelnou expandovanou alelou. Pak je nutno aplikovat některou z metod schopných odhalit delší expanze.

Jednou z těchto metod, umožňujících přesné určení velikosti normálních produktů a detekci dlouhých expanzí, je triplet-primed PCR (TP-PCR) (Warner et al. 1996). Metoda využívá primer komplementární k repetici CTG, který na svém 5' konci nese úsek nekomplementární k lidské genomové DNA, který slouží k vazbě druhého, většinou fluorescenčně značeného primeru. Třetí primer je umístěn před nebo za repetici CTG. Po hybridizaci prvního primeru do různých míst repeticce probíhá amplifikace pomocí druhého a třetího primeru. Obr. 2 schematicky znázorňuje nasedání použitých primerů na repetici a na sebe navzájem. Reakce je prováděna ve dvou separátních mixech na obou vláknech (CAG i CTG) z důvodu možného selhání reakce, například v důsledku polymorfismů DNA na vazebných místech primerů. TP-PCR vede ke vzniku populace fragmentů DNA, jejichž délka se liší o 3 nukleotidy (trinukleotid CTG). Amplifikace kratších produktů je efektivnější, se vzrůstající délkou množství příslušného fragmentu klesá. Spektrum fragmentů vznikající ve vzorku je vyhodnoceno po elektroforetické separaci produktů TP-PCR, která se provádí většinou kapilární elektroforézou s fluorescenční detekcí fragmentů.

Pro detekci expanzí delších než 200 CTG je stále využívána také Southernova metoda, i když se od ní v poslední době vzhledem k časové náročnosti a použití radioaktivity upouští. Je to však metoda volby v případě sporných výsledků TP-PCR nebo pro potřeby stanovení přibližné délky expanze. Při použití této metody je genomová DNA naštěpena restriční endonukleázou (alternativně mohou být použity



Obrázek 2: Schematické znázornění obou vláken DNA 3' konce genu DMPK se zvýrazněnou trinukleotidovou repeticí (obdélníky) a polohou a vzájemnou komplementaritou (rovnoběžné uspořádání) použitých primerů. Reakce probíhající odděleně na CAG resp. CTG vlákně využívají primery Somy4R/P4CTG/P3R resp. P2/P4CAG/P3R a vedou ke spektrům PCR produktů (nahore a dole), která jsou tvořena fragmenty DNA lišícími se v délce vždy o jeden trinukleotid.

EcoRI, *BamHI*, *NcoI*, *BglI*) a hybridizována s jednou z několika možných sond komplementárních k úsekům jedinečné DNA přiléhajícím k repetici CTG (Brook et al. 1992; Buxton et al. 1992; Fu et al. 1992; Shelbourne et al. 1993). Metoda umožňuje přibližné určení délky expanze, což je výhodné pro korelační studie genotyp-fenotyp. Štěpením enzymem *EcoRI* vznikají normální fragmenty délky přibližně 9 a/nebo 10 kb (fragmenty obsahují inzerční/deleční polymorfismus bloku sekvencí Alu o délce 1kb). Fragmenty nesoucí expanzi jsou vždy delší než 10 kb, protože expanze jsou v kompletní vazebné nerovnováze s inzerčním polymorfismem bloku repetice Alu (Imbert et al. 1993; Neville et al. 1994).

Kromě Southernovy hybridizace jsou často používány také metody long-range PCR, využívající primery z klasické PCR, avšak schopné amplifikovat s použitím speciálních polymeráz i delší fragmenty DNA. Tyto metody ovšem nejsou stoprocentně spolehlivé pro amplifikaci velmi dlouhých expanzí.

1.4. Myotonická dystrofie typ 2

1.4.1. Fenotyp a molekulárně genetická podstata onemocnění

Existence druhého lokusu pro myotonickou dystrofii byla zjištěna teprve po zavedení genetického testování DM1. Lokus pro proximální myotonickou dystrofii DM2 (OMIM 602668) byl mapován v roce 1998 na chromozom 3q21 (Ranum et al. 1998). Jedinci postižení DM2 mají komplexní klinické projevy velmi podobné DM1, včetně myotonie, charakteristického obrazu histologických abnormalit kosterního svalstva, katarakty, potenciálně fatálního postižení srdce s těžkou arytmií nebo progresivní kardiomyopatií, hypotestosteronismu a oligospermie u mužů, inzulinové senzitivity a specifických serologických změn (Ricker et al. 1995; Day et al. 2003). DM2 ale má mírnější průběh a není asociována s vývojovými anomáliemi, těžkými kongenitálními formami a mentální retardací. Prevalence DM2 se v evropských populacích liší, přičemž v západní Evropě může být stejná jako u DM1 (Udd et al. 2006). Pacienti s DM2 sdílejí identický haplotyp, což dokazuje jedinou ancestrální (founder) mutaci s odhadovaným stářím 4000-12000 let (Bachinski et al. 2003).

DM2 je podmíněna transkribovanou ale netranslatovanou expanzí repetice CCTG lokalizované v intronu 1 genu pro RNA-vázající protein s motivem zinkových prstů 9 (*ZNF9*) (Liquori et al. 2001). Opakování CCTG je součástí komplexního repetitivního motivu $(TG)_n(TCTG)_n(CCTG)_n$ (Liquori et al. 2001). Všechny složky tohoto motivu jsou v běžné populaci nestabilní, avšak pouze repetice CCTG expanduje (Liquori et al. 2003). I když je DM2 klinicky mírnější než DM1, expanze repetice CCTG mohou být mnohem delší než expanze repetice CTG u DM1. Alely mohou nést 75-11000 CCTG. Motiv také vykazuje vyšší somatickou instabilitu než repetice DM1 (Liquori et al. 2001). Funkce proteinu ZNF9 není příbuzná s funkcí žádného z proteinů, které jsou kódovány oblastí DM1, a ani geny z oblasti DM1 nemají žádný vztah ke genům z lokusu DM2. Pre-mRNA pacientů s DM2 je normálně sestřižená a exprese genu *ZNF9* se neliší od kontrol (Margolis et al. 2006). Ve svalech pacientů se ale nacházejí ribonukleární inkluze obsahující expanzi CCUG, které zadržují protein muscleblind-like 1, podobně jako u pacientů s DM1. Za široké spektrum klinických znaků, které jsou společné pro obě nemoci, je nejspíše odpovědný identický mechanismus nabytí nové funkce RNA postihující alternativní sestřih dalších genů (Liquori et al. 2001; Day et al. 2003; Cardani et al. 2009).

1.4.2. Možnosti molekulárně genetické diagnostiky DM2

Testování expanze repetice CCTG v genu *ZNF9* se provádí obdobnými metodami jakou analýza expanze repetice CTG u DM1. PCR s primery komplementárními k jedinečným sekvencím sousedícím s repeticí je možno amplifikovat normální alely. Metoda repeat-primed PCR (RP-PCR), která je obdobou TP-PCR (Bachinski et al. 2003), nebo její modifikace - amplifikace metodou otáčivého kruhu (Nakamori et al. 2009), a Southernova metoda detekují expandované alely genu.

Historicky první metodou, která byla používána pro detekci expanzí u DM2, byla přímá analýza Southern blotem. Genomová DNA byla naštěpena restričními endonukleázami *BsoBI* nebo *EcoRI* a hybridizována se sondou CL3N58 (Liquori et al. 2001). Molekulárně genetická diagnostika DM2 Southernovou metodou je v porovnání s diagnostikou DM1 o něco komplikovanější, protože pacienti s DM2 mají vyšší stupeň somatického mozaicismu a mnohem větší délku expanze (až 11000 CCTG). Proto může při použití tohoto testu zůstat u určité části pacientů jejich defekt neodhalen.

V současnosti používá většina laboratoří pro diagnostiku dvoukrokovou PCR. V prvním kroku se amplifikují pouze krátké alely a do dalšího testování jsou vybráni jen pacienti, u kterých byla detekována pouze jedna normální alela a kteří jsou tedy buď homozygoty pro dvě normální alely stejné délky, nebo heterozygoty pro jednu normální a jednu neamplifikovatelnou expandovanou alelu. V druhém kroku je u těchto osob možné použít long-range PCR, separaci produktů v agarózovém gelu, Southernův blot a následnou hybridizaci se sondou (CCTG)₅ (Bonifazi et al. 2004). Alternativně může být ve druhém kroku použita metoda RP-PCR (Bachinski et al. 2003) nebo její modifikace (Nakamori et al. 2009). Konečně některé laboratoře používají k detekci expanzí i fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) se sondou (CCTG)₅ přímo na preparátech svalových biopsií (Cardani et al. 2004).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Shromáždit co nejlépe charakterizované soubory pacientů se syndromem fragilního chromozomu X a myotonickou dystrofií, jejich klinická data a biologický materiál.
- 2) Optimalizovat a do rutinní praxe zavést širokou paletu molekulárně genetických metod pro diagnostiku těchto onemocnění a aplikovat tyto metody na soubory pacientů a jejich rodinných příslušníků.
- 3) Srovnat charakter expanzí v kauzálních genech a efektivitu záchytu těchto defektů s publikovanými údaji a pokusit se provést korelace mezi genotypem a fenotypem.
- 4) Na základě získaných zkušeností a podle aktuálního vývoje laboratorních metod doporučit optimální algoritmy molekulárně genetických vyšetření těchto chorob.
- 5) Detailně prostudovat a popsat zajímavé kazuistiky, jejichž analýza by mohla přispět k pochopení obecných principů rozvoje těchto onemocnění.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Soubory pacientů

Expanze repetice CGG v genu *FMR1* u FXS byla autorkou práce testována na Ústavu biologie a lékařské genetiky (ÚBLG) 2. LF UK a FN Motol od roku 2001 na souboru 1880 pacientů. Bylo to 1221 mužů a 659 žen ve věku od 2 do 78 let, kteří splňovali indikační kritéria pro testování FXS (pacienti s projevy mentální retardace různého stupně, s dětským autismem nebo ADHD, příbuzní v riziku s rodinnou anamnézou FXS, pacientky v prekoncepční péči s rodinnou anamnézou mentálního postižení člena rodiny neznámé etiologie, pacientky s infertilitou či předčasnou ovariální dysfunkcí nebo s ovariálními cystami). Krev nebo DNA pacientů byla dodána z různých genetických pracovišť, klinik dětské neurologie nebo pediatrických klinik zejména z Čech, protože diagnostiku na území Moravy zajišťuje pracoviště v Brně. V letech 2005-2007 byl autorkou navíc vyšetřen další soubor 256 pacientů (96 žen, 160 mužů) starších 45 let s cílem zjistit frekvenci premutace v genu *FMR1* a onemocnění FXTAS u těchto pacientů. Tito pacienti byli vybráni ze souboru ataktických pacientů zasláných z různých neurologických klinik a ambulancí z celé České republiky, který byl shromážděn a vyšetřován od r. 1999 nejprve na SCA a FRDA v laboratoři lékařské a molekulární genetiky ÚBLG (Peter Bauer, Stefanie Krilová, Marta Kopečková, Lída Apltová, Anna Křepelová).

První skríníng expanze repetice CTG v genu *DMPK* metodou PCR k vyloučení DM1 byl na našem pracovišti proveden v roce 1997. Autorka práce problematiku převzala v roce 2000 a postupně zavedla další metody (Southernovu metodu a TP-PCR), v roce 2003 pak i testování expanze repetice CCTG v genu *ZNF9* u DM2. Po zavedení analýzy DM2 byla u pacientů do té doby negativně testovaných na DM1 zjišťována přítomnost dvou normálních alel genu *ZNF9* a pacienti s pouze jednou normální alelou byli vyšetřeni Southernovým blotem. Tak bylo zachyceno prvních 9 pacientů s DM2. Následně už probíhalo vyšetřování DM1 a DM2 paralelně. V prosinci 2009 čítal soubor osob molekulárně geneticky testovaných na myotonickou dystrofii celkem 675 pacientů a jejich příbuzných. Jednalo se o pacienty se svalovým onemocněním s variabilními symptomy (adultní, dětské i kongenitální formy), pacienty testované pro vyloučení myotonické dystrofie, matky s detekovaným

polyhydramniem nebo s diagnózou pedes ekvinovari u plodu a příbuzné v riziku z rodin s DM1 nebo DM2. Většina pacientů pocházela z neurologických pracovišť, novorozeneckých klinik a genetických poraden převážně na území Čech. Požadavek na vyšetření u dospělých pacientů byl někdy specifikován přesněji na DM1 nebo DM2, jindy bylo požadováno vyšetření obou typů. Autorkou samotnou bylo analyzováno kompletně nebo částečně (dovyšetření nově zavedenými metodami) celkem 559 pacientů, ale práce shrnuje výsledky z celého souboru 675 na pracovišti vyšetřených osob. Analýza autorkou nevyšetřených pacientů byla prováděna metodou PCR s přímou inkorporací radionuklidu (Arpád Boday, Markéta Šutajová).

V rámci studie souboru pacientů s myotonickou dystrofií vznikla také potřeba otestování obecné populace. K těmto účelům bylo vyšetřeno 100 anonymních kontrolních vzorků DNA osob s neznámým klinickým stavem, o nichž se předpokládalo, že netrpí nervosvalovými onemocněními. Tento soubor sestával z nepříbuzných pacientů, kteří přišli v jeden den na vyšetření krevního obrazu na Klinikou hematologie FN Motol.

3.2. Metody

3.2.1. Obecný popis základních metod

Izolace DNA

Molekulárně genetická analýza byla prováděna na genomové DNA izolované z periferní krve pacientů a jejich rodinných příslušníků odebrané do K₃EDTA, z kultivovaných buněk plodové vody či z nativních klků z biopsie choria. DNA byla na ÚBLG izolována manuálně vysolovací metodou (Miller et al. 1988) (viz níže) nebo pomocí kitu Gentra Puregene DNA Isolation Kit (Quiagen), případně na přístroji AutoGenFlex STAR (KURABO Industries) s kitem FLEXI GENE DNA AGF3000 (Quiagen). DNA zaslaná z jiných pracovišť byla izolována převážně kity QIAamp DNA Blood Kit nebo Gentra Puregene DNA Isolation Kit (oba Quiagen). Při použití komerčních kitů bylo postupováno podle manuálů výrobců. V případě použití vysolovací metody byly v prvním kroku lyzovány červené krvinky v amonium-chloridovém pufru a centrifugací byly separovány bílé krvinky, jejichž membrány byly lyzovány a DNA uvolněna působením 100 µg/ml proteinázy K v prostředí pufru SE

(75mM NaCl, 25mM EDTA) a anionického detergentu (1% SDS) přes noc. Další příměsi, zejména proteiny, byly odstraněny přidáním nasyceného roztoku NaCl do koncentrace 6M s následným protřepáním a centrifugací. DNA byla z roztoku vysrážena přidáním 2 objemů 96% etanolu. Precipitát byl omyt 70% etanolem, vysušen a rozpuštěn v pufru se stabilizátorem DNA. Izolace DNA byla prováděna na ÚBLG ve FN v Motole (Jana Rýdlová, Kateřina Horká, Simona Böhmová, Iordanka Anguelová, Lída Apltová). Některá pracoviště dodávala přímo vzorky DNA (FN Plzeň, ÚBLG VFN Praha, GENNET Praha).

Čistota a koncentrace DNA byla posouzena na spektrofotometru. Čistá DNA bez kontaminace proteiny měla hodnotu poměru absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm mezi hodnotami 1,7-2. Pro diagnostiku expanzních mutací byla důležitá izolace DNA z čerstvé krve, v optimálním případě do 24 hod. od odběru. V déle skladované krvi může docházet k degradaci vysokomolekulární DNA. Integrita DNA byla posouzena separací v agarózovém gelu. Tato kontrola byla vždy provedena také před použitím DNA pro Southernovu metodu.

Southernova metoda

Tato metoda vizualizace hledaného úseku DNA v lidském genomu zahrnuje přenos restričních fragmentů DNA na membránu (blot) a hybridizaci blotu se značenou sondou. Genomová DNA (3-10 μ g) byla štěpena 20U (jednotek) restriční endonukleázou po dobu 16 hod. při optimální teplotě a s použitím inkubačního pufru poskytnutého výrobcem enzymu. V případě dvojitého štěpení bylo nutné vzorky po štěpení prvním enzymem precipitovat v acetátu sodném s etanolem, aby se odstranil pufr prvního enzymu, který nemusel být vhodný pro štěpení druhým enzymem. DNA byla poté rozpuštěna ve vodě a následně štěpena 20U druhého enzymu po dobu aspoň 4 hod. Naštěpené vzorky byly nanášeny do agarózového gelu s požadovanou koncentrací (0,7-1,2% agarózy (Bio-Rad)) a separovány při 40V po dobu 20 hodin (délka gelu 20 cm). Gel pak byl po 30 min. inkubaci v denaturačním pufru (0,25M NaOH/1,5M NaCl) podroben kapilárnímu alkalickému blotování na membránu Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) podle návodu výrobce. Gel byl umístěn v blotovací sestavě (Sambrook et al. 1989) a DNA byla přenášena denaturačním puforem po dobu min. 20 hod. Poté byla DNA fixována na membráně při 80°C po

dobu 2 hod. Značení sondy (25 ng DNA) bylo prováděno pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy, náhodných hexanukleotidů a α -³²P-dCTP kitem Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) podle postupu doporučeného výrobcem. Následovala hybridizace v 10 ml hybridizačního pufru PerfectHyb (Sigma) s 1 mg denaturované herring sperm DNA (Boehringer Mannheim) a denaturovanou značenou sondou při 59-63°C v závislosti na typu sondy po dobu 16 hod. Odmývání sondy bylo prováděno postupně v roztocích I. (2x SSC, 0,1% SDS) 2x po dobu 5 min. při pokojové teplotě, II. (0,5xSSC, 0,1% SDS) 2x po dobu 10 min. při 42°C a III. (0,1xSSC, 0,1% SDS) 3x po dobu 5 min. při 50-59°C (20xSSC = 3,0M NaCl, 0,3M citrát sodný). Při autoradiografii byl blot exponován na RTG film KODAK X-OMAT AR při -70°C po dobu 1-7 dnů.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR sloužila ke zmnožení vybraného úseku genomové DNA pacienta pro účely stanovení délky fragmentu, detekci mutací nebo haplotypovou analýzu. Nejdříve byla připravena příslušná reakční směs z pufru, oligonukleotidových primerů komplementárních ke koncům cílové sekvence, směsi dNTPs, termostabilní DNA polymerázy a templátové DNA. Tato směs pak byla v termocykleru vystavena střídajícím se krokům denaturace DNA, vázání primerů a syntézy nové DNA. Amplifikovaný úsek DNA pak byl dále analyzován klasickou gelovou elektroforézou, fragmentační analýzou, sekvenací atd. Konkrétní složení reakčních směsí, použité sekvence primerů a podmínky amplifikací jsou uvedeny v Tab. 2 - 8.

Sekvenování DNA

Sekvenování umožnilo určit pořadí nukleotidů v analyzovaném vzorku DNA amplifikovaném PCR. DNA byla nejprve zbavena dalších složek reakční směsi (pufru, dNTPs, primerů), které by nežádoucím způsobem ovlivnily průběh sekvenační reakce, pomocí kitu Sureclean (Bioline) dle návodu výrobce. Pelet DNA pak byl rozpuštěn ve 20 μ l sterilní vody. Poté bylo provedeno přímé sekvenování s použitím dideoxynukleotidů dle Sangera (Sanger et al. 1977) pomocí kitu Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) postupem doporučeným výrobcem

s použitím teplotního profilu 25x (96°C 10 sec., 50°C 5 sec., 60°C 4 min.), 4°C. Pro odstranění nenavázaných značených dideoxynukleotidů, které by mohly při následné analýze způsobovat nežádoucí pozadí na chromatogramu, byl v etanolové precipitaci přidán 3-násobek objemu sekvenační reakce tzv. "kyselého etanolu" (5 % (v/v) 2M octan sodný pH 5,2; 95 % (v/v) 95% etanol) a vzorky byly centrifugovány po dobu 10 min. Pelet byl opláchnut 70% etanolem, vysušen a rozpuštěn v 25 µl HiDi formamidu (Applied Biosystems). Nakonec byly vzorky analyzovány na přístroji ABI Prism 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) s injekcí 6 sec. při teplotě 55°C a při 15 kV po dobu 1500-1800 sec. dle velikosti produktu. Analýza probíhala pomocí softwaru Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems).

Fragmentační analýza na přístroji ABI Prism 3130 Genetic Analyser

Genetický analyzátor ABI Prism 3130 v kapilární elektroforéze separuje a snímá také přímo fluorescenčně značené PCR produkty a je schopen pomocí přídatného softwaru GeneMapper vyhodnotit délku fragmentů DNA. Jeden µl PCR produktu byl smíchán s 11 µl HiDi formamidu s příměsí 0,5 µl délkového markeru GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems), nebo ROX1000 Size Standard (Celera). Vzorky byly denaturovány 2 min. při 95°C, ochlazeny na pokojovou teplotu a poté separovány na ABI Prism 3130. Délky produktů byly vyhodnoceny softwarem GeneMapper v. 4 (Applied Biosystems).

Fragmentační analýza na přístroji Gel-Scan 2000

Elektroforetický systém Gel-Scan 2000 (Corbett Research) snímá separaci fluorescenčně značených PCR produktů v reálném čase pomocí laseru a pomocí softwaru Multianalyst je schopen vyhodnotit molekulární hmotnost i koncentraci PCR produktu. Použití 5% denaturačního polyakrylamidového gelu umožnilo zaznamenat rozdíl 1 bp mezi jednotlivými fragmenty při charakterizaci PCR produktů polymorfních markerů typu short tandem repeat (STR) při haplotypové analýze a při stanovení délky krátkých PCR produktů obsahujících tri- nebo tetranukleotidové repetice. Produkty určené k separaci na přístroji Gel-Scan 2000 byly amplifikovány pomocí primerů značených fluorescenčním barvivem Hex (Invitrogen).

Používaný 5% denaturační polyakrylamidový gel (akrylamid:bisakrylamid 19:1, 7M urea, 10 µl TEMED a 100 µl 10% APS na 15 ml roztoku) byl nejdříve zahřát na 40°C a podroben tzv. pre-runu (30 min. při 1200V) v 0,6x TBE (1x TBE = 0,089M Tris, 0,089M kyselina boritá, 0,002M EDTA). PCR produkty byly smíchány s nanášecím roztokem formamidu a bromfenolové modři (Sigma) v poměru 1:2 (vzorek/roztok), denaturovány v termobloku při 95°C po dobu 5 min., ochlazeny a v množství 1-2 µl nanесeny paralelně s délkovým standardem GeneScan-500 TAMRA Size Standard (Applied Biosystems) na gel zahřátý na 40°C. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hod. při teplotě 40°C a napětí 1200 V a poté byla vyhodnocena.

3.2.2. Specifikace a kombinace metod použitých k analýze FXS

Složení reakčních směsí a podmínky amplifikací jsou uvedeny v Tab. 2 - 4. Skríníng alel nesoucích krátké repetice CGG byl prováděn amplifikací genomové DNA v mixu FXS-TMSO s použitím primerů OligoA-F a 571R ve speciálním mixu dNTPs (2mM dATP, dCTG, dTTP, 0,5mM dGTP, 1,5mM 7-deaza dGTP). Produkty PCR byly analyzovány v 5% denaturačním polyakrylamidovém gelu na přístroji Gel-Scan 2000 s použitím mužské (53 CGG) a ženské kontroly (30/92 CGG). Pro přesnější stanovení délky a přítomnosti stabilizujících sekvenčních přerušení byly PCR produkty v některých případech sekvenovány s použitím PCR primerů.

Amplifikace dlouhých alel byla prováděna pomocí kitu Fragile X-PCR (Celera) dle pokynů výrobce. Produkty byly vyhodnoceny fragmentační analýzou na přístroji ABI3130 s využitím programu GeneMapper v. 4 ve dvou runech dle manuálu kitu (krátký run: 1 hod., injekce 1 sec.; dlouhý run: 2 hod., injekce 22 sec.). Southernova metoda byla využívána zejména u pacientek s jednou normální alelou pro vyloučení expanze na druhém chromozomu. Genomová DNA byla naštěpena *HindIII* nebo kombinací *HindIII/SacII*, separována v 0.7% agarózovém gelu, blotována a hybridizována při 63°C s radioaktivně značenou sondou StB12.3 (Rousseau et al. 1991; Rousseau et al. 1992). Pro průkaz původu rodičovského chromozomu byla v některých případech provedena vazebná analýza. Nejvíce byly využívány vysoce informativní markery FRAXAC1 a FRAXAC2, které leží na opačných koncích repetice CGG v genu *FMR1*.

Tabulka 2: Oligonukleotidy používané při analýze FXS

Použití	Název primeru	Sekvence	Reference
FXS krátká PCR	OligoA-F	GGAACAGCGTTGATCACGTGACGTGGTTTC	(Chong et al. 1994)
	571R	GGGGCCTGCCCTAGAGCCAAGTACCTTGT	
FXS vazebná analýza	FRAXAC1-F	GATCTAATCAACATCTATAGACTTTATT	(Richards et al. 1991a)
	FRAXAC1-R	GATGAGAGTCACTTGAAGCTGG	
	FRAXAC2-F	GACTGCTCCGGAAGTTGAATCCTCA	
	FRAXAC2-R	CTAGGTGACAGAGTGAGATCCTGTC	

Tabulka 3: Složení reakčních směsí pro PCR používaných při analýze FXS

Reagencie	TMSO mix	FXS vazebná analýza mix
	1 vzorek [μl]	1 vzorek [μl]
Pufr Fermentas(10x)	2	2,5
7deaza dGTP dNTPs mix	2,5	
MgCl ₂ (25mM)	1,5	1,5
dNTPs (2mM)		2,5
Primery (forward+reverse 20pmol/μl)	1	
Primery (forward+reverse 10pmol/μl)		1+1
Taq Polymerasa (Fermentas) 1U/μl	1	1
5M betain (Sigma)	8	
TMSO (Sigma)	0,6	
DNA (200nmol/μl)	0,5	0,5
H ₂ O	7,90	15
Reakční objem	25	25
Reagencie	FXS (Celera) mix	
	1 vzorek [μl]	
High GC PCR-Buffer	13	
Gender Primers	0,6	
FragileX Primers	0,8	
PCR Enzyme Mix	1,2	
H ₂ O	1,4	
DNA 15-25 nmol/ μl	3	
Reakční objem	20	

Tabulka 4: Teplotní fáze PCR používaných při analýze FXS

Typ	Teplota Čas						
	FXS Celera mix	98,5°C 10 sec.	58,0°C 1 min.	75,0°C 6 min.	98,5°C 10 sec.	56,0°C 1 min.	75°C 6 min.
15 cyklů			15 cyklů				
FXS TMSO mix	95°C 3 min.	94°C 30 sec.	61°C 45 sec.	72°C 2 min.	72°C 7 min.		4°C ∞
		35 cyklů					
FXS vazebná anal. mix	95°C 3 min.	94°C 30 sec.	56°C 45 sec.	72°C 1 min.	72°C 7 min.		4°C ∞
		30 cyklů					

3.2.3. Specifikace a kombinace metod použitých k analýze DM1

Sekvence použitých primerů, složení reakčních směsí a podmínky amplifikací jsou uvedeny v Tab. 5 - 7. Amplifikace alel nesoucích do 100 CTG byla prováděna metodou PCR v mixu DM1 s primery Somy4R a GCT1 nasedajícími vně repetice. Produkty byly analyzovány v 5% denaturačním polyakrylamidovém gelu na přístroji Gel-Scan 2000. Amplifikace jak krátkých tak expandovaných alel byla prováděna také metodou TP-PCR (viz též Obr. 2) pomocí primerů Somy4R/P3R/P4CTG (v poměrových molárních koncentracích 10:10:1) na jednom vlákně a primerů P2/P3R/P4CAG na komplementárním vlákně v mixu TP-PCR. Produkty TP-PCR byly separovány na analyzátoru ABI3130 s délkovým standardem GeneScan-500 ROX Size Standard (injekce 16 sec. při napětí 1,2 kV; run 15 kV 1200 sec.) a hodnoceny pomocí software GeneMapper v. 4. Pro amplifikaci kratších expanzí do 500 CTG bylo možné použít long-range PCR s primery Somy4R a GCT1. Produkty byly separovány v 1,8% agarózovém gelu v 1x TBE a velikost expanze byla odhadnuta srovnáním délky fragmentu s délkovým markerem. Tato metoda byla použita na ohodnocení délky expanzí v rodinách s přerušenou repeticí (Kazuistika 7 - rodiny A, B).

Vyhledávání a analýza sekvenčních přerušení v repetici CTG v genu *DMPK* byly prováděny metodou klasické PCR (v mixu DM1) s primery Somy4R a GCT1 a metodou TP-PCR s primery Somy4R/P3R/P4CTG (v mixu TP-PCR) a následnou sekvenací produktů s primerem Somy4R. Sekvence produktů klasické PCR sloužila k vyhledávání přerušení na krátkých alelách, zatímco sekvence produktů TP-PCR umožnila prokázat přítomnost přerušení i na expandovaných alelách. Kromě toho byly k vyhledávání přerušení na expandovaných alelách použity další varianty TP-PCR s primery komplementárními ke specifickým přerušením tripletu CCG a CTC (Somy4R/P3R/P4CC, Somy4R/P3R/P4hex1 a Somy4R/P3R/P4CTC), a tyto produkty byly následně sekvenovány. Výsledky sekvence byly vždy srovnány s výsledky fragmentační analýzy příslušných produktů TP-PCR. U pacientů s nálezem přerušení byla provedena TP-PCR za long-range podmínek (Long-Range Mix) s použitím kitu Expand Long Template PCR System (Roche) s cílem zachytit nejvzdálenější přerušení v expanzi. Tyto produkty byly též sekvenovány.

Skrining přerušení v kontrolním souboru 100 jedinců byl prováděn štěpením PCR produktů alel genu *DMPK* endonukleázou *AcI* (rozpoznávací sekvence CCGC) (Leeflang a Arnheim 1995) a následnou analýzou na přístroji Gel-Scan 2000.

Vyhledávání dlouhých expanzí bylo prováděno Southernovou metodou. Genomová DNA byla štěpena enzymem *EcoRI*, fragmenty byly separovány v 0,7% agarózovém gelu a vizualizovány hybridizací při teplotě 59°C se značenou sondou, připravenou metodou PCR na lidské genomové DNA primery Somy1F a 886R v podmínkách krátké DM1,2 PCR (Tab. 6, 7).

Tabulka 5: Oligonukleotidy používané při analýze DM1

Použití	Název primeru	Sekvence	Reference
DM1 –TP PCR	P3R	TACGCATCCCAGTTTGAGACG	(Warner et al. 1996)
	P4CTG	TACGCATCCCAGTTTGAGACGTGCTGCTGCTGCTGCT	
	P2	GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG	
	P4CAG	TACGCATCCCAGTTTGAGACGCAGCAGCAGCAGCAGCA	
DM1-PCR	GCT1	GCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCGGAA	(Guida et al. 1995)
DM1–TP PCR, PCR	Somy4R	CGGGTTTGGCAAAGCAAATTTCCCGA	(Musova et al. 2009)
Hybridizační sonda MD1–PCR	Somy886R	CCGGAGTCGAAGACAGTTCT	
	Somy1F	CGGCAGGAGGGCGGATCTTCGGG	
DM1–TP PCR zacílená do přerušení	P4CTC	TACGCATCCCAGTTTGAGACGTGCTGCTGCTGCTGCTC	
	P4CC	TACGCATCCCAGTTTGAGACGTGCTGCTGCTGCTGCC	
	P4hex1	TACGCATCCCAGTTTGAGACGTGCCGCTGCCGCTGCC	

Tabulka 6: Složení reakčních směsí pro PCR používaných při analýze DM1 a DM2

Reagencie	DM1,2 krátká PCR mix 1 vzorek [μl]	DM1 TP-PCR mix/ DM2 RP-PCR mix 1 vzorek [μl]
10x Pufr Invitrogen	2,5	2,5
dNTPs (2mM)	2,5	3
MgCl ₂ (50 mM)	0,75	0,75
Primery (forward+reverse 10pmol)	1+1	
TP/RP-PCR Primery (10+10+1pmol/μl)		2+2+2
Taq polymeráza Ivg (5U/μl)	0,2	0,4
DMSO (Sigma)	2,5	
5M betain (Sigma)		10
DNA (200nmol/μl)	0,5	1
H ₂ O	14,05	1,35
Reakční objem	25	25
Reagencie	DM1 Long Range PCR 1 vzorek [μl]	DM1 Long Range TP-PCR 1 vzorek [μl]
10x Pufr 2 (Roche)	2,5	2,5
dNTPs (2mM)	5	5
Primery (forward+reverse 10pmol/μ)	1+1	
TP-PCR Primery (10+10+1pmol/μl)		2+2+2
Polymerase (5U/ μl) (Roche)	0,37	0,37
5M betain	10	10
DNA (200-500nmol/μl)	1	1
H ₂ O	4,13	0,13
Reakční objem	25	25

Tabulka 7: Teplotní fáze PCR používaných při analýze DM1 a DM2

Typ	Teplota Čas											
DM1 Long Range	95°C 3 min.	95°C 10 sec.	54°C 45 sec.	68°C 4 min.	95°C 10 sec.	54°C 45 sec.	68°C 5 min.	95°C 10 sec.	54°C 45 sec.	68°C 6 min.	68°C 10 min.	4°C ∞
		10 cyklů			10 cyklů			10 cyklů				
DM1,2 krátka PCR	95°C 3 min.	94°C 30 sec.			57°C 45 sec.			72°C 1 min.			72°C 7 min.	4°C ∞
		30 cyklů										
DM1,2 TP/RP PCR	95°C 3 min.	94°C 30 sec.			59°C 45 sec.			72°C 2 min.			72°C 7 min.	4°C ∞
		35 cyklů										

3.2.4. Specifikace a kombinace metod použitých k analýze DM2

Krátké alely byly amplifikovány primery DM2-1F a DM2-1R. Produkty byly separovány v 5% denaturačním polyakrylamidovém gelu na přístroji GelScan 2000. Amplifikace delších expanzí byla prováděna metodou repeat-primed PCR (RP-PCR) (Bachinski et al. 2003) s primery DM2-RP-F/DM2-RP-4R/Universal2 (v poměrových koncentracích 10:10:1). Produkty RP-PCR byly separovány na analyzátoru ABI3130 s GeneScan-500 ROX Size Standard za podmínek shodných s analýzou DM1 a hodnoceny pomocí software GeneMapper v. 4. Složení reakčních směsí a podmínky amplifikací jsou uvedeny v Tab. 6 - 7. V Tab. 8 jsou uvedeny sekvence PCR primerů.

Tabulka 8: Oligonukleotidy používané při analýze DM2

Použití	Název primeru	Sekvence	Reference
DM2-PCR	DM2-1F	GCCTTATAACCATGCAAATGTGTC	Mušová, nepublikováno
	DM2-1R	CCTAGGGGACAAAAGTGAGACAG	
Hybridizační sonda MD2	MD2-probeAF	GAGAACCTTGCCATTTTTTCG	(Bachinski et al. 2003)
	MD2-probeAR	CACCTACAGCACTGGCAACA	
DM2 – RP PCR	DM2-RP-F	GTGTCTTGGCCTTATAACCATGCAAATG	(Bachinski et al. 2003)
	DM2-RP-R4	GACGGGACACCGCTGATCGTTTACAGGCAGGCAGGCAGG	
	Universal2	GGGACACCGCTGATCGTTTA	

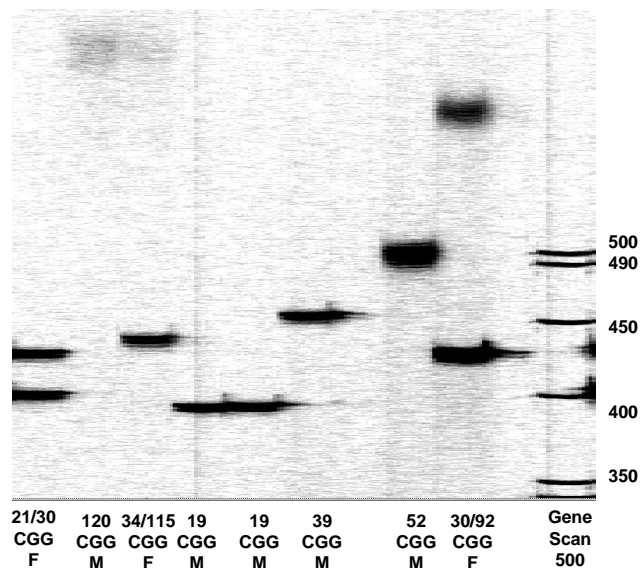
Southernova metoda byla prováděna štěpením genomové DNA *EcoRI* a separací digestu v 1,2% agarózovém gelu v pufru 1xTBE. Fragmenty nesoucí repetici CCTG v genu *ZNF9* hybridizovaly při teplotě 59°C se značenou sondou, připravenou amplifikací lidské genomové DNA pomocí primerů MD2-probeAF a MD2-probeAR (Tab. 8) v mixu a teplotních podmínkách krátké DM1,2 PCR (Tab. 6, 7).

4. VÝSLEDKY

4.1. Syndrom fragilního chromozomu X

4.1.1. Optimalizace a zavedení nových metod

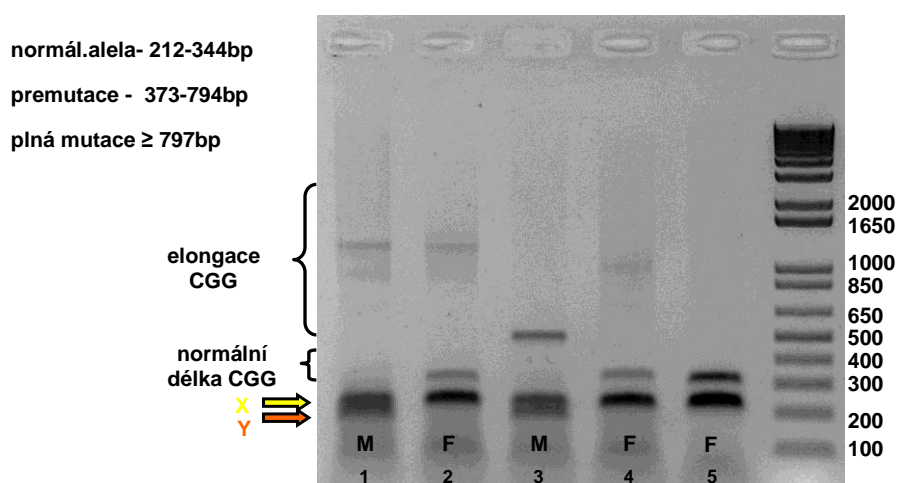
Jedním z cílů práce bylo nahrazení PCR s přímou inkorporací radionuklidu fluorescenční metodou a její optimalizace tak, aby amplifikovala normální alely i kratší premutace, které se na Southernových blotech nedají odlišit od normálních alel. Detekce premutací je zvláště důležitá u žen, protože při přenosu na potomstvo mohou expandovat do plné mutace. Vzhledem k tomu, že je třeba amplifikovat GC-bohatou sekvenci (repetici CGG), je nutné v reakční směsi částečně nahradit dGTP jeho analogem 7-deaza-2'-deoxyguanosin trifosfátem a přidat aditiva betain a tetrametylen sulfoxid (TMSO), která zlepšují amplifikaci GC-bohaté DNA (Chakrabarti a Schutt 2002; Musso et al. 2006). Pro optimální výsledek s Taq polymerázou fy. Fermentas jsme testováním dospěli k následujícím koncentracím aditiv: 0,15mM 7-deaza-2'-deoxyguanosin trifosfát plus 0,27M TMSO plus 1,6M betain (Obr. 3).



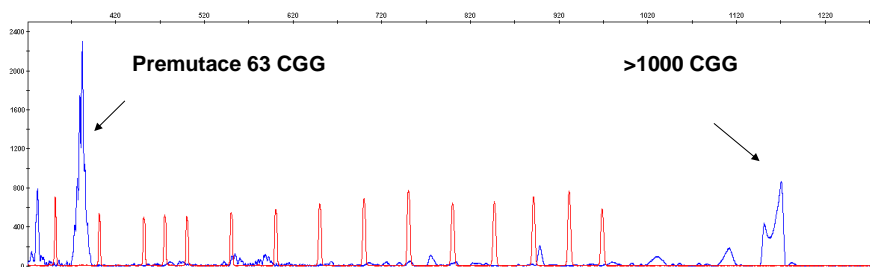
Obrázek 3: Příklad elektroforézy produktů optimalizované PCR, která amplifikuje fragment obsahující repetici CGG v genu FMR1. Produkty byly separovány v 5% polyakrylamidovém gelu na analyzátoru Gel-Scan 2000 spolu s délkovým markerem Gene Scan-500 TAMRA Size Standard (Applied Biosystems). Na gelu jsou i kontrolní vzorky o známé délce repetice (muž s 52 CGG a žena s 30 a 92 CGG). Metoda umožňuje odhad délky alel, jejich přesná délka byla určena pomocí kitu Fragile X PCR (Celera). Legenda: M - muž, F - žena.

Z Obr. 3 je zřejmé, že použitá reakce velmi spolehlivě amplifikuje premutace do délky asi 100 CGG, a detekovatelné jsou i produkty s velikostí kolem 120 CGG. Úspěšnost reakce je vždy kontrolována pomocí ženské kontroly s délkou premutace kolem 100 CGG a další kontroly s hraniční délkou repetice kolem 55 CGG.

Na přesné stanovení délky hraničních alel mezi 50 a 65 opakování CGG, stejně jako na amplifikaci dlouhých expanzí, lze použít kit Fragile X PCR (Celera). Naše zkušenosti ukázaly, že tato metoda je velmi citlivá a spolehlivá a při dodržení standardních podmínek a použití vhodných pozitivních kontrol může ve většině případů nahradit Southernovu metodu. Vyhodnocení délky PCR produktů je možno provádět klasickou elektroforézou v agarózovém gelu (Obr. 4) nebo kapilární elektroforézou a fragmentační analýzou (Obr. 5). Problémem zůstávají jen dlouhé premutace s hraniční délkou mezi premutací a plnou mutací (kolem 200 CGG), kde v případě prenatalní diagnostiky nelze rozhodnout, zda taková alela způsobí onemocnění.

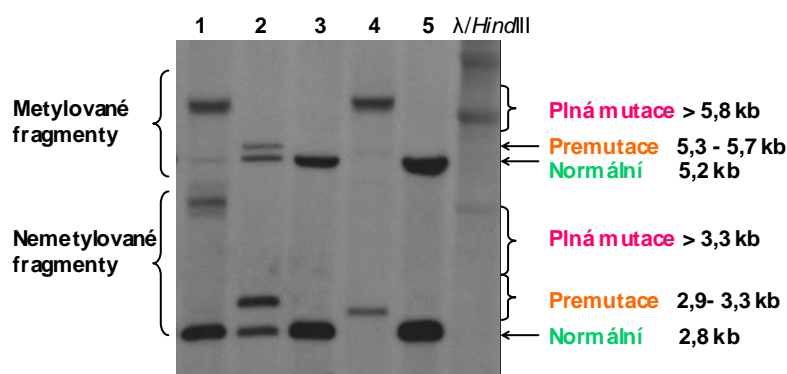


Obrázek 4: Příklad separace produktů amplifikace repetice CGG v genu *FMR1* získaných pomocí kitu *Fragile X PCR* (Celera) ve 2% agarózovém gelu spolu s délkovým standardem 1kb Plus Ladder (Invitrogen). Vzorky 1, 2 a 4 obsahují expanzi v délkovém spektru plné mutace, vzorek 3 obsahuje premutaci a vzorek 5 je normální. Legenda: M – muž, F – žena, X, Y – kontrolní proužky amplifikované na X- a Y-specifických sekvencích.



Obrázek 5: Příklad fragmentační analýzy PCR produktů získaných amplifikací DNA pacientky s mozaikou premutace o délce 63 CGG a plné mutace asi 1600 CGG opakování v genu *FMR1* (délka plné mutace byla stanovena Southernovým blotem). PCR produkty byly amplifikovány kitem *Fragile X PCR* (Celera), separovány v genetickém analyzátoru *ABI3130* v dlouhém runu s použitím délkového standardu *ROX 1000 Size Standard* (Celera). Hodnocení délky bylo provedeno pomocí programu *GeneMapper v. 4*.

Pro stanovení délky plných mutací je možno použít také Southernovu metodu, která navíc poskytuje informaci o metylačním stavu jednotlivých alel genu *FMR1*. Příklad takového vyšetření je na Obr. 6.



Obrázek 6: Příklad analýzy expanze v genu *FMR1* Southernovou metodou (štěpení *HindIII/SacII*, sonda *StB12.3*). Vzorek 1 – žena s metylovanou a nemetylovanou frakcí plné mutace, 2 – žena s premutací, vzorky 3 a 5 – normální ženy, 4 – muž s mozaikou plné mutace a nemetylované premutace.

4.1.2. Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru

V souboru 1880 osob vyšetřených na FXS bylo nalezeno 84 pacientů s plnou mutací s délkou alely přesahující 200 CGG, z toho bylo 57 mužů a 27 žen. U 4,5% pacientů ze souboru byla tedy potvrzena diagnóza FXS. Tito pacienti pocházeli z 57 nepříbuzných rodin. Mezi 84 pacienty s FXS jsme zachytili i ojedinělé nálezy. Jedna pacientka měla kromě normální alely a plné mutace i v mozaice *de novo* vzniklou normální alelu (Kazuistika 1). Jiná pacientka s plnou mutací měla velkou delecii na krátkém raménku druhého chromozomu X vedoucí k nerovnoměrné X-inaktivaci (Kazuistika 2). V jedné rodině byla po průkazu FXTAS provedena prenatální diagnostika FXS u plodu dcery postiženého (Kazuistika 3). Byl také zachycen souběh premutace *FMR1* a expanze obou alel genu *FXN* (Kazuistika 4). Dva pacienti s FXS měli karyotyp 47,XYY (Kazuistika 5). V souboru byl také odhalen jeden pacient s FXTAS s délkou premutace 90 CGG (dále viz Kazustika 2), a 64-letá pacientka s premutací s délkou 92 CGG pocházející z rodiny s FXS, zasláná ale neurologem s nejasnou příčinou poruchy řeči a třesem hlavy, cervikální dystonií, tyreopatií a hypertenzí. Šest z 22 pacientů analyzovaných metodou Southernova blotu (bez metylační analýzy) bylo mozaikou premutace a plné mutace (dále viz Diskuse).

V rodinách s expanzemi v genu *FMR1* jsme hodnotili také intergenerační přenosy (souhrn pozorování viz Tab. 9). Na přesné hodnocení délky premutací byly použity kit Fragile X PCR a fragmentační analýza na přístroji ABI3130. Při všech 11 přenosech premutace nebo intermediární alely od 9 mužů se v jejich potomstvu vyskytly opět pouze premutace. V jediném případě došlo při intergeneračním přenosu ke zkrácení alely o 2 CGG, v jednom případě nedošlo k žádné délkové změně a v 9 případech došlo k prodloužení počtu CGG. Největší pozorované prodloužení bylo o 30 CGG (z 90 CGG na 120 CGG). K poměrně velkému prodloužení došlo i u alely s 61 CGG (na 76 CGG, tedy o 15 CGG).

Z celkem 48 přenosů premutací v délce od 58 do 156 repetit CGG od 35 žen na jejich potomstvo byly v následující generaci zjištěny ve 12 případech (od 10 žen) premutace (25%) a ve 36 případech (od 27 žen) plné mutace (75%). Alely o délce 58 repetit CGG jsme zahrnuli do kategorie premutace, protože přesnost použité metody je pro tuto délku +/-1 CGG. Průměrná délka premutací, které v následující generaci neexpandovaly do plné mutace a zůstaly v kategorii premutace byla 73,6 CGG. V 10

z 12 těchto případů došlo k prodloužení alely, ve 2 případech (od jedné matky) došlo ke zkrácení (Obr. 7). Průměrná délka premutace expandující u 36 přenosů do plné mutace u potomstva byla 97 repetit CGG. Nejkratší premutace prodloužená do plné mutace měla délku 70 CGG. Při 9 přenosech plných mutací od 7 žen na jejich potomstvo došlo v jednom případě ke zkrácení plné mutace na normální alelu v části buněk (plná mutace a normální alela v mozaice, Kazuistika 1). V jedné čtyřgenerační rodině jsme sledovali postupnou expanzi normální alely do plné mutace (Obr. 8). Expanze začala u muže s alelou nesoucí 53 CGG nacházejícího se v nejstarší generaci. Sekvenování této alely ukázalo, že sekvence repetice CGG nebyla přerušena triplety AGG, které mají stabilizační efekt.

Tabulka 9: Změny počtu repetit CGG při mezigeneračních přenosech alel *FMR1*

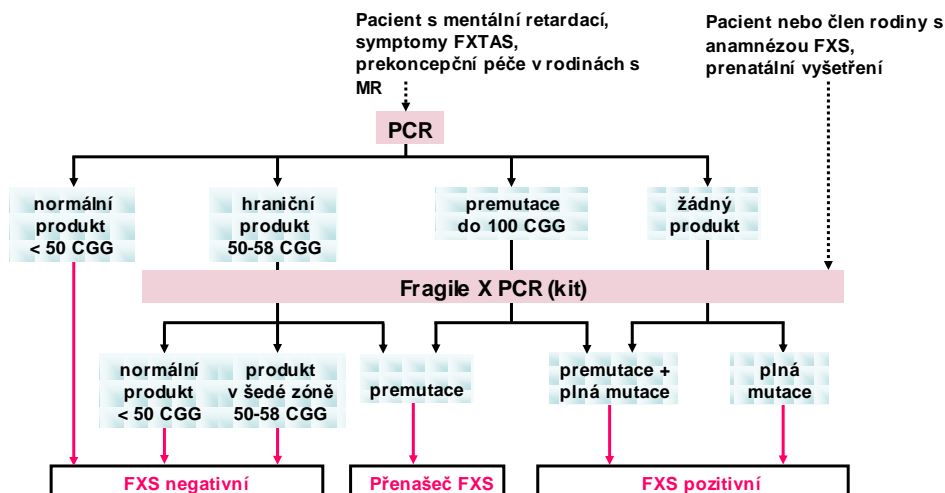
Typ mezigeneračního přenosu	Změna počtu repetit CGG
premutace od muže (otce) na potomstvo N=11	alela zůstává v kategorii premutace (N=11) 53→60, 53→58, 61→76, 79→84, 79→90, 79→79, 86→84, 90→98, 90→120, 101→105, 119→121
premutace od ženy (matky) na potomstvo N=48	alela zůstává v kategorii premutace (N=12) 58→60, 58→61, 60→70, 61→64, 68→94, 74→90, 80→105, 81→150, 84→74, 84→64, 86→112, 90→111 alela se mění na plnou mutaci (N=36) 70, 70, 75, 76, 78, 80, 80, 81, 84, 85, 85, 90, 90, 90, 92, 92, 92, 94, 94, 96, 96, 98, 100, 102, 105, 105, 105, 105, 111, 112, 112, 121, 121, 124, 124, 156
plná mutace od ženy (matky) na potomstvo N=9	alela zůstává v kategorii plné mutace (N=9), v jednom případě došlo ke zkrácení plné mutace na normální alelu v části buněk (mozaika normální alely a plné mutace)

N - počet intergeneračních přenosů. Identickou barvou jsou označeny alely od jedné přenašečky nebo jednoho přenašeče. U žádného muže s plnou mutací nebylo zaznamenáno otcovství.

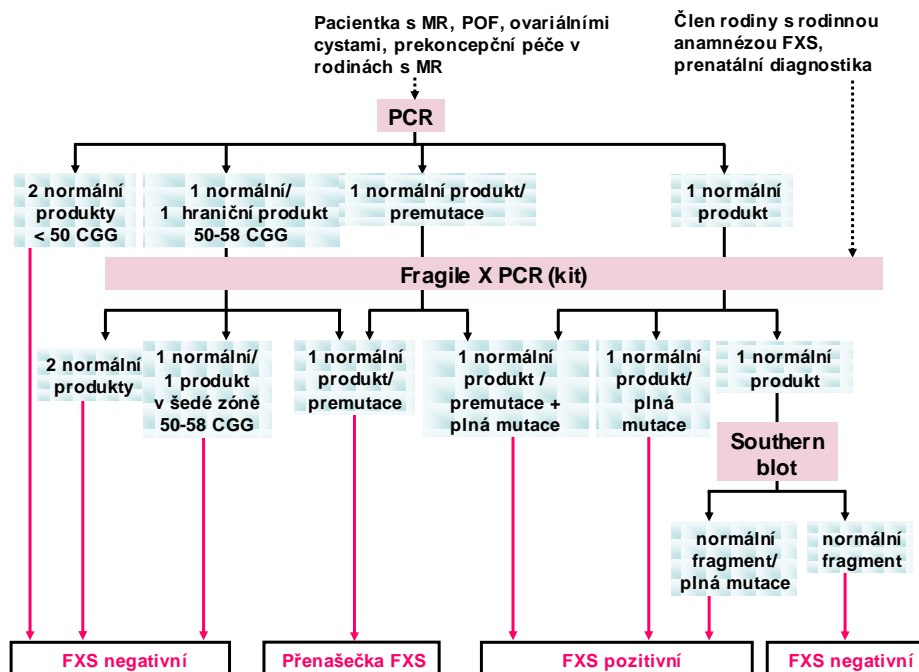
V souboru 256 pacientů starších než 45 let s ataxiemi, kteří byli testováni na přítomnost premutace v genu *FMR1*, byly odhaleny 2 premutace: první nález byl klasický případ FXTAS u muže ve věku 76 let s intenzivním tremorem a premutací o délce 86 CGG (Kazuistika 3), druhý nález byla pacientka se současnou diagnózou Friedreichovy ataxie a s premutací o délce 63 CGG (Kazuistika 4). Výsledky z této studie byly publikovány (Zumrová et al. 2005; Zumrová et al. 2007).

4.1.3. Doporučený algoritmus vyšetření

Na základě získaných zkušeností a s přihlédnutím k doporučením EMQN (http://www.emqn.org/emqn/BestPractice/mainColumnParagraphs/05/document/EMQN%20guidelines%20FRAX_2006.pdf) používáme tento algoritmus molekulárně genetického vyšetření FXS (Obr. 9, 10). U osob bez rodinné anamnézy FXS je prvním krokem vyšetření optimalizovaná klasická PCR, která amplifikuje pouze normální alely a krátké premutace do délky 100 repetit CGG. V případě detekce jednoho produktu normální délky u mužů a dvou normálních produktů různých délek u žen je vyšetření uzavřeno jako negativní. Příslušníci rodin s FXS jsou vyšetřeni přímo kitem Fragile X PCR, protože v těchto rodinách je zvýšená pravděpodobnost výskytu mozaiky normální alely a plné mutace, kterou skrínigová klasická PCR nezachytí. Alely vyšetřené klasickou PCR, jejichž délka se pohybuje na hranici normální alely a premutace, jsou přesněji charakterizovány kitem Fragile X PCR s následnou analýzou v kapilární elektroforéze, která umožní přesné určení délky alely, případně pomocí sekvenace. Kitem Fragile X PCR jsou také vyšetřeny všechny zachycené premutace pro vyloučení případné mozaiky s plnou mutací, dále muži, u kterých se nepodařilo amplifikovat žádný produkt, a také ženy, u kterých skrínigová PCR ukázala pouze jeden normální produkt. Podle našich zkušeností kit amplifikuje spolehlivě i velmi dlouhé expanze (až 4 kb, což je nejdelší expanze detekovaná Southernovou hybridizací v našem souboru u pacientky s FXS). Southernovou metodou jsou pak vyšetřovány pouze ženy, u kterých kit Fragile X PCR amplifikuje pouze jeden normální produkt. U těchto žen totiž nelze s jistotou vyloučit, že normální alela není v heterozygotním stavu spolu s neamplifikovatelnou expandovanou alelou. V případech, kdy by ani klasická PCR ani kit Fragile X PCR nedetekovaly žádný produkt, by se mohlo jednat o delecii nebo polymorfismus v místě vázání primerů a situace by musela být posouzena ještě Southernovou metodou a sekvenací. Takový případ ale nebyl v našem souboru pozorován. Southernovou metodou se též ověřují negativní výsledky získané kitem Fragile X PCR u jedinců z rodin s FXS pro případ selhání amplifikace expandované alely, která by mohla být v mozaice s normální alelou. Ani tento případ nebyl dosud zaznamenán.



Obrázek 9: Používaný algoritmus vyšetření expanze v genu *FMR1* u mužů. Podrobnosti jsou uvedeny v textu. Schéma nezobrazuje ověření negativního výsledku analýzy kitem Fragile X PCR pomocí Southernovy metody, které se provádí v rodinách s FXS, kde by mohla být expandovaná alela v mozaice s alelou normální.



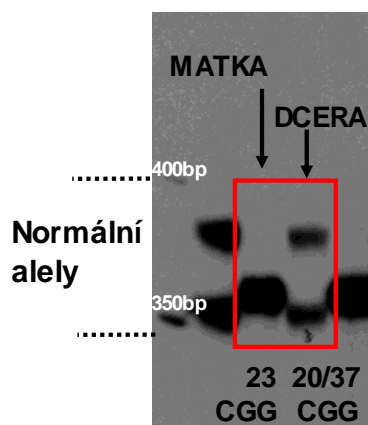
Obrázek 10: Používaný algoritmus vyšetření expanze v genu *FMR1* u žen. Podrobnosti jsou uvedeny v textu. Schéma nezobrazuje ověření negativního výsledku analýzy kitem Fragile X PCR pomocí Southernovy metody, které se provádí v rodinách s FXS, kde by mohla být expandovaná alela v mozaice s alelou normální.

4.1.4. Kazuistiky FXS

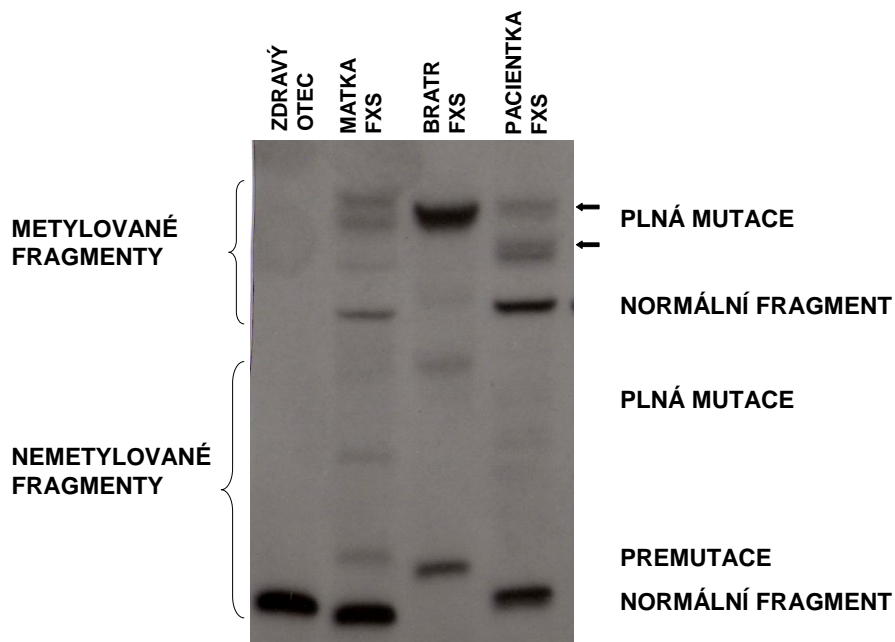
Kazuistika 1: Pacientka s mozaikou plné mutace a dvou normálních alel

Klinická charakteristika: Pacientka byla vyšetřena na našem pracovišti ve 14. měsíci života. Porod byl v termínu, poporodní adaptace v normě, následný vývoj v normě, chodí od 13 měsíců, ve 14 měsících opakuje slova máma, táta. Údaje o dalším vývoji nejsou dostupné. Rodina má anamnézu FXS - trpí jím její bratr a strýc.

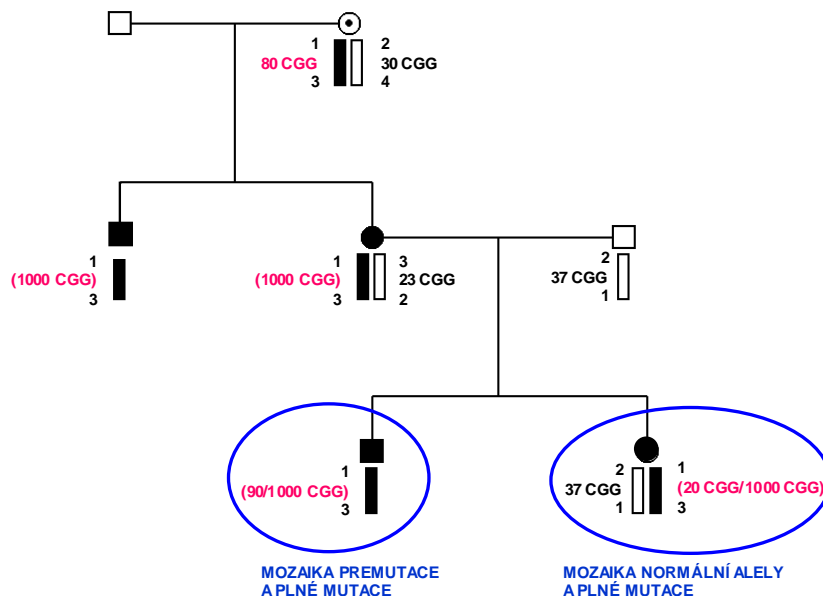
Molekulárně genetická analýza: Plná mutace byla prokázána u bratra, matky a strýce pacientky, maternální babička byla přenašečkou premutace. Přes pozitivní rodinnou anamnézu prokázalo skrínigové vyšetření genu *FMR1* u probandky přítomnost dvou různých normálních alel (Obr. 11). Matka s dcerou ale nesdílely stejnou alelu, proto byla pacientka vyšetřena i Southernovou metodou. Ta odhalila plnou mutaci (Obr. 12). Haplotypová analýza s použitím markerů FRAXAC1 a FRAXAC2 prokázala, že jedna z normálních alel (s 20 CGG) u pacientky vznikla zkrácením plné mutace v některé ze somatických buněk (Obr. 13) a sekvenování neprokázalo delecí okolních sekvencí. Matka i bratr pacientky též vykazovali značný somatický mozaicismus s premutacemi a nemetylovanými plnými mutacemi. Kazuistika ukazuje na důležitost kvalitního klinicko-genetického vyšetření a genealogické analýzy a na nutnost interpretace nálezů v kontextu výsledků molekulárně genetických vyšetření dalších členů rodiny. Také velmi dobře ilustruje komplementaritu různých vyšetřovacích metod a nutnost jejich kombinace.



Obrázek 11: *Fragmentační analýza PCR produktů obsahujících repetici CGG v genu *FMR1*. U dcery lze prokázat dvě normální alely, ale ani jedna není sdílena s matkou. V levé krajní dráze je délkový standard 1kb+ (Invitrogen).*



Obrázek 12: Analýza genu *FMR1* Southernovou metodou (štěpení *HindIII/SacII*, sonda *StB12.3*). U pacientky jsou přítomné jak normální fragmenty (2,8 a 5,2 kb), tak různě dlouhé prodloužené fragmenty ve spektru plné mutace (šipky).

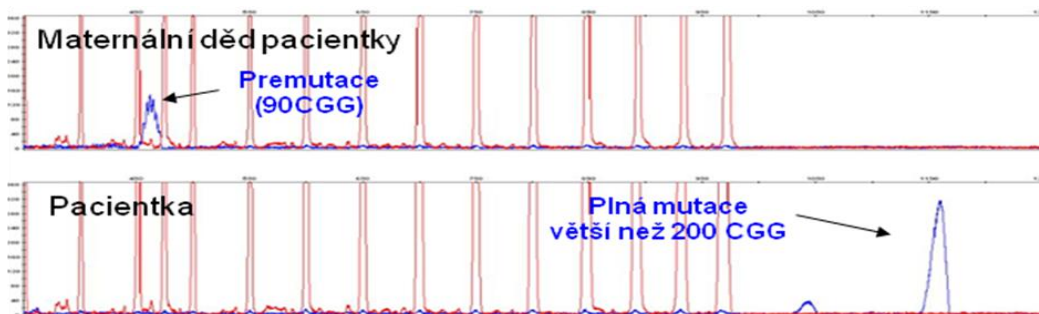


Obrázek 13: Haplotypová analýza rodiny s použitím markerů *FRAXAC1* a *FRAXAC2* a vyšetření repetice v *CGG* genu *FMR1*. Normální alela se nachází u pacientky na stejném haplotypu jako expandovaná alela. Čísla jsou označena alely vyšetřovaných markerů.

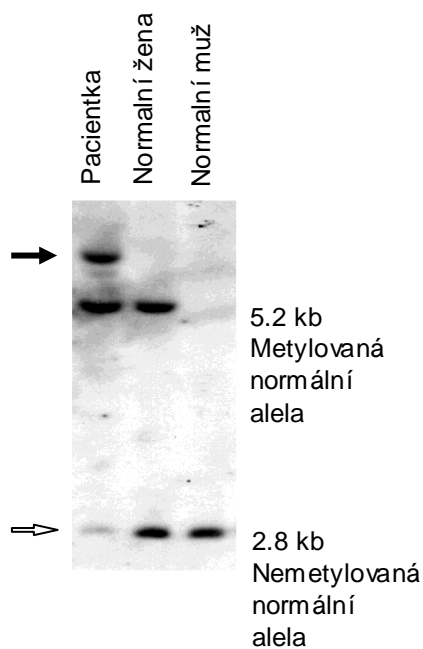
Kazuistika 2: Pacientka s plnou mutací, delecí Xp, nerovnoměrnou X-inaktivací a FXTAS u děda

Klinická charakteristika: Pacientka byla vyšetřena ve věku 6,5 roku pro vývojové opoždění, mírnou MR a autistické rysy. Dívka se narodila v termínu zdravým rodičům z prvního těhotenství s váhou 3750 g. Po porodu byl zaznamenán úbytek váhy v důsledku slabého sání a neonatální ikterus. Dívka začala chodit ve 20 měsících, vývin řeči nebyl opožděn, ale řeč byla zvláštní a dyslalická. Její chování bylo zhodnoceno jako hyperkinetický syndrom s agresí, sebepoškozováním, návaly zuřivosti a stavy úzkosti, a byl u ní diagnostikován atypický autismus. Nápadná byla i nadváha, mírné dysmorfické rysy (prominující čelo, strabismus, širší kořen nosu a dysplastické uši). Měla tlusté ruce s krátkými tlustými prsty. Žádný z příbuzných netrpěl MR ani autismem, avšak u maternálního děda se ve věku 60 let objevil tremor a maternální teta a prababička trpěly předčasným selháním funkce ovárií. To vedlo k cílené analýze genu *FMR1*. Karyotypizace ukázala velkou intersticiální *de novo* delecí Xp22.1-p22.3 (Drahuše Novotná, ÚBLG 2. LF UK a FN Motol).

Molekulárně genetická analýza: Analýza genu *FMR1* kitem Fragile X PCR prokázala u pacientky plnou mutaci větší než 200 CGG (Obr. 14). Metylační analýza genu *FMR 1* Southernovou metodou prokázala expanzi s asi 460 CGG a téměř kompletní metylaci normální alely (Obr. 15). U asymptomatické matky a maternálního děda s tremorem byly detekovány premutace (90 a 96 CGG). Nález premutace u děda byl konsistentní s jeho neurologickými potížemi a potvrdil diagnózu FXTAS (Obr. 14). Delece na chromozomu X byla u pacientky charakterizována pomocí array CGH a dalších metod (velikost 17,4 Mb, deleční zlomy přibližně 6,6 a 24,0 Mb od Xpter, obsah více než 90 genů kódujících proteiny, zasažen paternální chromozom X nesoucí normální alelu *FMR1* (gen *FMR1* je mimo deletovanou oblast), aberace vede k cca 94% přednostní X-inaktivaci (potvrzeno analýzou lokusu *AR*) - Alžbeta Vážna, ÚBLG 2. LF UK a FN Motol). Nález delece na druhém chromozomu X a průkaz jejího dramatického vlivu na přednostní inaktivaci dotčeného chromozomu objasnily u pacientky překvapivý nález téměř kompletní metylace nejen u alely s plnou mutací, ale i u normální alely genu *FMR1*: zatímco mutovaná alela je metylována díky expanzi CGG, normální alela je metylována díky svému umístění na inaktivovaném chromozomu X. Nálezy byly popsány (Vážna et al., v tisku).



Obrázek 14: Detekce expanze v genu *FMR1* s použitím kitu *Fragile X PCR* (Celera) a fragmentační analýzy na přístroji *ABI3130* s délkovým markerem *ROX1000 Size Standard* (Celera). Analýza prokázala přítomnost plné mutace u pacientky a premutaci o délce 90 CGG u jejího děda s tremorem.

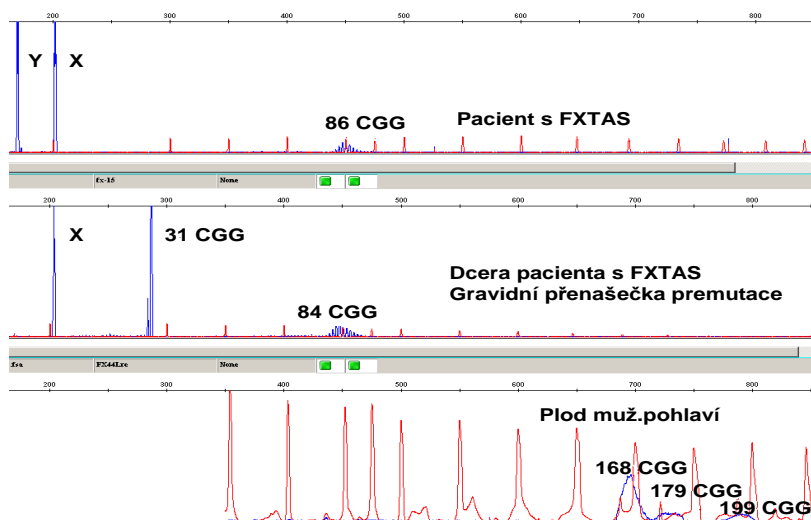


Obrázek 15: Analýza expanze a metylace genu *FMR1* Southernovou metodou (štěpení *HindIII/SacII*, sonda *StB12.3*). Pacientka má kromě normálního metylovaného fragmentu také prodloužený metylovaný fragment (6.6 kb, černá šipka). Signál normální nemetylované alely je velmi slabý (prázdná šipka).

Kazuistika 3: Pacient ze souboru ataktických pacientů s prokázaným FXTAS

Klinická charakteristika: Pacient byl vyšetřen neurologem v 67 letech pro progredující statický a akční třes, od 71 let se přidala i nejistota v chůzi. Psychologické vyšetření potvrdilo poruchy pozornosti a paměti. Pacient byl zařazen do pilotní studie 256 ataktických pacientů starších 45 let.

Molekulárně genetická analýza: Laboratorním genetickým vyšetřením byly vyloučeny FRDA a SCA typu 1, 2, 3, 6 a 7 (Ludmila Apltová, Marta Kopečková, ÚBLG 2. LF UK a FN Motol). Vyšetřením genu *FMR1* byla u pacienta nalezena premutace 86 CGG (Obr. 16). Tento nález byl ve shodě s klinickými příznaky a byl pravděpodobnou příčinou ataxie a kognitivních dysfunkcí. Krátce po stanovení diagnózy u pacienta byla doporučena k molekulárně genetickému vyšetření také jeho v té době gravidní dcera. Analýza u ní potvrdila premutaci (84 CGG). Vyšetření plodu mužského pohlaví vedlo k pozitivnímu nálezu na hranici premutace a plné mutace (Obr. 16) a těhotenství bylo na přání pacientky ukončeno. Nález byl publikován (Zumrová et al. 2007).

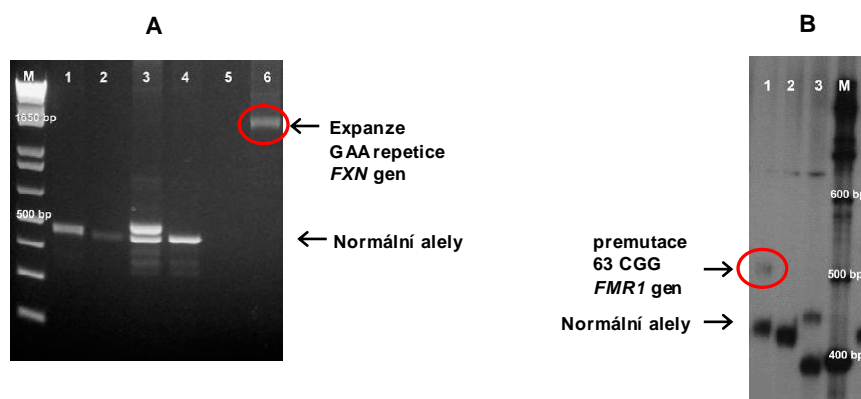


Obrázek 16: Fragmentační analýza PCR produktů repetice CGG v genu *FMR1* pacienta s FXTAS, jeho dcery a plodu s použitím kitu Fragile X PCR (Celera). U pacienta byla odhalena premutace s délkou 86 CGG, u jeho dcery byla potvrzena premutace 84 CGG a prenatalní diagnostika u plodu mužského pohlaví prokázala přítomnost alely s hraniční délkou mezi premutací a plnou mutací.

Kazuistika 4: Pacientka s FRDA se současným nálezem premutace FMR1

Klinická charakteristika: Pacientka byla vyšetřena neurologem ve věku 56 let pro problémy se stabilitou, které se poprvé objevily ve věku 49 let. V klinickém nálezu byla nejistá chůze o široké bazi, mírný intenční tremor a minimální dysartrie. Intelekt a orientace pacientky byly v normě. Otec pacientky zemřel na neoplázii mozku ve věku 75 let, matka zemřela ve věku 87 let ve stavu kachexie. Sestra (66 let) měla podobné obtíže s chůzí jako pacientka, které se u ní objevily ve 48 letech. Pacientka byla zařazena do pilotní studie 256 ataktických pacientů starších 45 let.

Molekulárně genetická analýza: Laboratorní genetické vyšetření prokázalo FRDA (expanze genu *FXN* na obou chromozomech - Ludmila Apltová, ÚBLG 2. LF UK a FN Motol) (Obr. 17A). U pacientky byla ale současně nalezena i premutace v genu *FMR1* s délkou 63 CGG (Obr. 17B). Nález byl publikován (Zumrová et al. 2005). Význam této komorbidity je z hlediska klinického stavu pacientky, případně i jeho další progresu, diskutabilní.



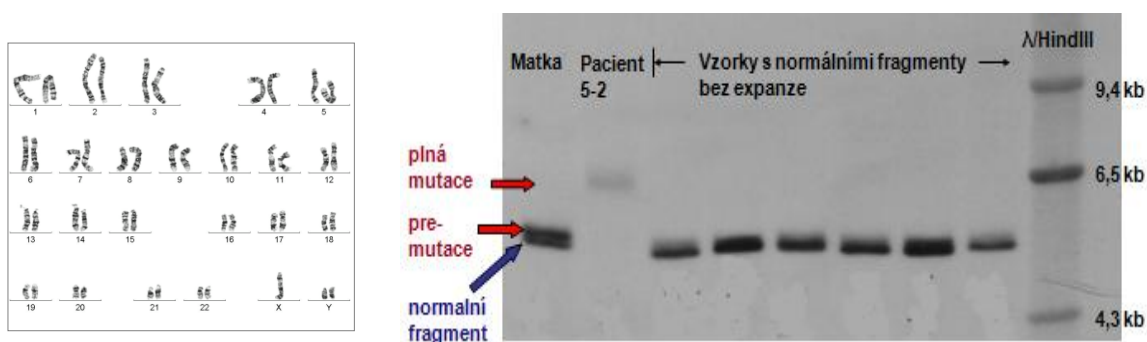
Obrázek 17: PCR analýza genu *FXN* (A) a genu *FMR1* (B). U pacientky je zjevná expanze v genu *FXN* a absence normální alely (A, dráha 6), stejně tak jako premutace v genu *FMR1* (B, dráha 1). Nálezy u pacientky jsou zvýrazněny červenými elipsami. Pro analýzu genu *FMR1* byla použita metoda radioaktivní PCR.

Kazuistika 5: Dva pacienti s plnou mutací a karyotypem 47,XYY

Klinická charakteristika pacienta 5-1: Chlapec se narodil v termínu z 1. gravidity zdravých rodičů. Od 4. měsíce byla pozorována psychomotorická retardace. Pacient chodil až od 3 let, ve 3 letech nemluvil ani řeči nerozuměl, byl bez základní orientace a neustále křičel. Jeho fenotyp charakterizovala brachycefalie, kulatý nos, velké ušní boltce a makroorchismus. Neurologické vyšetření neprokázalo mozečkovou patologii, ale jasná byla horší koordinace v jemné a hrubé motorice. Pacient trpěl epileptickými záchvaty. Matka pacienta měla mírný mentální deficit, v širší rodině žádné potíže ani vývojové vady nebyly uvedeny. Cytogenetická analýza pacienta prokázala karyotyp 47,XYY (Marie Trková, GENNET Praha).

Klinická charakteristika pacienta 5-2: Chlapec pocházel z 1. rizikové gravidity. Porod se uskutečnil v termínu, porodní váha byla 4300 g. Novorozenec byl resuscitován, trpěl ikterem léčeným fototereapií a transfuzí. Pacient chodil od 12 měsíců, ale trpěl opožděním řeči (ve třech letech uměl jen 2-3 slova). V současnosti je 20-letý s výškou 2 m (nad 97. percentilem), má dlouhý obličej, velké ruce a nohy a zvětšená testes. Vykazuje mírnou až středně těžkou mentální retardaci, autistické rysy a sklony k agresivitě. V rodině nebyly zaznamenány žádné další případy mentální retardace. Cytogenetická analýza prokázala karyotyp 47,XYY (Drahuše Novotná, ÚBLG 2. LF UK a FN Motol) (Obr. 18A).

Molekulárně genetická analýza: U obou pacientů byla prokázána plná mutace v genu *FMR1* (pacient 5-2 – Obr. 18B). Koincidence těchto nálezů je pozoruhodná.

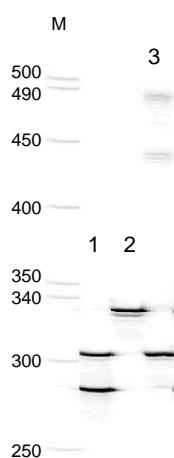


Obrázek 18: Karyotyp (A) a vyšetření genu *FMR1* Southernovou metodou (štěpení *HindIII*, sonda *StB12.3*) (B) u pacienta 5-2. Karyotypování prokázalo karyotyp 47,XYY a analýza genu *FMR1* ukázala premutaci u matky a plnou mutaci u pacienta.

4.2. Myotonická dystrofie typ 1

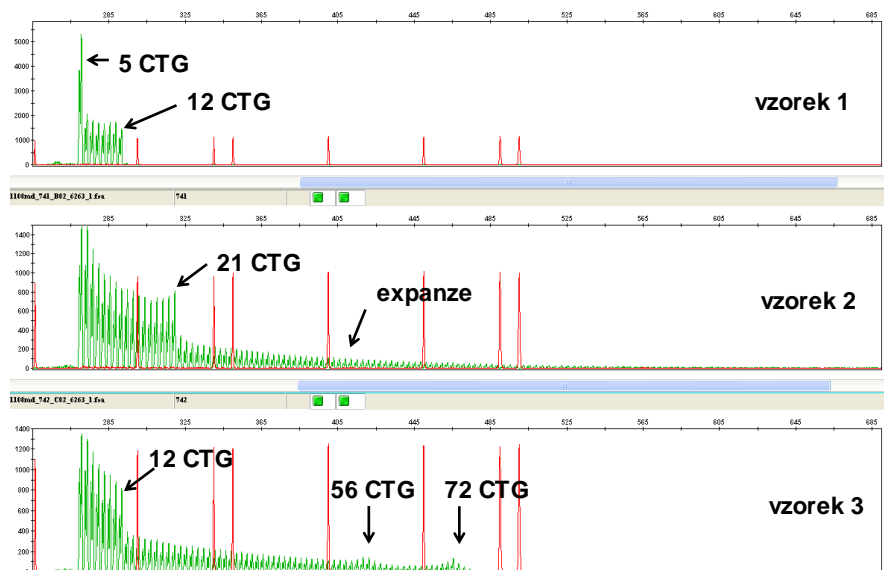
4.2.1. Optimalizace a zavedení nových metod

Pro zefektivnění diagnostiky DM1 byla zavedena fluorescenční PCR pro amplifikaci normálních alel, která nahradila PCR s přímou inkorporací radioizotopu. Fluorescenčně značené PCR produkty byly separovány v denaturačním polyakrylamidovém gelu na analyzátoru Gel-Scan 2000 (Obr. 19). Výhodou této nově zavedené metody byla kromě vyřazení práce s radioizotopem především rychlost a poměrně vysoká přesnost určení délky normálních PCR produktů. Metoda zachytí expanzi s délkou do 100 CTG.



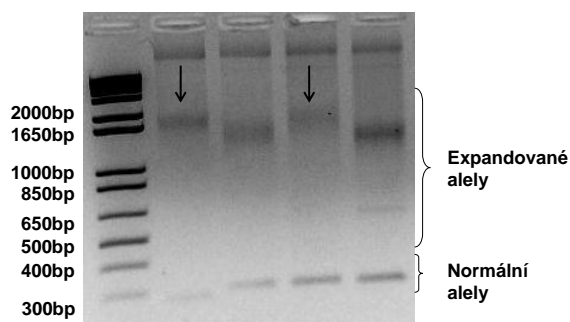
Obrázek 19: Příklad analýzy PCR produktů pacientů 1, 2 a 3 získaných pomocí primerů GCT1/Somy4R ležících na protilehlých stranách repetice v genu DMPK na analyzátoru Gel-Scan 2000. Vzorek 1 obsahuje dvě normální alely. Vzorek 2 má jen jednu normální alelu a přítomnost neamplifikovatelné expanze na druhém chromozomu není vyloučena. Vzorek 3 je pacient s normální alelou a mozaikou krátkých expanzí (odhadovaný počet opakování 55 a 70 CTG). Upřesnění délky alel viz Obr. 20. V první dráze (M) je délkový marker GeneScan-500 TAMRA Size Standard (Applied Biosystems).

Pro vyhledávání expandovaných alel byla zavedena také fluorescenční metoda TP-PCR (Obr. 20). Její předností je opět rychlost a přesnost při určování délky hraničních alel. Není však vhodná pro určení délky expanzí delších než 100 CTG.



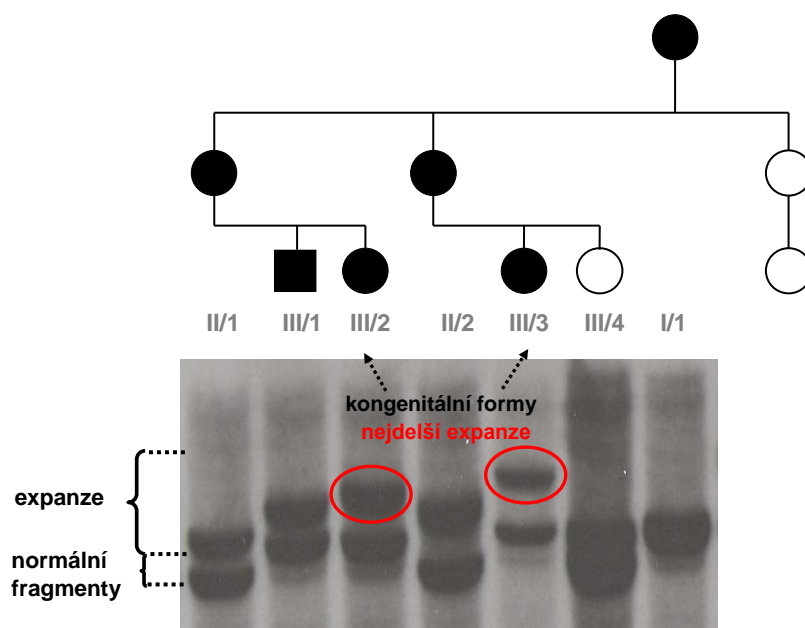
Obrázek 20: Příklad analýzy TP-PCR produktů amplifikovaných na CAG vlákne u pacientů 1, 2 a 3 (viz též Obr. 19) na analyzátoru ABI3130 (Applied Biosystems). Zelený pík odpovídá nejkratšímu fragmentu (vlevo) s 5 trinukleotidy CTG, každý další pík představuje nárůst o 1 trinukleotid. Červené píky znázorňují marker GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems). Vzorek 1 obsahuje normální alely 5 a 12 CTG, vzorek 2 má normální alelu 21 CTG a expanzi. U vzorku 3 je normální alela 12 CTG a mozaika expanze o délce 56 CTG a 72 CTG.

Pro detekci expanzí do velikosti 500 CTG byla zavedena metoda long-range PCR s použitím kitu Expand (Roche) (Obr. 21). Optimálních reakčních podmínek bylo po extenzivním testování dosaženo s použitím pufru 2 a 2M betainu.



Obrázek 21: Příklad separace LR-PCR produktů obsahujících repetici v genu DMPK u pacientů s DM1. Nejdelší produkty jsou vyznačeny šipkou (přibližná délka 450 CTG).

Pro detekci a určení délky dlouhých expanzí byla zavedena Southernova metoda (příklad analýzy rodiny s DM1 je na Obr. 22). Genomová DNA byla štěpena enzymem *EcoRI*, fragmenty byly separovány v agarózovém gelu, blotovány a hybridizovány s radioaktivně značenou sondou. Tato sonda byla připravena amplifikací z genomové DNA s použitím vlastních navržených primerů Somy1F/886R komplementárních k fragmentu nesoucímu repetici.

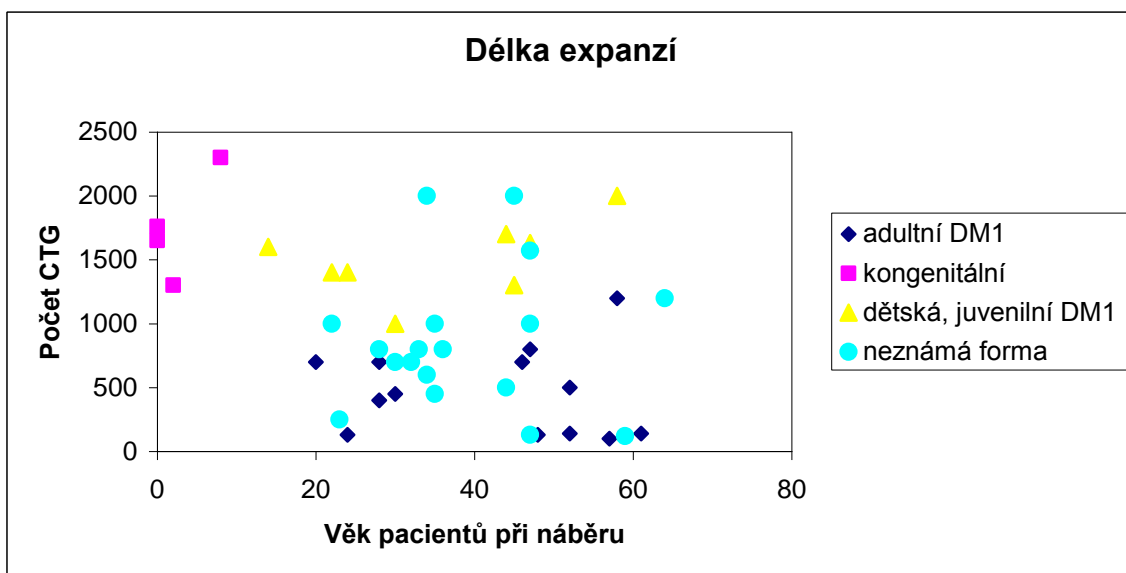


Obrázek 22: Příklad analýzy genu *DMPK* v třígenerační rodině s DM1 Southernovou metodou (štěpení *EcoRI*, PCR sonda). Normální fragmenty mají délku 8.6 a 9.8 kb, fragmenty s expanzí jsou delší než 9.8 kb. Je vidět postupné prodlužování expanze v následujících generacích. Červeně jsou vyznačeny nejdelší expanze, které jsou spojeny s nejtěžšími kongenitálními formami. Pacientka I/1 má krátkou expanzi, která splývá s normálním fragmentem.

4.1.2. Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru

V souboru 675 pacientů, kteří splňovali indikační kritéria pro testování myotonické dystrofie, bylo detekováno 171 pozitivních pacientů s expanzí v genu *DMPK*. Pacienti pocházeli z 87 nepříbuzných rodin. V tomto souboru bylo také zachyceno několik ojedinělých nálezů, jako pacientka s DM1 s expanzemi na obou chromozomech (Kazuistika 6) a čtyři rodiny s DM1 a dva pacienti s intermediárními alelami s repeticí CTG přerušenu jinými tripletami (CCG a CTC) (Kazuistika 7).

U 41 potvrzených pacientů s DM1 jsme získali informaci o délce jejich expanze ze Southernovy hybridizace. Na Obr. 23 jsou shrnuty délky expanzí u těchto pacientů s ohledem na věk pacienta v čase odběru periferní krve pro izolaci DNA. Pacienti s kongenitální formou onemocnění měli expanze větší než 1000 CTG repetit, zatímco ostatní pacienti měli různě dlouhé expanze mezi 100 až 2000 CTG, přičemž pacienti s lehkou formou onemocnění měli expanzi do délky 150 CTG. Podrobný klinický popis pacientů s dlouhými expanzemi (nad 1000 CTG) se podařilo zpětně získat jen od 7 pacientů, z nichž u 1 byl zaznamenán nástup nemoci ve 4 letech a u 6 v počátku 2. dekády života, u 5 z nich příznaky zahrnovaly též mírný mentální deficit.

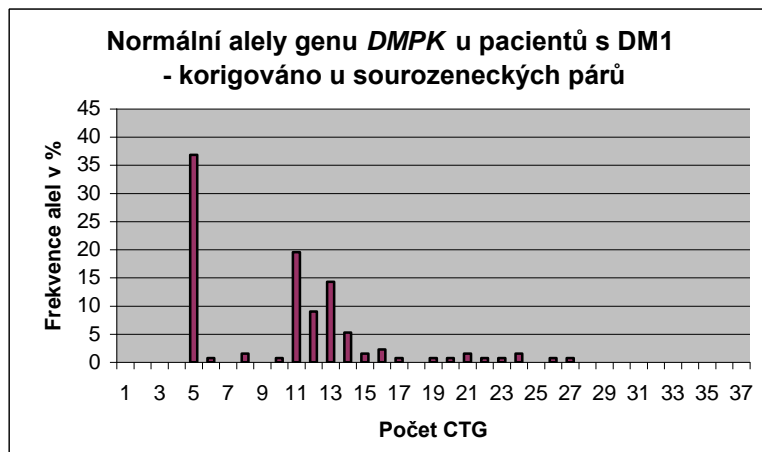
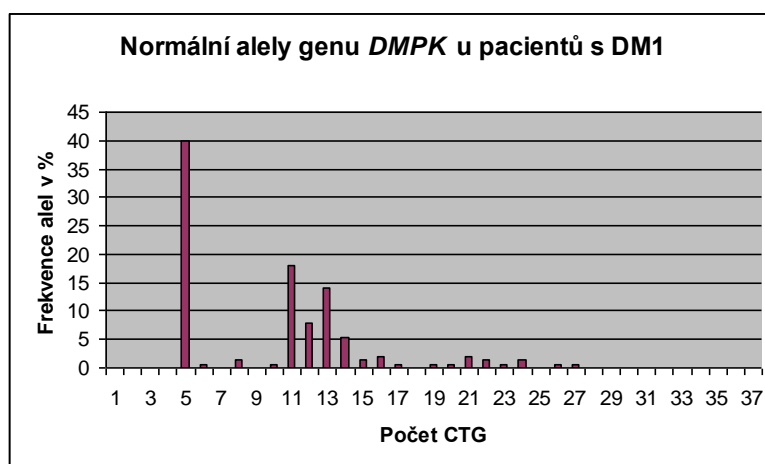
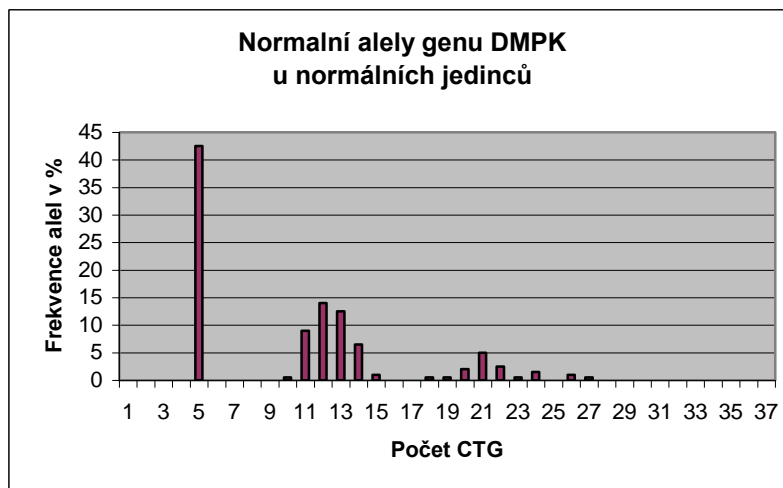


Obrázek 23: Přehled délek nalezených expanzí u pacientů s DM1 vynesných podle věku při odběru vzorku. Pacienti s kongenitální formou (zobrazení růžovými čtverci) mají délku expanze větší než 1000 CTG, s dětskou/juvenilní formou (žluté trojúhelníky) mají délku expanze od 1000 do 2000 CTG, s adultní formou mají délku expanze mezi 100 a 1300 CTG (modré čtverce). Světle modrými kroužky jsou znázorněni pacienti s neznámou formou DM1.

V rámci studie frekvence přerušených alel (Kazuistika 7) jsme zjišťovali také spektra normálních alel v populaci. K dispozici jsme měli údaje ze souboru 100 normálních kontrolních jedinců (200 alel) a údaje o normálních alelách ze souboru postižených. Před sloučením jsme tyto údaje navzájem porovnali. Protože postižení nebyli na rozdíl od kontrol vždy nepříbuzní (v souboru bylo několik postižených sourozeneckých párů), provedli jsme korekci vyloučením jednoho postiženého z každého páru (v souboru byl ponechán vždy mladší sourozenec a starší byl vyřazen). Výsledky shrnuje Tab. 10 a Obr. 24. Frekvence normálních alel u obou souborů je trimodální s vrcholy u alel s délkou 5, 12 a 21 CTG. U pacientů s DM1 je však frekvence alely s 5 CTG snižena oproti kontrolnímu souboru o 2-5%, a frekvence alely s 11 CTG je naopak zvýšená až o 10%.

Tabulka 10: Přehled délek normálních alel genu *DMPK* u různých souborů

Soubor	Počet repetice CTG
kontrolní soubor (N=100 osob)	počet alel s příslušnou délkou opakování u kontrol (N=200 alel) 5 CTG - 85x, 10 CTG - 1x, 11 CTG - 18x, 12 CTG - 28x, 13 CTG - 25x, 14 CTG - 13x, 15 CTG - 2x, 18 CTG - 1x, 19 CTG - 1x, 20 CTG - 4x, 21 CTG - 10x, 22 CTG - 5x, 23CTG - 1x, 24 CTG - 3x, 26 CTG - 2x, 27 CTG - 1x
	počet alel po sloučení do skupin dle délky <11 CTG - 86x, 11 CTG - 18x, 12 CTG - 28, 13 CTG - 25x, 14 CTG - 13x, >14 CTG - 30x
soubor pacientů s DM1 (N=148 osob)	počet alel s příslušnou délkou opakování u pacientů (N=148 alel) 5 CTG - 60x, 6CTG - 1x, 8CTG - 2x, 10 CTG - 1x, 11 CTG - 27x, 12 CTG - 12x, 13 CTG - 21x, 14 CTG - 8x, 15CTG - 2x, 16 CTG - 3x, 17CTG - 1x, 19 CTG - 1x, 20 CTG - 1x, 21 CTG - 3x, 22 CTG - 2x, 23CTG - 1x, 24 CTG - 2x, 26 CTG - 1x, 27 CTG - 1x
soubor pacientů s DM1 po korekci (N=126 osob)	počet alel s příslušnou délkou opakování u pacientů po korekci (N=126 alel) 5 CTG - 49x, 6CTG - 1x, 8CTG - 2x, 10 CTG - 1x, 11 CTG - 26x, 12 CTG - 12x, 13 CTG - 19x, 14 CTG - 7x, 15CTG - 2x, 16 CTG - 3x, 17CTG - 1x, 19 CTG - 1x, 20 CTG - 1x, 21 CTG - 2x, 22 CTG - 1x, 23CTG - 1x, 24 CTG - 2x, 26 CTG - 1x, 27 CTG - 1x
	počet alel po sloučení do skupin dle délky <11 CTG - 53x, 11 CTG - 26x, 12 CTG - 12x, 13 CTG - 19x, 14 CTG - 7x, >14 CTG - 16x

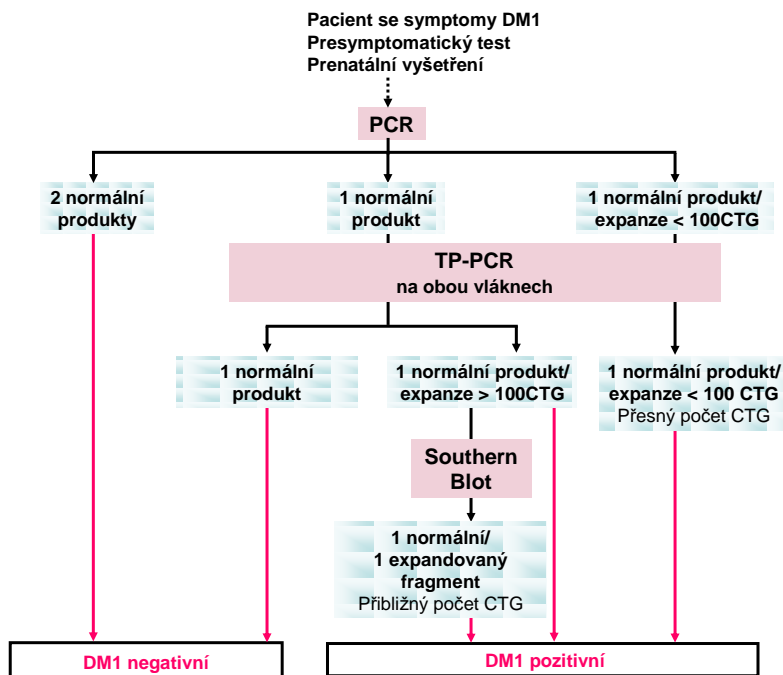


Obrázek 24: Grafy frekvence normálních alel v kontrolním souboru (nahore), v souboru pacientů s DM1 (uprostřed), a v souboru korigovaném u postižených sourozeneckých párů ponecháním alely pouze nejmladšího postiženého sourozence (dole). Podrobnosti jsou uvedeny v textu.

Pro zjištění statistické významnosti rozdílů ve spektrech délek normálních alel u kontrol a u postižených jedinců byla data podrobena statistické analýze. Alely byly kvůli malému počtu reprezentantů některých délek rozděleny do 6 skupin (alely menší než 11 CTG, 11 CTG, 12 CTG, 13 CTG, 14 CTG, a větší než 14 CTG, Tab. 10). Data byla posouzena Chí kvadrát testem homogenity (Chí-kvadrát = 9,47; 5 stupňů volnosti; $P = 0,09169$; statistickou analýzu provedl Dr. Roman Krejčí). Analýza naznačuje, že nic nesevídčí proti hypotéze, že rozdělení počtů ve skupinách je stejné pro kontroly i pro pacienty a že pozorované odchylky jsou náhodné.

4.2.3. Doporučený algoritmus vyšetření

Při testování DM1 je s přihlédnutím k doporučením EMQN používán dvoukrokový PCR test (klasická PCR a TP-PCR) (Obr. 25). TP-PCR je prováděna na obou vláknkách DNA, aby se předešlo falešně negativním výsledkům z důvodu polymorfismů v místech nasedání primerů jak vně, tak uvnitř repetice (viz níže). V případě sporných výsledků je vzorek vyšetřen opakovaně všemi dostupnými metodami včetně Southernova blotu. Tato metoda je vhodná také pro zjišťování délky dlouhých expanzí v případech, kdy takový požadavek vychází z indikace.



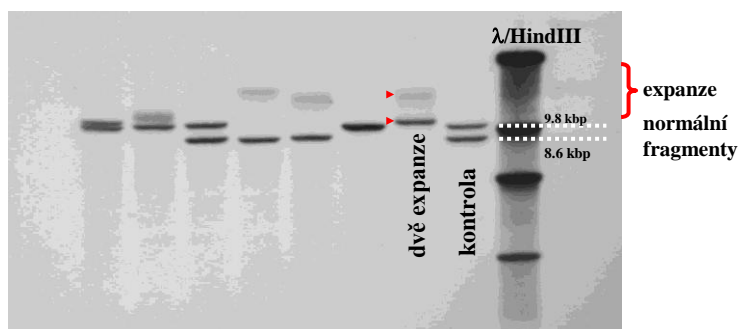
Obrázek 25: Algoritmus vyšetření expanze v genu DMPK. Podrobnosti viz text.

4.2.4. Kazuistiky DM1

Kazuistika 6: Pacientka s DM1 s expanzemi na obou chromozomech

Klinická charakteristika: Jedná se o pacientku s klasickým fenotypem DM1 s ptózou, kataraktou (operace ve věku 45 let), poruchou štítné žlázy (operace ve věku 42 let), kognitivním deficitem, slabostí horních a dolních končetin, distálním typem atrofie svalů, myotonií s myopatickou složkou (neurologické vyšetření ve věku 47 let). Má chůzi o širší bázi. Porucha převodového systému srdce nebyla zjištěna. První příznaky poruchy dekontrakce na horních končetinách pacientka zpozorovala na základní škole. Výskyt svalového onemocnění v rodině pacientka neuvádí.

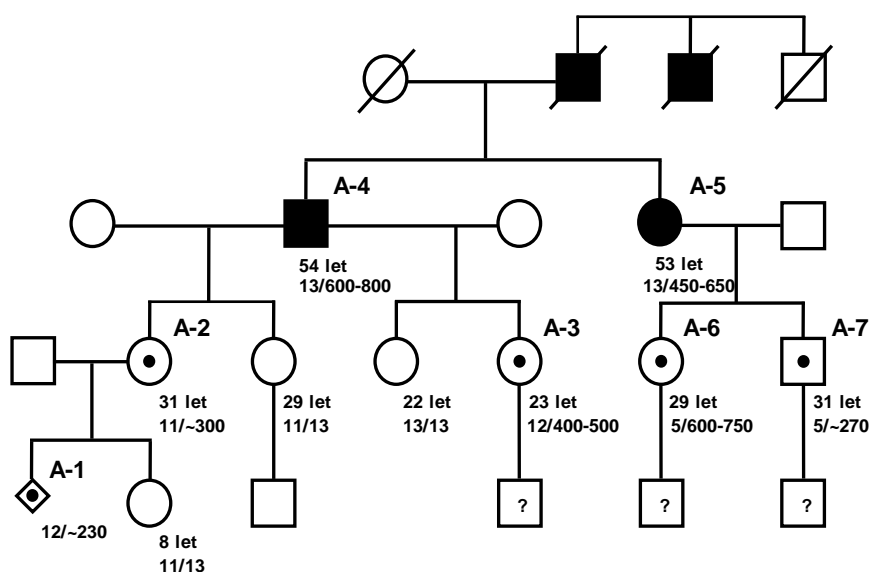
Molekulárně genetická analýza: Analýza genu *DMPK* metodou PCR a Southernova blotu prokázala expanzi na obou chromozomech s délkou 59 CTG (upřesněno též sekvenací) a 1600 CTG. Na Obr. 26 je výsledek Southernova blotu pacientky.



Obrázek 26: Southernův blot pacientů s DM1 (štěpení *EcoRI*, PCR sonda). Nález dvou expanzí u pacientky (dráha 6) je zvýrazněn červenými šipkami. Normální fragmenty mají délku 8.6 a 9.8 kb, fragmenty s expanzí jsou delší než 9.8 kb.

Kazuistika 7: Rodiny s repeticí CTG přerušenu jinými tripletly (CCG a CTC)

Klinická charakteristika rodiny A: Rodina byla zachycena prostřednictvím dvou sourozenců s myotonickou dystrofií (A-4, A-5). Pacient A-4 byl poprvé vyšetřen neurologem ve věku 53 let pro slabost prstů rukou, poruchy chůze a řeči a křeče trvající nejméně 3 roky. EMG potvrdila myotonické výboje distálních svalů a axonální polyneuropatii. Pacient měl též bilaterální kataraktu, hyperglykemii a podstoupil operaci štítné žlázy. Pacientka A-5 byla poprvé vyšetřena ve věku 42 let z důvodu přetrvávající únavy. Fyzikální vyšetření prokázalo myotonii distálních svalů a EMG potvrdilo myotonii bez známek dystrofie. EKG vyšetření ukázalo 1. stupeň AV-bloku. Pacientka A-5 neměla diabetes ani kataraktu. V čase testování nemělo žádné z dětí A-4 a A-5 podobné klinické obtíže ani anomálie na EMG. Na Obr. 27 je znázorněn rodokmen rodiny A.



Obrázek 27: Rodokmen rodiny A. Pacienti a další členové rodiny, kteří byli molekulárně geneticky vyšetřeni, mají v rodokmenu vyznačeny počty opakování tripletů v repetících jejich alel genu DMPK. Plnými symboly jsou označeny osoby vykazující příznaky. Žádný z pozitivně testovaných potomků pacientů A-4 a A-5 (A-2, A-3, A-6, A-7) nevykazoval v době testování žádné symptomy myotonické dystrofie (rodokmenové symboly označené tečkou).

Klinická charakteristika rodiny B: Pacient B-1 byl doporučen k neurologickému vyšetření ve věku 50 let. Od 40 let měl problémy uvolnit po kontrakci čelistní svaly a současně se objevila bilaterální katarakta. Od 45 let se objevily křeče a problémy s dekontrakcí drobných svalů rukou. Pacient však neměl svalovou atrofii ani slabost. EMG prokázala myotonické výboje bez svalové dystrofie. Pacient neměl patologický nález na EKG ani žádné endokrinní problémy. Jeho otec měl bilaterální kataraktu a diabetes mellitus a zemřel v 55 letech na rakovinu. Syn (B-2) ani dcera pacienta neměli v čase testování žádné svalové potíže. Jejich nález EMG byl negativní.

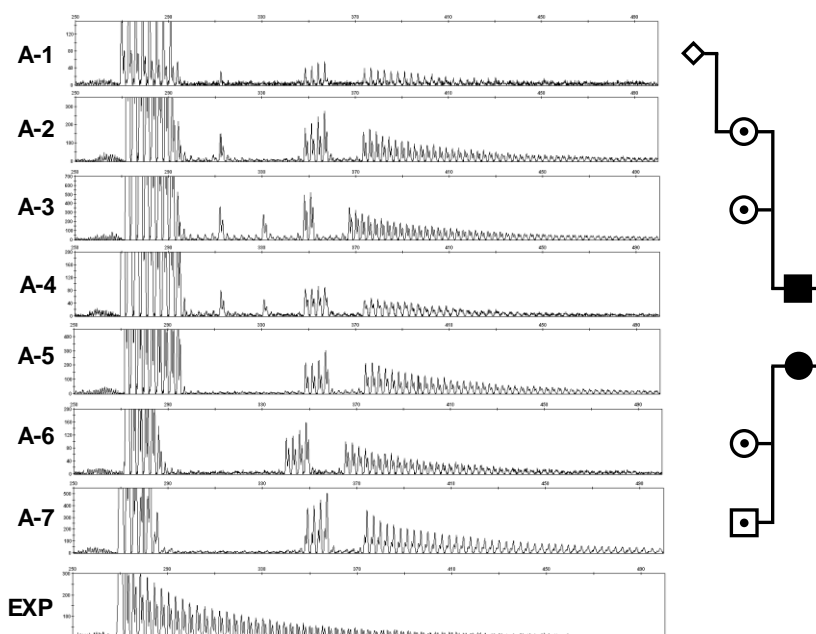
Klinická charakteristika rodiny C: 49-letá pacientka C si všimla svalové hypertonie a křečí v lýtkách a stehnech ve věku 23 let. Od 41. roku života měla problémy s chůzí a pozorovala i slabost drobných svalů ruky. Vyšetření odhalilo myotonii a slabost distálních svalů a atrofii distálních svalů končetin. Jehlová EMG prokázala četné myotonické výboje se svalovou dystrofií, indukční studie prokázaly mírnou senzickou a motorickou polyneuropatii. 71-letá matka pacientky trpěla podobnými problémy od 40. roku života, v současnosti je 4 roky upoutaná na vozíku.

Klinická charakteristika rodiny D: Pacientka D-1 byla poprvé vyšetřena v 56 letech. Zhoršenou chůzí a pocit ztuhlosti pozorovala od 45 let. Vyšetření ukázalo poruchy dekontrakce rukou, myopatické držení trupu a ochablost břišních svalů. EMG prokázalo myotonickou reakci. Pacientka měla též bilaterální kataraktu a náznak frontální alopecie. Neurolog vyslovil podezření na DM1. O 6 let později byla vyšetřena i její 36-letá dcera (D-2) s poruchami chůze a svalovou slabostí, kterými trpěla od 35 let. EMG prokázalo myotonické výboje a iniciální kataraktu.

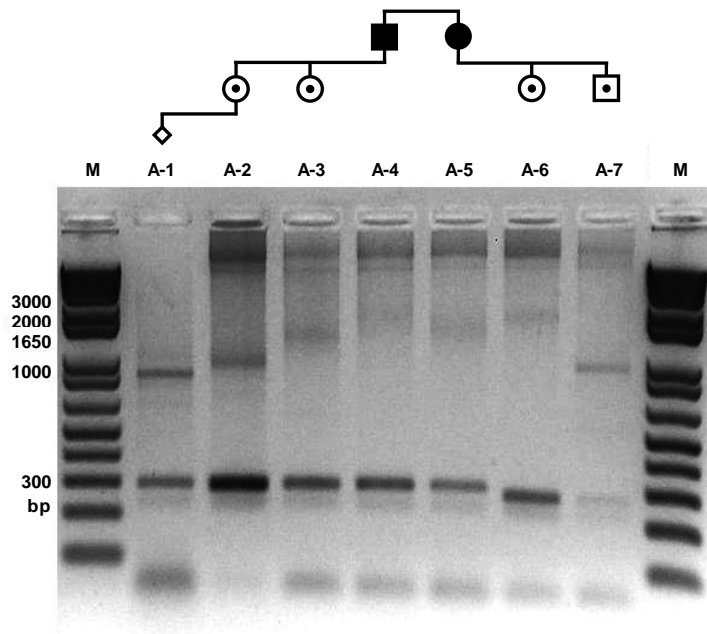
Klinická charakteristika pacienta E: 29-letý pacient trpěl od svých 7 let mytonií, která progredovala do konce 2. dekády života. Vyšetření prokázalo difuzní svalovou hypertrofii s mytonií distálních svalů horních končetin. EMG potvrdilo myotonické výboje bez svalové dystrofie. Žádný z rodičů neměl podobné obtíže.

Klinická charakteristika pacienta F-1: 20-letý pacient byl nápadný malým vzrůstem, krátkým trupem, krátkými horními končetinami, deformitami nohy, atrofií lýtkových svalů a ptózou. Od narození trpěl svalovou ztuhlostí a později se vyvinuly kontraktury šlach na loktech a kolenou. EMG neprokázala myotonii, ale neurolog vyžádal vyšetření genu *DMPK*. V rodině nebyla jiná neuromuskulární onemocnění, ale otec a paternální děd měli omezenou roztažitelnost kloubů a malý vzrůst.

Molekulárně genetická analýza rodiny A: Cílené vyšetření metodou TP-PCR prokázalo expanzi u pacienta A-4, avšak TP-PCR produkty amplifikované pomocí primeru nasedajícího distálně od repetice dávaly neobvyklý obraz, ve kterém chyběly signály některých TP-PCR produktů. Výsledek byl proto verifikován Southernovou metodou, která pozitivní výsledek potvrdila a určila délku expanze na 600-800 CTG. Expanze byla následně potvrzena i u dalších příbuzných včetně pacientky A-5. Obraz TP-PCR produktů amplifikovaných z distálního konce repetice se v kapilární elektroforéze u jednotlivých příbuzných ztelně lišil (Obr. 28). Sekvenování TP-PCR produktů odhalilo u všech členů rodiny s expanzí několik přerušení repetice CTG trinukleotidy CCG a CTC na jejím 3' konci. Tato přerušeni zabraňovala vazbě primeru komplementárního k repetici CTG. Jednotliví členové rodiny se lišili v umístění a počtu přerušeni v repetici (Obr. 32, 33). Kromě toho byla rodina zvláštní akumulací kontrakcí expanze. Z 5 intergeneračních přenosů došlo jen v jediném případě k prodloužení expanze (maternálně). Ve zbylých 4 případech došlo ke kontrakcím expanzí (dva maternální a dva paternální přenosy) (Obr. 29).

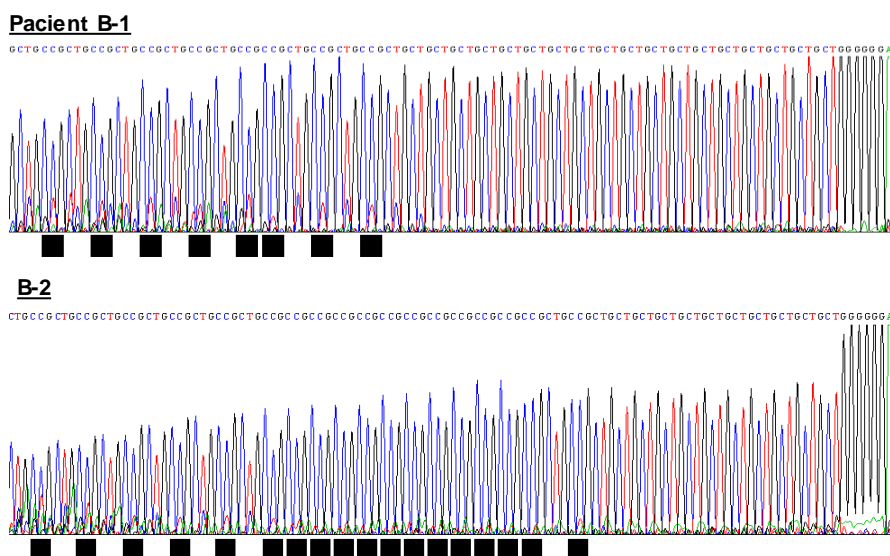


Obrázek 28: Fragmentační analýza TP-PCR produktů genu DMPK amplifikovaných primerem vázajícím se distálně od repetice u členů rodiny A a u kontrolního vzorku s nepřerušenu expanzí (EXP). Na křivkách chybí signály TP-PCR produktů začínajících od míst, kde se primer nemohl navázat. Po straně je přiložen zjednodušený rodokmen pro usnadnění sledování intergeneračních přenosů.



Obrázek 29: Elektroforéza PCR produktů amplifikovaných s použitím primerů vázajících se před a za repeticí za podmínek long-range PCR. Z pěti intergeneračních přenosů jen u jednoho došlo k prodloužení expanze (z A-5 na A-6), u čtyř dalších došlo ke kontrakci. Připojen je zjednodušený rodokmen pro usnadnění sledování intergeneračních přenosů.

Molekulárně genetická analýza rodiny B: Vyšetření TP-PCR prokázalo přítomnost expanze u pacienta B-1, avšak pouze v reakci s použitím primeru lokalizovaného před repeticí. TP-PCR s použitím primeru nasedajícího za repetici dávala opakovaně negativní výsledek. Long-range PCR stanovila délku expanze na 450 CTG. Testovali jsme možnost výskytu polymorfismu v místě nasedání primeru, případně delecii oblasti přiléhající na 3' konec repetice, avšak bez úspěchu. Nález v rodině A poukázaly na to, že za selhání TP-PCR by mohla být odpovědná podobná přerušení v repetici. Použitím dalších variant TP-PCR a long-range TP-PCR s repetitivními primery navrženými tak, aby se vázaly do repetice přerušené tripletu CCG, jsme konečně získali produkt TP-PCR amplifikován z 3' konce repetice. Následná sekvenace odhalila sekvenci $(CTG)_n(CCGCTG)_{33-39}(CCG)(CCGCTG)_3(CTG)_{18}$ na expandované alele. Pravidelný sled hexanukleotidů $(CCGCTG)_n$ byl přerušen jedním tripletem CCG (Obr. 30). Expandovaná alela pacientova asymptomatického syna (B-2) s přibližnou délkou 400 repetic měla sekvenci $(CTG)_n(CCGCTG)_{35-37}(CCG)_{12}CTG CCG(CTG)_{11}$. Na této alele se objevil souvislý sled 12 CCG nepřítomný u otce (Obr. 30).

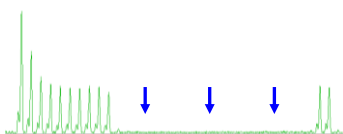


Obrázek 30: Střední části sekvence TP-PCR produktů expandovaných alel pacienta B-1 a jeho zdravého syna B-2 s použitím primeru vázajícího se distálně od repetice a repetitivního primeru P4CC specifického pro poslední přerušení CCG. Expandovaná alela B-2 obsahuje kromě opakování tripletu CTG a hexameru CTGCCG též kontinuální sled 12 CCG, který není přítomen u otce. Černé čtverce zvýrazňují tripletu CCG.

Molekulárně genetická analýza pacientky C: TP-PCR u pacientky C dávala podobně jako u rodiny B rozporuplné výsledky: z proximální strany repetice výsledek svědčil pro expanzi, reakce z distální strany expanzi neamplifikovala. Southernova metoda prokázala expanzi o velikosti asi 700 CTG. Sekvenací TP-PCR produktů amplifikovaných z distální strany s použitím repetitivních primerů obsahujících přerušeni CCG (P4CC, P4hex1) byla odhalena komplexní konfigurace mnohočetných nepravidelných přerušeni tripletem CCG na 3' konci repetice (Obr. 32, 33).

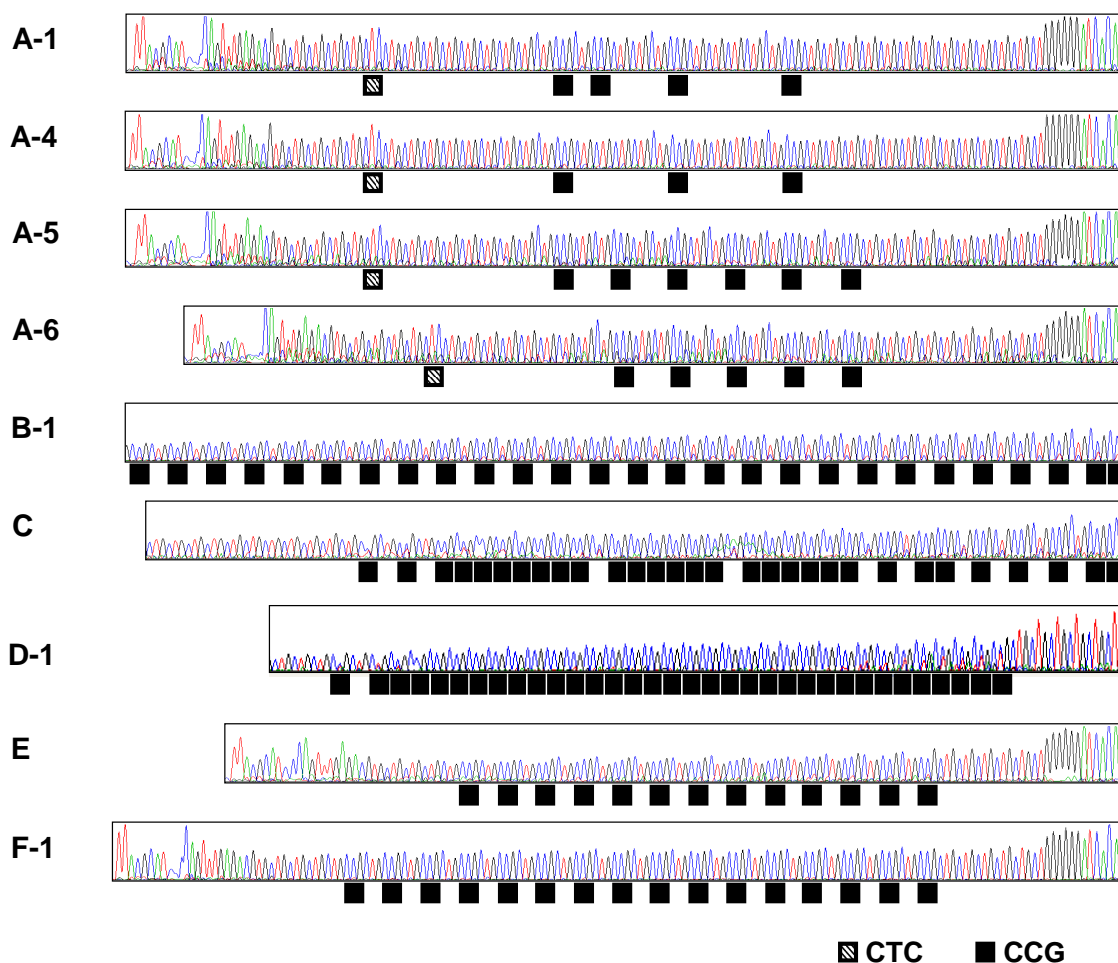
Molekulárně genetická analýza rodiny D: Southern blot prokázal u pacientek D-1 a D-2 přítomnost expanze v genu *DMPK* s přibližnou délkou 500 a 800 tripletů. Pozdější analýza metodou TP-PCR odhalila chybějící produkty amplifikované z 3' konce expanze. Sekvence long-range TP-PCR produktů amplifikovaných z této strany repetice u obou pacientek odhalila překvapivou konfiguraci obsahující kontinuální blok 32 a 39 CGG tripletů (Obr. 32, 33).

Molekulárně genetická analýza pacienta E: Analýza prokázala alely s 14 a 37 tripletů. TP-PCR dávala opět neobvyklý obraz (Obr. 31). Následná sekvenace odhalila na delší alele sekvenci (CTG)₆(CCGCTG)₁₃(CTG)₅, ve které se střídaly segmenty s pravidelnou repeticí CTG a hexamerem (CCGCTG)_n (Obr. 32, 33).

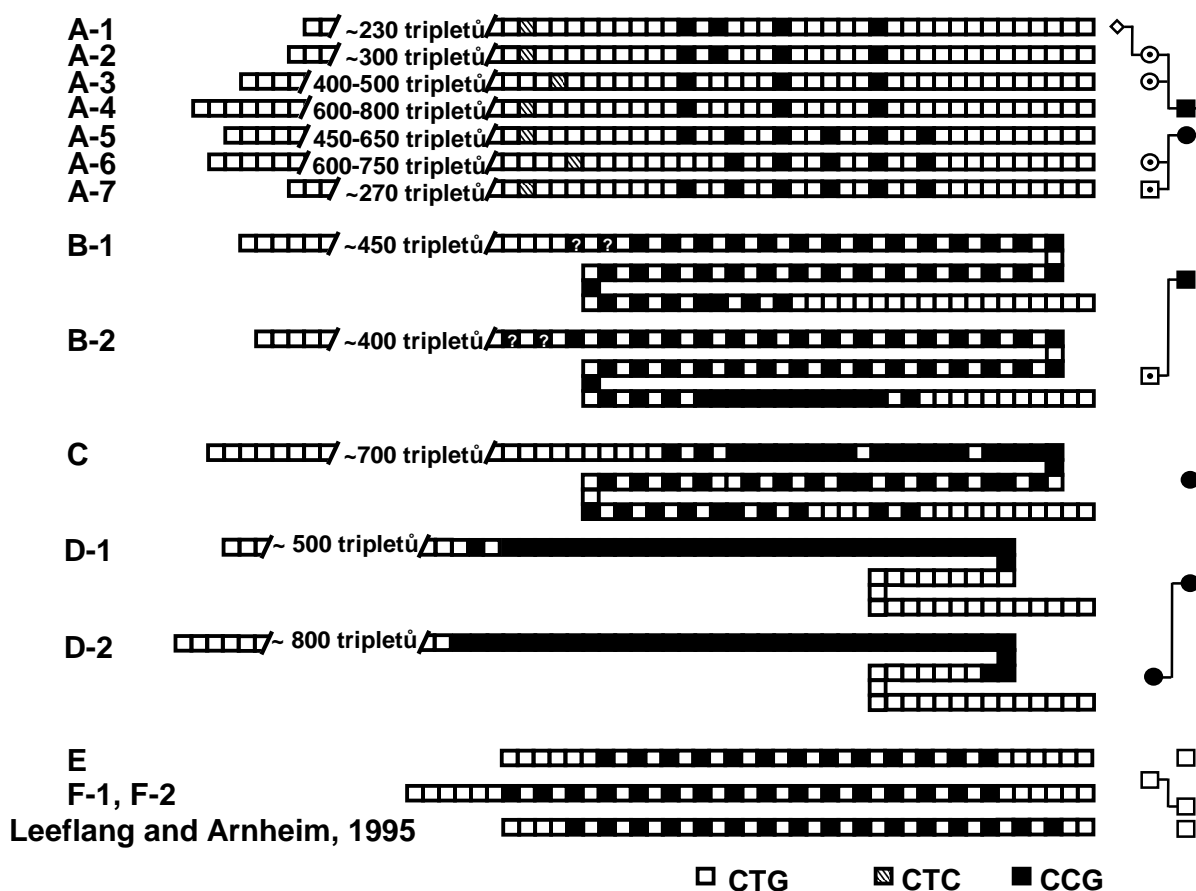


Obrázek 31: Fragmentační analýza TP-PCR produktu amplifikovaného s použitím primeru vázajícího se distálně od repetice u pacienta E (Somy4R/P3R/P4CTG). V místech, kde se nemohl primer obsahující pravidelnou repetici CTG navázat, chybí signály produktů (modré šipky).

Molekulárně genetická analýza pacienta F-1: Analýza prokázala přítomnost alel s 14 a 43 tripletů. Tyto alely byly sekvenovány v rámci testování kontrolního souboru pacientů s DM1 s expanzí v genu *DMPK*. Sekvenace odhalila na delší alele sekvenci (CTG)₆(CCGCTG)₁₆(CTG)₅, kde se opět střídaly segmenty s pravidelnou repeticí CTG a hexamerem (CCGCTG)_n podobně jako u pacienta D (Obr. 32, 33).



Obrázek 32: Části sekvence TP-PCR produktů několika pacientů nesoucích přerušeni v repetici CTG v genu DMPK. DNA čtyř pacientů z rodiny A byla pro získání čisté sekvence amplifikována pomocí primeru P4CTC, který se specificky vázal k přerušeni CTC. DNA zbylých pacientů byla amplifikována použitím primeru P4CC specifického pro nejvzdálenější (na 5' straně) přerušeni tripletem CCG. U pacientů B-1 a C je ukázána pouze střední část a 5' oblast nesoucí přerušeni. Sekvence některých vzorků není jednoznačná, což je zřejmě způsobeno technickými artefakty při amplifikaci a sekvenování vysoce repetitivní sekvence nebo somatickým mozaicismem u pacientů.

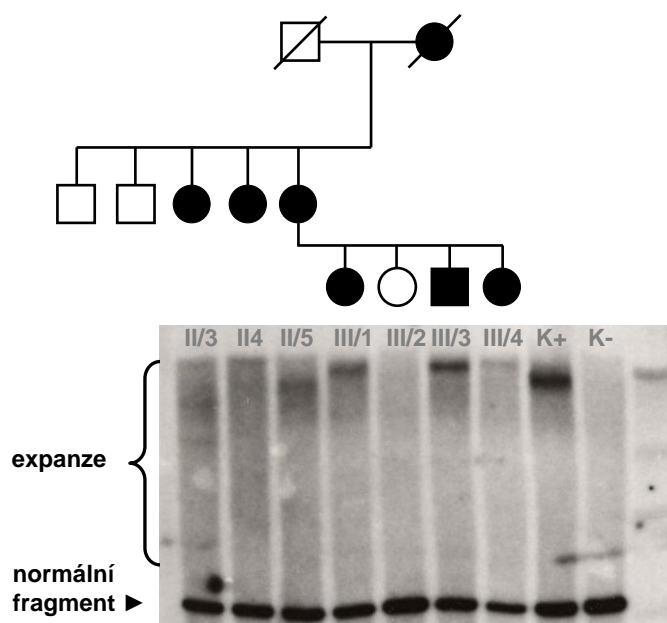


Obrázek 33: Schematické znázornění struktury repetice v genu DMPK u jedinců s přerušeními, kteří byli identifikováni v rámci naší studie, a u jediného dříve publikovaného případu (Leeflang a Arnheim 1995). Každý čtverec představuje jeden triplet, přičemž přerušení trinukleotidy CCG jsou znázorněna černými a přerušení CTC šrafovanými čtverci. Počty repetic uváděné u expandovaných alel vyjadřují celkovou délku expanze, ne pouze délku, kterou nebylo možno ve schématu znázornit. Pro usnadnění sledování intergeneračních změn jsou po stranách přidány zjednodušené rodokmeny. Otazníky jsou vloženy v místech, kde nebylo možné jednoznačně rozhodnout mezi triplety CTG a CCG, což je zřejmě způsobeno technickými artefakty při amplifikaci a sekvenování vysoce repetitivní sekvence nebo somatickým mozaicismem u pacientů. Finalizaci těchto schémat předcházela sekvenace TP-PCR produktů amplifikovaných s primery specifickými pro různé typy přerušení (P4CTC, P4CCG, P4hex1) při normálních i long-range podmínkách, aby bylo možno zachytit nejvzdálenější (na 5' straně) přerušení, a výsledky byly vzájemně korigovány a porovnány s fragmentační analýzou TP-PCR produktů.

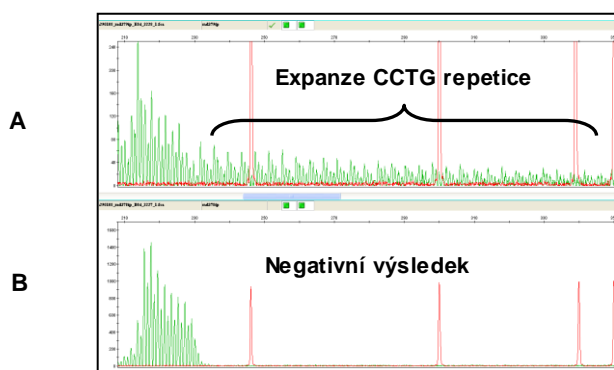
4.3. Myotonická dystrofie typ 2

4.3.1. Optimalizace a zavedení nových metod

Pro testování normálních alel genu *ZNF9* byla zavedena metoda krátké PCR pomocí primerů navržených tak, aby se vážaly k sekvencím sousedícím s repeticí. PCR produkty byly separovány a analyzovány na přístroji Gel-Scan 2000. Pro analýzu dlouhých expanzí byla zavedena Southernova metoda (Obr. 35). Ta umožnila detekci expanze, ale byla zdlouhavá a nemusela zachytit všechny pacienty s DM2 z důvodu častého extrémního somatického mozaicismu v délce expandovaných alel. Pro rychlé vyhledávání expanzí byla proto zavedena také metoda repeat-primed PCR (RP-PCR), která je obdobou TP-PCR (Bachinski et al. 2003). Produkty RP-PCR byly separovány v kapilární elektroforéze (Obr. 36).



Obrázek 35: Příklad analýzy genu *ZNF9* Southernovou metodou (štěpení *EcoRI*, PCR sonda). Pacienti s pozitivním nálezem expanze mají v tomto případě už i projevy nemoci. Pacienti ve III. generaci mají delší expanzi, nástup jejich nemoci byl mírně časnější. U pacientů II/3 a II/4 je vidět vysokou míru somatické instability - expanze u nich vytváří smear, který je obtížně detekovatelný a hodnotitelný.



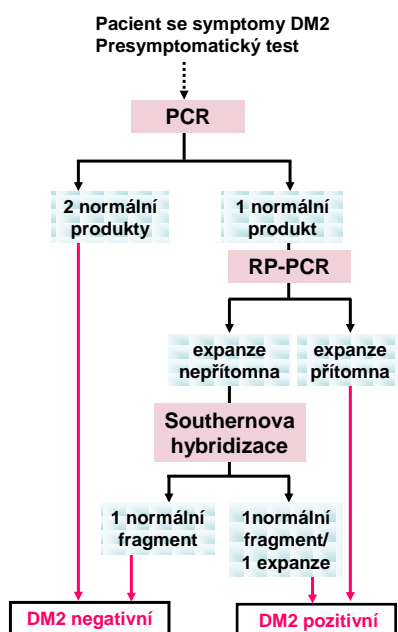
Obrázek 36: Příklad analýzy RP-PCR produktů genu *ZNF9* u dvou vzorků A a B v kapilární elektroforéze. Vzorek A obsahuje expandovanou alelu, ve vzorku B se žádná expanze neamplifikovala. Červené píky reprezentují délkový marker GeneScan-500 ROX Size Standard (Applied Biosystems).

4.3.2. Výsledky molekulárně genetického vyšetření souboru

V našem souboru pacientů a jejich příbuzných indikovaných na vyšetření myotonické dystrofie bylo identifikováno 70 pacientů s expanzí v genu *ZNF9*. Tito pozitivně testovaní pacienti patřili do 42 rodin. Věk pacientů při odhalení nemoci, zachycených jako prvních v rodinách, se pohyboval od 23 do 76 let, průměrný věk byl 52 let. Z celkových počtů rodin s molekulárně geneticky prokázanou DM1 a DM2 tedy můžeme odvodit, že DM2 se v regionu Čech vyskytuje v poměrně vysoké frekvenci, která dosahuje téměř poloviny výskytu DM1. V souboru pacientů s DM2 jsme identifikovali dvě nepříbuzné rodiny se třemi pacienty s expanzemi na obou alelách genu *ZNF9* (Kazuistika 8).

4.3.3. Doporučený algoritmus vyšetření

V naší laboratoři používáme na základě našich zkušeností a s přihlédnutím k doporučením (Botta et al. 2006; Udd et al. 2006) podobně jako u DM1 dvoukrokovou PCR (Obr. 37): v prvním kroku se amplifikují krátké alely a do dalšího testu jsou vybráni jen pacienti s jedním normálním produktem. Ve druhém kroku se pak pomocí RP-PCR amplifikují expandované alely. V případě, že RP-PCR expanzi neamplifikuje, se výsledek ověřuje Southernovou hybridizací.



Obrázek 37: Používaný algoritmus vyšetření expanze v genu ZNF9. Podrobnosti jsou uvedeny v textu.

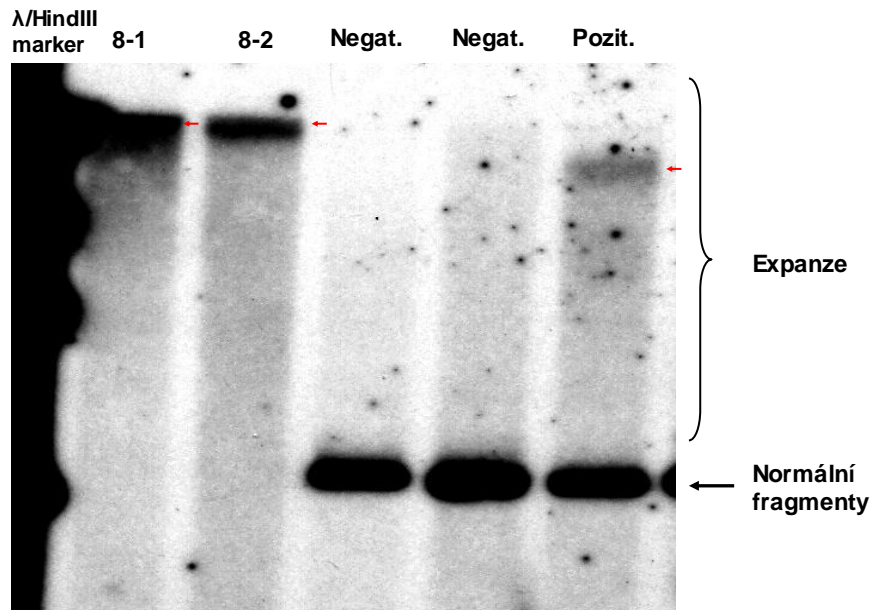
4.3.4. Kazuistiky DM2

Kazuistika 8: Tři pacienti s DM2 s expanzemi na obou chromozomech

Klinická charakteristika pacientky 8-1 a její sestry 8-2: První potíže, které se manifestovaly jako slabost šjívového svalstva, se u pacientky 8-1 objevily ve věku 29 let, po porodu jejího dítěte. Od té doby potíže postupně progredovaly svalovou slabostí, bolestmi v stehnech. Ve věku 54 let již pacientka není schopna chodit do schodů, má též slabost svalů břišní stěny a stisk jejích rukou je slabý s obtížnou dekontrakcí. Svalové postižení má též její matka a sestra. Jehlová EMG ukázala četné myotonické výboje s lehkou senzorigickou neuropatií. U pacientky 8-2 se objevily potíže s dolními končetinami ve věku 48 let, od té doby slabost dolních končetin progreduje. Od 50 let již nechodí do schodů, při chůzi se objevují křeče. Objevila se též slabost rukou, stisk rukou je velmi slabý s výraznou poruchou dekontrakce, zřejmá je hypotrofie svalů akra horních končenin i předloktí. EMG ukázala myotonické výboje a lehkou senzorigickou neuropatii. Laboratorní vyšetření svalových a jaterních enzymů prokázalo myogenní lezi a hepatopatii. Pacientka má 5 dětí.

Klinická charakteristika pacienta 8-3: U pacienta bylo od mládí pozorováno tuhnutí ve svalech horních a dolních končetin, ve věku 38 let byl zjištěn diabetes II. typu a ve věku 42 let byla provedena operace katarakty. Byly též zaznamenány kardiologické problémy a zvýšená hladina kreatin kinázy. Při vyšetření ve věku 46 let byla zjištěna slabost a bolest v dolních končetinách a hypotrofie stehien a hýždí, ale nebyla zjištěna porucha dekontrakce rukou. Břišní stěna byla ochablá. Jehlová EMG prokázala myotonii s myopatií. Svalovým onemocněním trpěla též matka pacienta.

Molekulárně genetická analýza pacientů 8-1, 8-2 a 8-3: PCR neprokázala přítomnost normální alely. Southernova metoda provedená u obou sester 8-1 a 8-2 prokázala expanzi bez přítomnosti normálního fragmentu (Obr. 38). U pacienta 8-3 byla expanze prokázána metodou RP-PCR, opět bez přítomnosti normální alely. Expanze se tedy u všech tří pacientů nejspíše nacházejí na obou chromozomech. Tento závěr podporují nálezy expanzí u všech potomků pacientů: u všech pěti asymptomatických potomků pacientky 8-2 a u obou dvou asymptomatických dětí pacienta 8-3 byla prokázána jedna normální a jedna expandovaná alela.



Obrázek 38: Vyšetření genu ZNF9 u pacientek 8-1 a 8-2 a u dalších pacientů Southernovou metodou (štěpení HindIII, PCR sonda). Červené šipky ukazují expanze v genu ZNF9. U pacientek 8-1 a 8-2 chybí normální fragmenty a expanze mají výrazný signál.

5. DISKUSE

Hodnocení záchytu expanzí v genu *FMR1* v souboru vyšetřovaném na FXS

Náš soubor 1880 osob (1221 mužů a 659 žen), ve kterém bylo v období mezi lety 2001-2009 provedeno testování expanze v genu *FMR1*, zahrnoval především pacienty s mentální retardací, autismem, ADHD, nebo vývojovým opožděním, dále pak pacienty s psychomotorickou retardací různého stupně, u kterých často šlo spíše o vyloučení diagnózy FXS, ale také příbuzné pacientů s FXS, kde bylo naopak možné předpokládat vyšší záchyt expanzí. Plná mutace byla nalezena u 4,5% pacientů (84/1880), z toho bylo 57 mužů a 27 žen. Tito pacienti pocházeli z 57 nepříbuzných rodin. Po korekci záchytu plných mutací pouze na počet rodin (57 rodin) a po odečtení dalších vyšetřených příbuzných z těchto rodin (85 jedinců) je záchyt FXS v souboru 3,2% (57/1795). V souboru byli také jedinci v prekoncepční péči - asymptomatictí příbuzní pacientů s MR bez známé příčiny a též pacientky s POF. Mnohá vyšetření byla požadována bez dostatečného klinického popisu pacienta a uvedení rodinné anamnézy či bližších údajů ke zdůvodnění požadavku na vyšetření. Takovouto velmi volně definovanou skupinu je tedy velmi problematické srovnávat s jinými údaji o záchytu, které se objevují v literatuře. Existují však i studie, kde výběr jedinců s MR k testování FXS nebyl příliš striktní, podobně jako tomu bylo u nás. De Vries uvádí záchyt 11 jedinců s FXS (0,7%) v souboru 1581 osob s mentálním opožděním, které byly vybrány podle nepřiliš striktně stanovených kritérií z institucí poskytujících domácí péči a ze zvláštních škol (de Vries et al. 1999). V jiných studiích se záchyt FXS u mužů s MR pohybuje od 3 do 6% (Curry et al. 1997; Shevell et al. 2003). Přísnější selekcí zejména mužských pacientů s mentálním defektem s použitím jednoduchého bodového hodnotícího systému je možné zvýšit úspěšnost záchytu FXS až 8-násobně (de Vries et al. 1999).

V 57 rodinách s expanzemi v genu *FMR1* byl identifikován pouze jeden pacient s premutací a jasným onemocněním FXTAS a jedna další pacientka s premutací měla neurologické obtíže. Nízký záchyt FXTAS může být kromě neúplné penetrance (Jacquemont et al. 2004) vysvětlen i nedůslednou rodinnou anamnézou v generaci prarodičů, kde byli často zjišťováni pouze nejbližší příbuzní v riziku. Dle nejnovějších údajů se v rodinách s FXS objevuje FXTAS u 16,5% žen s premutací a 45,5% mužů s premutací starších 50 let (Rodriguez-Reventa et al. 2009).

Hodnocení záchytu premutací v genu *FMR1* v souboru pacientů s ataxií

V souboru 256 pacientů starších 45 let s ataxiemi nastupujícími v dospělém věku původně testovaných na SCA a FRDA byla premutace *FMR1* zachycena u jednoho 76-letého pacienta s klasickými projevy FXTAS (délka premutace 86 CGG) a u jedné pacientky se současným výskytem FRDA (délka premutace 63 CGG) (Zumrová et al. 2005; Zumrová et al. 2007). FXTAS má nízkou penetranci a objevuje se typicky u mužů starších 50 let (Jacquemont et al. 2004) s premutací delší než 70 CGG (Hagerman et al. 2001; Jacquemont et al. 2006). Frekvence alel s 61-200 CGG se u mužů v kavkazské populaci odhaduje na 1:1000, u žen na 1:271-1:468 (Crawford et al. 2001). Protože ale jen část premutací vede k onemocnění, odhaduje se kumulativní riziko vzniku FXTAS v obecné populaci na 1:3000 až 1:8000 (Jacquemont et al. 2006). Frekvence FXTAS v souborech pacientů s ataxiemi s nástupem po 50. roce života se pohybuje od 2 do 4% (Brussino et al. 2005; Jacquemont et al. 2006). Nález jediného typického pacienta s FXTAS v našem souboru 256 pacientů s adultním nástupem ataxie se zdá být nízký, ale je třeba vzít v úvahu, že kritéria výběru (věk nad 45 let, nejen muži, ale i ženy) byla stanovena v době, kdy klinická a epidemiologická data o FXTAS téměř chyběla. Zúžením kritérií výběru pacientů na nástup ataxie ve věku 50 let a později bychom pravděpodobně dospěli k vyššímu procentu záchytu. Takové zúžení však nebylo možné u celého souboru provést, protože tito pacienti často vůbec neměli uveden věk nástupu onemocnění.

O to překvapivější byl nález premutace s 63 opakováními CGG u pacientky s prvními příznaky ataxie na konci 5. dekády života, s homozygotní expanzí v genu *FXN* pro FRDA (Kazuistika 4, (Zumrová et al. 2005)). Jedná se zřejmě o náhodný nález, který může být dán relativně vysokou frekvencí premutací *FMR1* u žen 1:271-1:468 (Crawford et al. 2001). Frekvence výskytu FRDA je přitom odhadovaná na 1-2 na 100 000 (Campuzano et al. 1996). Z hlediska obrazu FXTAS je význam komorbidity homozygotní expanze *FXN* a premutace *FMR1* diskutabilní. Pacientka má jasně potvrzenou diagnózu FRDA s klinickými projevy, které nevybočují z rámce této klinické jednotky. Nové skutečnosti může přinést longitudinální sledování této pacientky, protože nelze vyloučit zhoršení progresu FRDA vlivem premutace v genu *FMR1*.

Fenotyp FXS a FXTAS u pozitivně testovaných pacientů

Pacienti s FXS a expanzí repetice CGG, kteří byli zachyceni v našem souboru, měli mentální retardaci různého stupně, popsanou většinou jako středně těžká až těžká MR, přičemž bližší ohodnocení IQ u nich nebylo provedeno. Dle literárních údajů je hloubka mentálního defektu ovlivněná mírou metylace genu *FMR1*, přičemž méně postižení muži mají často nekompletní metylaci (Garber et al. 2008). V našem souboru bylo 22 pacientů diagnostikovaných metodou Southernova blotu (bez metylační analýzy) a 6 z nich bylo mozaikou premutace a plné mutace. Premutace by neměly být metylovány, a proto bychom u těchto pacientů mohli očekávat mírnější postižení. Nám dostupné údaje o míře jejich mentálního defektu jsou však pro posouzení této souvislosti nedostatečné. U jednoho z nich byl však popsán spíše těžší fenotyp s psychomotorickou retardací a hypotonický syndrom. Pacient v 6 letech vůbec nemluvil a trpěl enurézou a enkoprézou. U dalších čtyř pacientů byla zaznamenána lehká MR, z toho dva pacienti měli též autistické rysy. Konečně jeden ze dvou bratrů s FXS měl mozaiku premutace a plné mutace a středně těžkou mentální retardaci, zatímco druhý bratr neměl příměs premutace a trpěl středně těžkou až těžkou MR a navíc ještě autismem. Na základě těchto údajů lze konstatovat, že míra postižení je velice variabilní, a že z našich dat lze jen velmi obtížně provést jasnou korelaci mezi genotypem a fenotypem u FXS.

U žen koreluje míra postižení intelektu nejvíce s mírou inaktivace chromozomu X nesoucího normální alelu genu *FMR1* (de Vries et al. 1996; Jacquemont et al. 2007). Analýza metylace Southernovou metodou byla provedena u čtyř žen s plnou mutací. U jedné nebyla zaznamenána MR, a tato žena měla asi 50% metylaci nemutované alely genu *FMR1*. Další tři měly mírnou MR, přičemž dvě z nich byly bez dalších symptomů a měly asi 50% metylaci nemutované alely. Třetí pacientka měla téměř kompletní metylaci normální alely způsobenou delecí na jednom chromozomu X (Kazuistika 2 a viz níže). Dívka manifestovala i autistické rysy, vývojové opoždění a poruchu řeči. Srovnávat míru mentálního defektu těchto pacientek je ale obtížné, protože nebyla exaktně stanovena hodnota jejich IQ a pacientky byly popsány různými indikujícími lékaři. Je možné, že i minimální aktivita normální alely genu *FMR1* dostačuje k tomu, aby nevznikl hluboký mentální defekt, přičemž míra postižení pacientek může být velmi individuální.

Naše práce popisuje také záchyt dvou mužských pacientů s premutacemi s délkou expanze 86 a 90 CGG s tremorem a deficitem kognitivních funkcí (Kazuistiky 2 a 3), které jsou plně konzistentní s popsanou symptomatologií FXTAS (Jacquemont et al. 2006). Nálezy u žen z našeho souboru nejsou z hlediska klinického obrazu FXTAS tak jednoznačné. U jedné 64-leté pacientky z rodiny s FXS a premutací o délce 92 CGG byly zaznamenány neurologické obtíže s poruchou řeči, třesem hlavy, suspektní cervikální dystonií a dále hypertenzí a tyreopatií. U žen s premutací byly kromě FXTAS (u 16,5% pacientek) nedávno popsány též další problémy, jako jsou onemocnění štítné žlázy, hypertenze, křeče, periferní neuropatie a fibromyalgie (Rodriguez-Revenga et al. 2009). Je ale otázkou, nakolik jsou potíže této naší pacientky podmíněné její premutací. Podobně nejasný je i fenotypový příspěvek dvou nezávislých genetických defektů u pacientky se současným výskytem premutace v genu *FMR1* o délce 63 CGG a homozygotní expanzí genu *FXN* (Kazuistika 4, (Zumrová et al. 2005)).

Hodnocení mezigeneračních přenosů alel genu *FMR1*

Intergenerační přenosy alel genu *FMR1* v našem souboru byly ve shodě s publikovanými údaji. Premutace transmitujících mužů zůstaly premutacemi i v další generaci, přičemž nejvíce (o 30 CGG) se prodloužila alela s délkou 90 CGG. Při maternálním přenosu zůstaly premutace v kategorii premutací ve 25% přenosů (12/48), ve 75% přenosů (36/48) expandovaly v následující generaci do plné mutace. Průměrná délka 12 premutací, které do plné mutace neexpandovaly, byla 73,6 repetit CGG. Průměrná délka 36 expandujících premutací byla 97 repetit. Ve shodě s literaturou tedy pozorujeme určitou korelaci mezi délkou maternálně přenášené premutace a rizikem její expanze (Nolin et al. 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=fragilex>). Alely delší než 90 CGG při maternálním přenosu expandují do plné mutace ve 100% případů (Strom et al. 2007) a ani mezi našimi neexpandujícími alelami není žádná delší než 90 CGG. Reprezentace intergeneračních přenosů našich pacientek s premutací je však zkreslena výběrem, protože všechny přenašečky premutací byly odhaleny prostřednictvím svých potomků s FXS. Data z velkých komerčních laboratoří svědčí pro relativně nízké (5%) riziko

expanze do plné mutace u premutací kratších než 75 CGG, a vyšší (30%) riziko u alel s 75-100 CGG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=fragilex>).

Naopak k významnému zkrácení premutace došlo při dvou maternálních přenosech alely o délce 84 CGG (na 64 a 74 CGG). Toto zkrácení se jeví v souboru přenašeček premutací z rodin s FXS jako neobvyklé. Je však možné, že v populaci je takový jev běžnější a že k expanzi do plné mutace a projevům FXS u potomstva dochází jen u části přenašeček. Také při 9 přenosech plných mutací od 7 žen na jejich potomstvo došlo v jednom případě v části buněk ke zkrácení plné mutace na alelu normální délky (Kazuistika 1). Nález mozaiky normální alely a plné mutace u jedné dívky s FXS z celkového počtu 84 pacientů je v souladu s udávanou 1% frekvencí výskytu tohoto typu mozaiky u FXS (http://www.emqn.org/emqn/BestPractice/mainColumnParagraphs/05/document/EMQN%20guidelines%20FRAX_2006.pdf). Mozaiky normálních alel a plných mutací vznikají delecí uvnitř expandované repetice, což byl i případ naší pacientky, nebo postihují i okolní sekvence v rozsahu od několika bází až po několik megabází včetně okolních genů (Coffee et al. 2008). Byly popsány i kontrakce premutací na normální délku a mozaiky premutace a plné mutace (shrnutí v Coffee et al. 2008).

Optimální diagnostický protokol testování FXS

Diagnostický protokol FXS používaný v naší laboratoři je v zásadě dvoukrokový, spočívající v rychlém vyloučení negativních případů metodou PCR a v průkazu expanze jinou metodou (Southernův blot nebo long-range PCR) včetně správného zařazení expanze do kategorie premutace a plné mutace. Pro stanovení rizika prodloužení expanze v další generaci má určení délky premutace u přenašeček jen orientační hodnotu. Nejvýznamnější je správné rozpoznání základních kategorií (normální alela, premutace, plná mutace). Pro posouzení nálezu premutace u FXTAS je důležité též stanovení její délky, protože za kauzální se považují jen premutace delší než 70 CGG (Jacquemont et al. 2006).

FXS u pacientky s delecí na chromozomu X a nevyváženou X-inaktivací

Identifikace plné mutace v genu *FMR1* potvrdila suspektní diagnózu FXS u pacientky z rodiny s výskytem FXTAS a POF v mateřské linii. Pozorovaná metylace obou alel byla objasněna nálezem intersticiální delece na Xp a přednostní inaktivace chromozomu X pocházejícího od otce. Přestavby jsou častou příčinou nevyvážené X-inaktivace (Wolff et al. 2000). Kompletní umlčení genu *FMR1* tedy kopírovalo situaci u mužů s plnou mutací. Jednu alelu inaktivovala expanze a jí podmíněná metylace, normální alela byla umlčena kompletní X-inaktivací. Projevy FXS u žen jsou obecně mírnější. Kolem 25% z nich má mentální retardaci (IQ<70) (Bennetto et al. 2001), ale většina má IQ na spodní hranici normálu (75-90) a behaviorální problémy (Jacquemont et al. 2007). Jedna žena s plnou mutací a umlčením normální alely nevyváženou X-inaktivací nejasné příčiny měla v 16 letech příznaky podobné postiženým chlapcům jako dlouhý úzký obličej, velké uši, hyperextenzibilitu kloubů, plachost a těžkou mentální retardaci (Heine-Suner et al. 2003). X-inaktivace korelovala s mentální retardací (ale ne s jinými příznaky FXS) i u jednovaječných dvojčat - dívek s plnou mutací (Willemsen et al. 2000). Naše pacientka měla mírnou mentální retardaci, atypický autismus, hyperkinetický syndrom a neměla fenotypové rysy FXS. Typická facies se u FXS ale obvykle rozvíjí až na začátku puberty.

Delece Xp jsou poměrně časté. Většinou jsou terminální (pseudoautozomální oblast) a jen malá část je intersticiální (James et al. 1998; Ogata et al. 2001; Lachlan et al. 2006). Delece podobné delecí naší pacientky byly popsány v jedné rodině a některé znaky jako strabismus nebo široké ruce má i naše pacientka (Chocholska et al. 2006). Další ženy se syndromem mikroftalmie s lineárními kožními defekty (MLS) nesly 3 Mb delecí obsaženou v delecí naší pacientky (Morleo et al. 2005). Ta obsahuje i několik genů podmiňujících X-vázané dominantní choroby nebo geny unikající X-inaktivaci (Carrel a Willard 2005; Carrel et al. 2006; Wang et al. 2006). Pacientka však nevykazuje žádné příznaky těchto poruch, podobně jako další ženy s velkými delecemi Xp (James et al. 1998; Ogata et al. 2001; Lachlan et al. 2006).

Dívka mohla mít díky koincidenci dvou těžkých genetických defektů komplexní kompozitní fenotyp, ale nevyvážená X-inaktivace vedla ke spíše mírnému klinickému obrazu. Autismem trpí 18-26% mužů a 6-10% žen s FXS (Hatton et al. 2006; Clifford et al. 2007). Příznaky u pacientky jsou tedy asi důsledkem defektu genu *FMR1*.

Současný výskyt FXS a karyotypu 47,XYY

V souboru 57 mužů s plnou mutací byli nalezeni dva pacienti s karyotypem 47,XYY. Zmínky o podobné asociaci jsou v literatuře vzácné. Několik prací popisuje asociaci FXS a mozaikového karyotypu 46,XY/47,XYY (Bodurtha et al. 1993; Milunsky et al. 1993) nebo čistého karyotypu 47,XYY (Stalker et al. 2003; Garcia-Nonell et al. 2008), přičemž poslední z citovaných prací referuje o nálezů čistého karyotypu 47,XYY ve skupině 90 mužů s FXS. Frekvence mužů s karyotypem 47,XYY je 1:1000 (Thompson a Thompson 1986) a frekvence FXS je 1:4000-1:9000 mužů (Crawford et al. 2001). Koincidence těchto nálezů by tedy měla vznikat s frekvencí 1:4000000 - 1:9000000 a v populaci regionu Čech bychom pravděpodobně mohli najít jeden případ. Otázkou zůstává, zda je náš nález dvou pacientů s asociací FXS a karyotypu 47,XYY důsledkem náhodných spojení spermií se dvěma chromozomy Y a vajíčka s expanzí v genu *FMR1*, nebo zda může maternálně přenášená mutace genu *FMR1* neznámým mechanismem predisponovat k nondisjunkci chromozomu Y v zygotě nebo k nondisjunkci obecně (Nielsen 1986). Některé práce takové zvýšené riziko nondisjunkce vedoucí k aneuploidii u potomstva přenašeček expanze genu *FMR1* zmiňují (Watson et al. 1988). O nálezů syndromu 47,XXX u dcery přenašečky premutace v genu *FMR1* informuje i jedna starší práce z našeho pracoviště (Seemanova et al. 1985). FMRP je exprimován zejména v neuronech, kde působí jako represor translace jiných proteinů (Laggerbauer et al. 2001). FMRP je asociován s více než 400 mRNA *in vivo* (Brown et al. 2001; Zalfa et al. 2003). Účastní se též organizace cytoskeletu během vývoje neuronu (Lu et al. 2004). Není známo, zda a jak FMRP ovlivňuje buněčné děje na úrovni gametogeneze nebo ve stadiu zygoty. Stejně tak chybí údaje o molekulárních mechanismech predispozice k nondisjunkci, které by mohly svědčit pro spojitost mezi mutací v genu *FMR1* a predispozicí k nondisjunkcím.

Srovnání frekvencí DM1 a DM2

V souboru 675 jedinců testovaných na přítomnost expanze v genech *DMPK* a *ZNF9* bylo nalezeno 171 pacientů z 87 nepříbuzných rodin s expanzí v genu *DMPK* a 70 pacientů ze 42 rodin s expanzí v genu *ZNF9*. U zhruba 35% testovaných pacientů tedy byla potvrzena diagnóza DM1 nebo DM2 či stanovena prognóza v rámci diferenciální diagnostiky nebo presymptomatického testu. Zbývajících 65% osob jsou buď pacienti, u kterých byla diagnóza myotonické dystrofie vyloučena a u kterých by mělo být v rámci diferenciální diagnostiky pomýšleno na jiné neuromuskulární onemocnění (Botta et al. 2006), nebo to jsou negativně testovaní asymptomatictí příbuzní z rodin s rizikem DM1 či DM2.

Z počtů potvrzených rodin s DM1 (87 rodin) a DM2 (42 rodin) lze odvodit, že DM2 se v regionu Čech vyskytuje v poměrně vysoké frekvenci, která dosahuje téměř poloviny frekvence DM1. Mutace v genu *DMPK* jsou rozšířeny po celém světě, zatímco expanze v genu *ZNF9* se s největší frekvencí vyskytují v Evropě. Přehled výskytu DM2 v západní a severní Evropě naznačuje, že frekvence DM2 zde může dosahovat frekvence DM1 (Udd et al. 2006). Je možné, že povědomí o DM2 u lékařů by mohlo zvýšit její záchyt i u nás. Někteří postižení totiž mají pouze mírné příznaky, které se manifestují jen jako svalová bolest a slabost s nástupem až v pozdním věku.

Délka expanzí u pacientů DM1 a korelace genotyp-fenotyp

U pacientů s DM1 koreluje délka expanze v lymfocytech periferní krve s věkem nástupu a závažností onemocnění (Harley et al. 1992; Novelli et al. 1995; Marchini et al. 2000). Toto pravidlo ovšem nemusí platit striktně a předpověď závažnosti onemocnění z délky expanze není jednoznačná (Giordano et al. 1995; Novelli et al. 1995). Situaci dále komplikuje somatický mozaicismus a věk pacientů v čase odběru vzorku, protože délka expanze s věkem obecně narůstá (Wong et al. 1995). Jednotlivé fenotypové kategorie tedy s délkou expanze korelují jen částečně a značně se prolínají (Salehi et al. 2007). Nejlépe s délkou expanze korelují věk nástupu onemocnění, muskulární handicap, hodnota IQ a ztráta krátkodobé paměti (Marchini et al. 2000). Náš soubor pacientů s DM1 obsahoval všechny klinické

odstíny onemocnění od jedinců s minimální formou s kataraktou, přes adultní formy s různou závažností postižení svalů a dalších orgánů, až po juvenilní a těžké kongenitální formy s fatálním koncem. U 44 pacientů z našeho souboru byla délka expanze stanovena Southernovou metodou (Obr. 23). Sedm pacientů s lehkou formou onemocnění mělo expanzi do délky 150 CTG. Čtyři pacienti s těžkou kongenitální formou měli dlouhé expanze větší než 1000 CTG. Ostatní pacienti měli různě dlouhé expanze mezi 150 až 2000 CTG. U 6 ze 7 pacientů s expanzí nad 1000 CTG, u kterých se nám podařilo získat podrobnou osobní anamnézu, byl nástup onemocnění zaznamenán v dětství nebo na počátku 2. dekády života (juvenilní forma). U 5 pacientů byl pozorován mírný mentální deficit, což také koreluje s nálezem dlouhé expanze u těchto jedinců. Juvenilní forma DM1 bývá často přehlížena, i když je kromě závažného svalového postižení spojena také s mentálním defektem a časnými kondukčními poruchami srdce. Nástup této formy nepodléhá parentálnímu efektu, jak tomu je v případě kongenitálních forem (Machuca-Tzili et al. 2005). Zatímco u DM1 korelace mezi délkou expanze a tíží projevů existuje, u DM2 nebyla taková korelace pozorována.

Frekvence normálních alel v obecné populaci a u pacientů s DM1

Vedlejším produktem molekulárně genetické analýzy DM1, jejímž primárním cílem bylo zjištění přítomnosti expandovaných alel a posouzení jejich délky a sekvenční čistoty repetice, byla také informace o délce normálních alel genu *DMPK*. Tento parametr byl sledován jak u kontrolního souboru nepostižených jedinců, tak v souboru pacientů s DM1, u kterých se normální alela nacházela v heterozygotním stavu spolu s expandovanou alelou. Aby byla u postižených sourozeneckých párů z jedné rodiny zohledněna skutečnost, že délky jejich alel nejsou nezávislé, byla provedena korekce tohoto souboru vyloučením jednoho (staršího) sourozence. Prvotní porovnání spekter délek alel v obou souborech naznačovalo, že zatímco frekvence normálních alel je u kontrolního souboru trimodální s vrcholy u alel o délce 5, 12 a 21 CTG, u pacientů s DM1 je frekvence alely s 5 CTG snižena oproti kontrolnímu souboru o 2-5%, naopak nejfrekventnější alelou ve skupině alel střední délky je zde alela s 11 CTG (oproti normální populaci, kde to je alela s 12 CTG,

rozdíl až o 10%) a dlouhé normální alely se zdají být v souboru pacientů reprezentovány méně. Tento trend byl zajímavý i z pohledu literárních údajů. Ačkoliv práce srovnávající frekvence normálních alel u normálních a postižených jedinců téměř chybějí, studie brněnských kolegů (Falk et al. 2006) popisuje podobnou diskepanci ve frekvenci normálních alel u pacientů s DM1 a u populačního vzorku. Autoři ale zároveň upozorňují na to, že počet jimi analyzovaných pacientů byl malý, a i naše analýza neprokázala statisticky významný rozdíl mezi soubory. Pozorování by bylo třeba ještě ověřit na větších souborech. Pokud by takový rozdíl skutečně existoval, nebyl by příliš jasný ani biologický mechanismus, který by jej mohl podmiňovat. Jako možné hypotézy se nabízejí možnost, že určité kombinace délek alel vedou k lehčímu nebo těžšímu fenotypu, a tím i k méně častému nebo častějšímu záchytu pacientů, nebo že proti určitým kombinacím existuje selekce, buď na úrovni fertilizace, nebo během časného prenatalního vývoje.

Optimální diagnostický protokol testování DM1 a DM2

Náš algoritmus vyšetření je postaven na metodách PCR, TP-PCR a RP-PCR. Sporné případy se u DM1 ověřují Southernovou metodou. V diagnostice DM2 se tato metoda používá, pokud RP-PCR neamplifikuje expanzi v genu *ZNF9* u jedinců s detekovanou jednou normální alelou. Vysoká míra somatického mozaicismu u DM2 ale může vést k falešné negativitě i u Southernovy metody až u 2-8% vzorků (Jakubiczka et al. 2004), protože difuzní smeary mohou uniknout pozornosti a je těžké je odlišit od pozadí. Kombinace metod PCR, RP-PCR a Southernovy hybridizace však minimalizuje nebezpečí falešné negativity i u DM2.

Je otázkou, nakolik je k predikci fenotypu DM1 důležitá informace o přesné délce expanze, vzhledem k neexistenci jasné korelace mezi genotypem a fenotypem. Predikce fenotypu by měla největší význam v prenatalní diagnostice. Protože však navíc neexistuje ani jasná korelace mezi délkou expanze u plodu a jejím budoucím vývojem, je taková predikce nejistá a není doporučována (Botta et al. 2006).

Sekvenční přerušení repetice CTG u DM1 jinými trinukleotidy

Naším nejdůležitějším nálezem bylo odhalení sekvenčních přerušení repetice CTG na expandovaných nebo intermediárních alelách genu *DMPK*, která jsme podrobně popsali u pacientů s DM1 jako první na světě (Musova et al. 2009). Z celkového počtu 83 rodin s DM1, ve kterých byla analýza přítomnosti přerušení provedena, byla expandovaná alela genu *DMPK* přerušena tripletly CCG a CTC u 4 rodin (téměř 5%). V souboru byli také dva pacienti s intermediárními alelami přerušeny tripletly CCG. Naproti tomu žádná normální alela v souboru pacientů s DM1 ani u kontrolního souboru nenesla přerušení v repetici.

Přerušení v primární struktuře pravidelné repetice byla popsána u většiny genů spojených s expanzí repetic (Chung et al. 1993; Eichler et al. 1994; Choudhry et al. 2001). Do roku 2009 však existovala pouze jedna práce zmiňující nepravidelnosti v repetici v genu *DMPK*. Jednalo se o náhodný nález u dárce spermií s neznámým klinickým stavem, jehož alela s délkou 43 tripletů měla sekvenci (CTG)₄(CCGCTG)₁₆CTG (Leeflang a Arnheim 1995). V této studii byly pak prověřeny alely genu *DMPK* u dalších 382 dárců spermií, ale žádná další přerušení nebyla nalezena. V následné španělské studii 700 rodin s DM1 byly prověřeny všechny alely delší než 30 repetic, avšak žádná přerušení nebyla odhalena (Martorell et al. 2001) a tento fenomén byl považován za nepodstatnou výjimku až do publikace naší práce (Musova et al. 2009). Podobné nálezy variant v repetici genu *DMPK* byly též popsány na počátku roku 2010 (Brida et al. 2010). Proč nebyla tato přerušení tak dlouho odhalena, lze nejspíše vysvětlit metodami používanými pro testování DM1. Většina technik včetně PCR, long-range PCR, Southernovy metody i TP-PCR, pokud je prováděna pouze na jednom vlákně DNA, tato přerušení v repetici CTG nezachytí.

Přerušení tripletly AGG, CAT nebo CAA jsou popisována pouze u normálních alel genů *FMR1*, *ATXN1* a *ATXN2*, zatímco jejich expandované alely obsahují čistou sekvenci trinukleotidů CGG nebo CAG (Chung et al. 1993; Eichler et al. 1994; Choudhry et al. 2001). U genu *FXN* se přerušení nacházejí jen na dlouhých normálních alelách a premutacích (Montermini et al. 1997). V genu *ATXN10* byla nalezena jen na alelách delších než 16 repetic (Matsuura et al. 2006). U *SCA8* jsou přerušení repetice CTG jen na expandovaných alelách (Moseley et al. 2000).

Námi odhalený vzorec prerušení repetice CTG v genu *DMPK* se u různých pacientů lišil. Na intermediárních alelách pacientů E, F-1, F-2 byl vzorec prerušení pravidelný a obsahoval hexamer (CCGCTG)_n, podobně jako u jediného předchozího případu (Leeflang a Arnheim 1995). Expandované alely nesly buď pravidelný sled hexamerů (CCGCTG)_n přerušených jedním tripletem CCG nebo blokem 12 tripletů CCG (pacienti B-1 a B-2), nebo obsahovaly kontinuální blok 32 nebo 39 tripletů CCG (pacientky D-1 a D-2). Část pacientů měla ještě komplexnější vzorec prerušení (rodina A, pacientka C). Prerušení na expandovaných alelách byla vždy lokalizována na 3' konci repetice (Obr. 33). I když použité metody nedovolovaly prohledat celou expanzi, ale jen asi 150 tripletů z obou konců repetice, zdá se, že střední část a 5' konec repetice prerušení neobsahují. Podobnou strukturu variant i jejich lokalizaci popisuje i následná studie (Braida et al. 2010).

Prerušení na normálních alelách genů *FMR1*, *ATXN1* a *ATXN2* jsou považována za ukotvující a stabilizující repetici proti sklouzávání a expanzi (Chung et al. 1993; Eichler et al. 1994; Pearson et al. 1998; Choudhry et al. 2001). Podobně stabilizují prerušení repetici v genu *TBP* u SCA17 (Gao et al. 2008). Alela genu *DMPK* se strukturou (CTG)₄(CCGCTG)₁₆CTG (37 tripletů) byla stabilnější, než nepřerušovaná alela s 27 tripletů CTG (Leeflang a Arnheim 1995). V našich rodinách A, B a D, kde mohly být sledovány intergenerační přenosy, byla pozorována značná nestabilita v počtu a lokalizaci prerušení v rámci rodiny. Podobná situace byla popsána v rodině se SCA8, kde byly též detekovány u různých jedinců různé vzorce prerušení (Moseley et al. 2000). V rodině B byl pozoruhodný nárůst z jednoho tripletu CCG do bloku 12 tripletů CCG u syna pacienta s pravidelnou řadou hexamerů (CCGCTG)_n (Obr. 30). Takovou mutaci lze jen obtížně vysvětlit sklouzáváním DNA polymerázy při replikaci. V rodině D také došlo v následující generaci k nárůstu kontinuálního bloku CCG z počtu 32 na 39 (Obr. 33).

Intergenerační změny byly v těchto rodinách sledovány i na úrovni celkové délky expanzí. V rodině A došlo z celkového počtu 5 intergeneračních přenosů ke 4 kontrakcím expanze (Obr. 28). V rodině B byla též pozorována lehká kontrakce při přenosu expanze z pacienta B-1 na syna B-2. V rodině D naopak došlo k expanzi přerušované alely z 500 na 800 tripletů při přenosu expanze z matky na dceru. I když na délku expanze v genu *DMPK* má vliv i věk pacienta při náběru (Wong et al. 1995),

dvě velké studie nekorigované z hlediska věku ukázaly, že kontrakce se vyskytují v rodinách s DM1 s frekvencí 4,2-6,4% (Ashizawa et al. 1994; Salehi et al. 2007), a jsou tedy spíše vzácné. Při intergeneračním přenosu intermediární alely se 43 triplety v rodině F (paternální přenos z F-2 na F-1) nedošlo ke změně délky této alely, i když obvykle právě paternálně přenášené alely o délce 40-80 repetice v následující generaci expandují (Brunner et al. 1993). Tato pozorování nás nutí spekulovat o tom, zda sekvenční přerušení nečiní repetici CTG v genu *DMPK* stabilnější ve srovnání s nepřerušeny alelami podobné délky nebo zda dokonce nepredisponují expandované alely ke kontrakcím. Dle nejnovější práce je délka čistého 5' úseku repetice CTG genu *DMPK* u pacientů s přerušenou expanzí stabilnější oproti kontrolním pacientům s DM1 a nepřerušenou expanzí (Brida et al. 2010). I u DM1 se totiž zdá, že změny v délce se dějí v nepřerušené (neukotvené) části repetice, podobně jak tomu je u genů *FMR1* a *ATXN2* (Eichler et al. 1994; Choudhry et al. 2001).

U některých chorob způsobených expanzí jednoduché repetice se uvažuje o tom, že přítomnost přerušení v repetitivním traktu může ovlivnit i fenotyp. Přerušení AGG v repetici CGG v genu *FMR1* u intermediárních alel o délce 43-53 repetice mohou u jejich přenašeček zabránit předčasnému ovariálnímu selhání běžnému u přenašeček nepřerušených alel podobné délky (Bodega et al. 2006). Podobně je u SCA1 patogenicita intermediárních alel o délce 39 repetice závislá na přítomnosti přerušení trinukleotidem CAT (Zuhlke et al. 2002). Zajímavý je i efekt přerušení v genu *ATXN2*, kde mírně expandované alely s čistou sekvencí 35-39 tripletů CAG způsobují fenotyp SCA2, zatímco repetice se stejnou délkou přerušené triplety CAA mohou způsobovat parkinsonismus (Charles et al. 2007). Prvotní pozorování přerušení repetice v genu *FXN* svědčila pro mírnější formu a pozdější nástup FRDA, ovšem pozdější studie prokázala jen velmi mírný nebo žádný efekt na fenotyp pacientů (Stolle et al. 2008). Počet našich pacientů s přerušenou repeticí CTG v genu *DMPK* je zatím příliš malý (pacienti A-4, A-5, B-1, C, D-1, D-2) a fenotypové projevy těchto pacientů výrazně nevybočují z klasického obrazu adultních forem DM1. Někteří z nich však mají mírnější svalové projevy onemocnění bez muskulární dystrofie a s pozdějším nástupem onemocnění, než by odpovídalo délce expanze (Marchini et al. 2000). Vliv přerušené repetice na fenotyp pacientů s intermediárními alelami (E, F-1) je též nejasný. U obou pacientů však bylo iniciálně požadováno

vyšetření genu *DMPK*. Pacient E měl kongenitální formu myotonie, ale spíše distální, která je spojená s DM1, zatímco pacient F-1 neměl myotonii, ale měl další symptomy DM1 (ptózu a kontraktury šlach), které posléze vedly k suspektní diagnóze nespécifické distální artrogypózy. Aby bylo možné posoudit kauzální efekt přerušovaných intermediárních alel na fenotyp, bylo by i zde nutné analyzovat větší počet jedinců. Za povšimnutí stojí fakt, že přerušená intermediární alela byla nalezena též u jednoho asymptomatickeho jedince z našeho souboru (F-2). Braidová et al., 2010 popisují podobné nepatogenní alely s délkou 38 a 41 tripletů. Jakékoliv prognostické závěry založené na nosičství přerušovaných alel genu *DMPK* jsou tedy nyní, dokud nebudou nálezy podpořeny údaji z větších souborů pacientů, nejisté.

Jedním z klíčových patogenních mechanismů DM1 je toxický vliv RNA. Změny v sekvenci repetice mohou nepochybně ovlivnit vyšší struktury transkriptů RNA a jejich interakci s RNA-vázajícími proteiny. U premutací v genech *FMR1*, *ATXN1* a *ATXN2* vedou přerušování repetice ke změně ve vlásenkové struktuře RNA (Sobczak a Krzyzosiak 2004; Napierala et al. 2005; Sobczak a Krzyzosiak 2005; Bodega et al. 2006). Repetice v genu *DMPK* tvoří vlásenkovou strukturu RNA, jejíž délka a stabilita závisí na délce repetice (Napierala a Krzyzosiak 1997). Je tedy pravděpodobné, že sekvenční přerušování mohou ovlivnit formování této vlásenkové struktury podobně, jak je tomu u jiných genů. Přerušování v repetici *DMPK* mohou též ovlivnit fázování nukleozómů na tomto repetitivním traktu, a tím i hladinu transkripce a stabilitu repetice (Mulvihill et al. 2005), ale i vazbu miRNA (Hon a Zhang 2007). Přerušovaná repetice možná ovlivňuje fenotyp pacientů také stupněm somatického mozaicismu (Everett a Wood 2004), který by mohl být u nosičů přerušování nižší.

Identifikace přerušování v genu *DMPK* má v neposlední řadě též diagnostický význam. Obecně rozšířená diagnostická metoda na vyhledávání expanzních mutací, TP-PCR, využívá k amplifikaci expanze primery, které se specificky vážají jen do čisté repetice CTG. Přítomnost přerušování může proto způsobit chybnou interpretaci výsledku TP-PCR a chybnou diagnózu. Tuto situaci dobře ilustruje příklad pacientů z rodin B, C a D, u kterých byla jako první zaznamenána právě diskrepance mezi výsledky Southernovy hybridizace a TP-PCR.

Pacienti s homozygotní mutací v genech *DMPK* nebo *ZNF9*

DM1 a DM2 jsou považovány za skutečně dominantní onemocnění, u kterých nejsou rozdíly mezi heterozygoty a homozygoty. Vzhledem k frekvenci obou chorob, která nepřekračuje 1:8000, je nález homozygotů pro expenzi v genech *DMPK* nebo *ZNF9* vzácný. Bylo popsáno několik takových osob, většinou z konsanguinních rodin. V našem souboru byla odhalena jedna pacientka s DM1 a s expanzí na obou alelách a tři pacienti s DM2 ze dvou rodin, kteří též neměli normální alelu. Neexistují žádné údaje o tom, že by tito pacienti pocházeli z příbuzenského sňatku.

Pacientka s DM1 a dvěma expandovanými alelami s 59 a 1600 CTG měla klasické symptomy DM1 s nepříliš závažným svalovým postižením, avšak s kognitivním defektem. V literatuře popsaní jedinci s homozygotní konstitucí expanzí v genu *DMPK* s jednou alelou mezi 38-160 CTG a druhou mezi 64-1000 CTG se klinickou manifestací nelišili od heterozygotů. Projevy sahaly od asymptomatických případů po klasické formy DM1 (Cobo et al. 1993; Martorell et al. 1996; Akbas et al. 2001; Abbruzzese et al. 2002). Naše pacientka tedy délkou alel a symptomatologií zapadá do této skupiny. Její kognitivní defekt lze vysvětlit délkou jedné z expanzí nad 1000 CTG, ale nelze vyloučit ani příspěvek druhé, kratší expanze. Existují i práce přisuzující závažný fenotyp právě homozygotitě. U pacienta s expanzemi 60 a 1250 CTG mohl být nález sekundární kraniosynostózy jen náhodnou koincidencí (Cerghet et al. 2008). Pacientka z incestu matky a maternálního strýce měla kongenitální DM1 a alely s 200 a 1200 CTG a jiný pacient z incestu otce a dcery měl závažný fenotyp kongenitální DM1 s těžkou mentální retardací a dysmorfickými rysy a s expanzemi 330 a 700 CTG (Zuhlke et al. 2007). Autoři vysvětlují závažné kongenitální formy délkou obou alel nad 200 CTG. Kongenitální formy z našeho souboru mají expanze mezi 1000-2000 CTG (Obr. 23), přičemž u těchto forem jsou popsány i alely kratší, od 730 CTG (Redman et al. 1993). Je tedy možné, že kongenitální fenotyp pacientky s expanzemi 200 a 1200 CTG mohl vzniknout samotným vlivem alely s 1200 CTG. Druhý pacient měl závažný fenotyp včetně rysů mimo DM1 (kalvariální hyperostóza, generalizovaná osteopenie, absence nehtů). Jeho závažný kongenitální fenotyp mohl být způsoben dvěma alelami delšími než 200 CTG, ale původ dalších příznaků byl nejasný. Tento pacient je živě narozeným dítětem s vůbec nejdelšími popsanými expanzemi (přes 300 CTG) na obou chromozomech. Otázkou zůstává, zda není

homozygotní konstituce velmi dlouhých expanzí letální v embryonálním či jiném prenatálním stadiu, kde by mohlo hrát roli například signifikantní snížení hladiny *DMPK* mRNA (Krahe et al. 1995). Práce Zuhlke et al. ale pomíjí možnost homozygotních mutací v dalších genech, které jsou u incestu pravděpodobné a které by se mohly na fenotypu též podílet.

Mezi pacienty testovanými na expanzi v genu *ZNF9* jsme odhalili 3 osoby (2 sestry a 1 nepříbuzného pacienta) bez normální alely. U DM2 nebyly popsány delece genu *ZNF9*, a proto naši pacienti pravděpodobně nesou dvě expanze. To podporuje i fakt, že všech jejich 7 testovaných potomků nese expanze. Fenotyp všech 3 pacientů nevybočoval z klasického obrazu DM2, ale příznaky byly manifestovány výrazněji. Pacient 8-3 si potíží se ztuhlostí všiml již v mládí a sestry 8-1 a 8-2 udávaly nástup obtíží ve 3. dekádě života a v 5.-6. dekádě progresi do rozvinuté svalové slabosti s neschopností chůze do schodů a s myalgií. Pacienti měli různě rozvinuté i další typické příznaky, včetně katarakty, diabetu a srdečních problémů. Nebyly zaznamenány žádné symptomy, které by byly mimo rámec DM2. Pacienti se podrobili neuro-svalovému vyšetření ve věku, kdy je DM2 obvykle zachycena, a nevybočují z rámce klinických zkušeností s DM2. Klinické a patologické nálezy spojené s homozygotní konstitucí expanze v genu *ZNF9* byly popsány jen u tří pacientů z velké afghánské konsanguinní rodiny (Schoser et al. 2004). Byl mezi nimi jeden s těžším průběhem onemocnění. Mezi homozygoty a heterozygoty nebyly odhaleny žádné rozdíly v rozměru a počtu ribonukleárních inkluzí ve svalových buňkách či ve výstupech zobrazovacích studií mozku. Pozorování byla konsistentní s kompletní fenotypovou dominancí DM2, u které je, podobně jako u DM1, za hlavní patogenní mechanismus považováno nabytí toxické funkce RNA. Další údaje o homozygotních pacientech s DM2 v dostupné literatuře chybí, a proto je těžké jejich fenotyp nebo prognózu posuzovat. Poučení by mohly přinést pokračující studie těchto pacientů, protože je možné, že by u nich mohlo dojít k rychlejší progresi onemocnění (Schoser et al. 2004), podobně jako to prokázala dlouhodobá srovnávací studie homozygotních a heterozygotních pacientů s Huntingtonovou choreou (Squitieri et al. 2003).

6. ZÁVĚRY

Práce je zaměřena na tři závažné choroby podmíněné jedinečným mutačním mechanismem - expanzí krátkých tandemových repetic. Syndrom fragilního chromozomu X je nejčastější příčinou X-vázané mentální retardace. Myotonické dystrofie typu 1 a 2 jsou nejčastějšími muskulárními dystrofiemi u dospělých. Práce shrnuje poznatky získané na velkých souborech pacientů shromážděných v rámci rutinní DNA diagnostiky těchto chorob. Byla zavedena široká paleta metod pro co nejrychlejší a nejpresnější detekci expanzí, zejména rychlá fluorescenční PCR, TP-PCR a RP-PCR. Jako alternativní a doplňující metoda je stále využíván Southernův blot. Na základě získaných zkušeností a doporučení EMQN byl navržen optimální diagnostický protokol spočívající na promyšlené kombinaci těchto metod.

Záchyt syndromu fragilního chromozomu X v souboru 1880 pacientů a jejich příbuzných indikovaných na testování FXS byl 4,5%. Ve shodě s literaturou byly pozorovány typické zákonitosti intergeneračního přenosu alel genu *FMR1*. Jedna pacientka s plným projevem FXS měla přednostní inaktivaci chromozomu X postiženého intersticiální delecí. U dvou pacientů s FXS byly popsány zvláštní koincidence s karyotypem 47,XYY. V rodinách s FXS byl identifikován jeden pacient s jistým a jedna pacientka s možným onemocněním FXTAS. Další pacient byl nalezen v souboru 256 ataktických pacientů starších 45 let. Tam byla též identifikována žena s Friedreichovou ataxií a současným nálezem premutace FXS.

V souboru 675 pacientů indikovaných na testování genů *DMPK* a *ZNF9* bylo identifikováno 87 rodin s DM1 a 42 rodin s DM2. DM2 tedy tvoří významnou část (přibližně 1/3) myotonických dystrofií v regionu Čech. Práce popisuje též identifikaci pacientů s homozygotní mutací v genech *DMPK* a *ZNF9*. Nejvýznamnějším nálezem je identifikace sekvenčních přerušení v repetici CTG v genu *DMPK*, která jsme popsali u pacientů s DM1 jako první na světě. Tato přerušení jsme odhalili u téměř 5% rodin s DM1. Lokalizace i typ přerušení se v intergeneračních přenosech výrazně měnily. Fenotyp pacientů odpovídal klasické DM1, avšak příznaky byly někdy mírnější. Přerušení byla identifikována i u 2 pacientů s intermediárními alelami, avšak jejich vliv na fenotyp zůstává nejasný. Repetice CTG v genu *DMPK* nemusí tedy být vždy čistá a nečistoty mohou ovlivnit stabilitu alel a možná i fenotyp pacientů podobně, jak tomu je u jiných expanzních chorob.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Abbruzzese C, Costanzi Porrini S, Mariani B, Gould FK, McAbney JP, Monckton DG, Ashizawa T a Giacanelli M (2002) Instability of a premutation allele in homozygous patients with myotonic dystrophy type 1. *Ann Neurol* 52:435-441
- Akbas F, Serdaroglu P, Deymeer F, Aysal F a Erginel-Unaltuna N (2001) Molecular and clinical study of two myotonic dystrophy homozygotes. *J Med Genet* 38:E40
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, et al. (1999) Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* 83:322-325
- Alwazzan M, Newman E, Hamshere MG a Brook JD (1999) Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8:1491-1497
- Anvret M, Ahlberg G, Grandell U, Hedberg B, Johnson K a Edstrom L (1993) Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2:1397-1400
- Ashizawa T, Anvret M, Baiget M, Barcelo JM, Brunner H, Cobo AM, Dallapiccola B, Fenwick RG, Jr., Grandell U, Harley H a et al. (1994) Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 54:414-423
- Ashizawa T, Dubel JR, Dunne PW, Dunne CJ, Fu YH, Pizzuti A, Caskey CT, Boerwinkle E, Perryman MB, Epstein HF a et al. (1992) Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology* 42:1877-1883
- Bagni C a Greenough WT (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6:376-387
- Bachinski LL, Udd B, Meola G, Sansone V, Bassez G, Eymard B, Thornton CA, Moxley RT, Harper PS, Rogers MT, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Wieser T, Gamez J, Navarro C, Bottani A, Kohler A, Shriver MD, Sallinen R, Wessman M, Zhang S, Wright FA a Krahe R (2003) Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)_n expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect. *Am J Hum Genet* 73:835-848
- Batten FE a Gibb HP (1909) Myotonic atrophica. *Brain* 32:187
- Bennetto L, Pennington BF, Porter D, Taylor AK a Hagerman RJ (2001) Profile of cognitive functioning in women with the fragile X mutation. *Neuropsychology* 15:290-299
- Biancalana V, Steinbach P a Stenhouse S (2006) Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis in Fragile X Syndrome.
- Bodega B, Bione S, Dalpra L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, Ginelli E a Marozzi A (2006) Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod* 21:952-957
- Bodurtha J, Jackson-Cook C, Maddalena A, Piserchio J a Waller R (1993) 46XY/47XYY mosaicism and fragile X. *Clin Genet* 44:109-110
- Bonifazi E, Vallo L, Giardina E, Botta A a Novelli G (2004) A long PCR-based molecular protocol for detecting normal and expanded ZNF9 alleles in myotonic dystrophy type 2. *Diagn Mol Pathol* 13:164-166
- Botta A, Bonifazi E, Vallo L, Gennarelli M, Garre C, Salehi L, Iraci R, Sansone V, Meola G a Novelli G (2006) Italian guidelines for molecular analysis in myotonic dystrophies. *Acta Myol* 25:23-33
- Braida C, Stefanatos RK, Adam B, Mahajan N, Smeets HJ, Niel F, Goizet C, Arveiler B, Koenig M, Lagier-Tourenne C, Mandel JL, Faber CG, de Die-Smulders CE, Spaans F a Monckton DG (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet*
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T a et al. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68:799-808
- Brouwer JR, Willemsen R a Oostra BA (2009) Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 31:71-83
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB a Warren ST (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107:477-487

- Brunner HG, Bruggenwirth HT, Nillesen W, Jansen G, Hamel BC, Hoppe RL, de Die CE, Howeler CJ, van Oost BA, Wieringa B a et al. (1993) Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 53:1016-1023
- Brussino A, Gellera C, Saluto A, Mariotti C, Arduino C, Castellotti B, Camerlingo M, de Angelis V, Orsi L, Tosca P, Migone N, Taroni F a Brusco A (2005) FMR1 gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology* 64:145-147
- Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van Tongeren T, Aslanidis C, de Jong P, Jansen G, Anvret M, Riley B a et al. (1992) Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355:547-548
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423-1427
- Cardani R, Baldassa S, Botta A, Rinaldi F, Novelli G, Mancinelli E a Meola G (2009) Ribonuclear inclusions and MBNL1 nuclear sequestration do not affect myoblast differentiation but alter gene splicing in myotonic dystrophy type 2. *Neuromuscul Disord* 19:335-343
- Cardani R, Mancinelli E, Sansone V, Rotondo G a Meola G (2004) Biomolecular identification of (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2) by FISH on muscle biopsy. *Eur J Histochem* 48:437-442
- Carrel L, Park C, Tyekucheva S, Dunn J, Chiaromonte F a Makova KD (2006) Genomic environment predicts expression patterns on the human inactive X chromosome. *PLoS Genet* 2:e151
- Carrel L a Willard HF (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400-404
- Cerghet M, Tapos D, Serajee FJ a Mahbulul Huq AH (2008) Homozygous myotonic dystrophy with craniosynostosis. *J Child Neurol* 23:930-933
- Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK a Loesch DZ (2007) Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *J Autism Dev Disord* 37:738-747
- Cobo A, Martinez JM, Martorell L, Baiget M a Johnson K (1993) Molecular diagnosis of homozygous myotonic dystrophy in two asymptomatic sisters. *Hum Mol Genet* 2:711-715
- Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB, Hjelm LN, Kaufmann WE a Warren ST (2008) Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 146A:1358-1367
- Crawford DC, Acuna JM a Sherman SL (2001) FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 3:359-371
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM, Jr., Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J a Opitz J (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 72:468-477
- Davis BM, McCurrach ME, Taneja KL, Singer RH a Housman DE (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7388-7393
- Day JW, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W, Schneider C, Koch MC, Beilman GJ, Harrison AR, Dalton JC a Ranum LP (2003) Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 60:657-664
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA a Willems PJ (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 3:31-35
- De Michele G, Cavalcanti F, Criscuolo C, Pianese L, Monticelli A, Filla A a Coccozza S (1998) Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 7:1901-1906
- de Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Tibben A, Halley DJ, Duivenvoorden HJ, Oostra BA a Niermeijer MF (1999) Screening for the fragile X syndrome among the mentally retarded: a clinical study. The Collaborative Fragile X Study Group. *J Med Genet* 36:467-470
- de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, Curfs LM, Halley DJ, Oostra BA, van den Ouweland AM a Niermeijer MF (1996) Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 58:1025-1032
- Dunne PW, Walch ET a Epstein HF (1994) Phosphorylation reactions of recombinant human myotonic dystrophy protein kinase and their inhibition. *Biochemistry* 33:10809-10814
- Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, Richards CS, Ward PA a Nelson DL (1994) Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 8:88-94

- Everett CM a Wood NW (2004) Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 127:2385-2405
- Falk M, Vojtiskova M, Lukas Z, Kroupova I a Froster U (2006) Simple procedure for automatic detection of unstable alleles in the myotonic dystrophy and Huntington's disease loci. *Genet Test* 10:85-97
- Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ a Tassone F (2009) Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn* 11:306-310
- Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, Chalifaux M, Holden JJ, Nelson DL, Howard-Peebles PN a Maddalena A (1995) The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring. *Am J Hum Genet* 56:1147-1155
- Fryns JP a van den Berghe H (1982) Transmission of fragile (X)(q27) from normal male(s). *Hum Genet* 61:262-263
- Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG, Jr. a et al. (1993) Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260:235-238
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG, Jr., Warren ST a et al. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67:1047-1058
- Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, Jr., King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, Wieringa B, Korneluk R, Perryman MB, Epstein HF a Caskey CT (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255:1256-1258
- Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, Kim HJ, Lee YH, Kaibuchi K, Kahn BB, Masuzaki H, Kim JK, Lee SW a Kim YB (2005) Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2:119-129
- Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zuhlke C, Nakamura K, Rasmussen A, Siciliano MJ, Ashizawa T a Lin X (2008) Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet* 16:215-222
- Garber KB, Visootsak J a Warren ST (2008) Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:666-672
- Garcia-Nonell C, Ratera ER, Harris S, Hessler D, Ono MY, Tartaglia N, Marvin E, Tassone F a Hagerman RJ (2008) Secondary medical diagnosis in fragile X syndrome with and without autism spectrum disorder. *Am J Med Genet A* 146A:1911-1916
- Gatchel JR a Zoghbi HY (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6:743-755
- Giordano M, De Angelis MS, Cantello R, Abdirisak NA, Mutani R a Momigliano Richiardi P (1995) Problems arising in correlating clinical and molecular data in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 47:302-304
- Goldman A, Ramsay M a Jenkins T (1994) Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *J Med Genet* 31:37-40
- Gomes-Pereira M a Monckton DG (2006) Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down. *Mutat Res* 598:15-34
- Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M a Hagerman PJ (2002) Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* 125:1760-1771
- Guida M, Marger RS, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Kissel JT, Mendell JR a Prior TW (1995) A molecular protocol for diagnosing myotonic dystrophy. *Clin Chem* 41:69-72
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B a Hagerman PJ (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57:127-130
- Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, Harper PS, Housman DE a Shaw DJ (1992) Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355:545-546
- Harper PS (2001) Myotonic dystrophy. R.Saunders, London
- Harper PS, Harley HG, Reardon W a Shaw DJ (1992) Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* 51:10-16
- Hatton DD, Sideris J, Skinner M, Mankowski J, Bailey DB, Jr., Roberts J a Mirrett P (2006) Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. *Am J Med Genet A* 140A:1804-1813
- Heine-Suner D, Torres-Juan L, Morla M, Busquets X, Barcelo F, Pico G, Bonilla L, Govea N, Bernues M a Rosell J (2003) Fragile-X syndrome and skewed X-chromosome inactivation within a family: a female member with complete inactivation of the functional X chromosome. *Am J Med Genet A* 122A:108-114
- Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C a Mandel JL (1992) Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 29:794-801

- Heitz D, Rousseau F, Devys D, Saccone S, Abderrahim H, Le Paslier D, Cohen D, Vincent A, Toniolo D, Della Valle G a et al. (1991) Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* 251:1236-1239
- Hofmann-Radvanyi H, Lavedan C, Rabes JP, Savoy D, Duros C, Johnson K a Junien C (1993) Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele. *Hum Mol Genet* 2:1263-1266
- Hon LS a Zhang Z (2007) The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol* 8:R166
- Chakrabarti R a Schutt CE (2002) Novel sulfoxides facilitate GC-rich template amplification. *Biotechniques* 32:866, 868, 870-862, 874
- Charles P, Camuzat A, Benammar N, Sellal F, Destee A, Bonnet AM, Lesage S, Le Ber I, Stevanin G, Durr A a Brice A (2007) Are interrupted SCA2 CAG repeat expansions responsible for parkinsonism? *Neurology* 69:1970-1975
- Chocholska S, Rossier E, Barbi G a Kehrer-Sawatzki H (2006) Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22.2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *Am J Med Genet A* 140:604-610
- Chong SS, Eichler EE, Nelson DL a Hughes MR (1994) Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet* 51:522-526
- Choudhry S, Mukerji M, Srivastava AK, Jain S a Brahmachari SK (2001) CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum Mol Genet* 10:2437-2446
- Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, Servadio A, Zoghbi HY a Orr HT (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet* 5:254-258
- IDMC (2000) New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). IDMC The International Myotonic Dystrophy Consortium
Neurology 54:1218-1221
- Imbert G, Kretz C, Johnson K a Mandel JL (1993) Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 4:72-76
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ a Leehey MA (2007) Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* 6:45-55
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco CM, Berry-Kravis E, Tassone F a Hagerman PJ (2004) Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *Jama* 291:460-469
- Jacquemont S, Leehey MA, Hagerman RJ, Beckett LA a Hagerman PJ (2006) Size bias of fragile X premutation alleles in late-onset movement disorders. *J Med Genet* 43:804-809
- Jakubiczka S, Vielhaber S, Kress W, Kupferling P, Reuner U, Kunath B a Wieacker P (2004) Improvement of the diagnostic procedure in proximal myotonic myopathy/myotonic dystrophy type 2. *Neurogenetics* 5:55-59
- James RS, Coppin B, Dalton P, Dennis NR, Mitchell C, Sharp AJ, Skuse DH, Thomas NS a Jacobs PA (1998) A study of females with deletions of the short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 102:507-516
- Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, Nillesen W, Smeets H, Vits L, Howeler C, Brunner H a Wieringa B (1994) Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* 54:575-585
- Jaworski A, Rosche WA, Gellibolian R, Kang S, Shimizu M, Bowater RP, Sinden RR a Wells RD (1995) Mismatch repair in *Escherichia coli* enhances instability of (CTG)_n triplet repeats from human hereditary diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11019-11023
- Jin P, Duan R, Qurashi A, Qin Y, Tian D, Rosser TC, Liu H, Feng Y a Warren ST (2007) Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron* 55:556-564
- Jung J a Bonini N (2007) CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science* 315:1857-1859
- Junghans RP, Ebralidze A a Tiwari B (2001) Does (CUG)_n repeat in DMPK mRNA 'paint' chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse phenotype of myotonic dystrophy?: A new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation. *Neurogenetics* 3:59-67
- Kaliman P a Llagostera E (2008) Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal* 20:1935-1941

- Kennedy L, Evans E, Chen CM, Craven L, Detloff PJ, Ennis M a Shelbourne PF (2003) Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 12:3359-3367
- Knight SJ, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, Pointon J, Middleton-Price HR, Barnicoat A, Pembrey ME a et al. (1993) Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* 74:127-134
- Krahe R, Ashizawa T, Abbruzzese C, Roeder E, Carango P, Giacanelli M, Funanage VL a Siciliano MJ (1995) Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 28:1-14
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR a Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 252:1711-1714
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE a Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352:77-79
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A a Fischer U (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* 10:329-338
- Lachlan KL, Youings S, Costa T, Jacobs PA a Thomas NS (2006) A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet* 118:640-651
- Le Ber I, Martinez M, Champion D, Laquerriere A, Betard C, Bassez G, Girard C, Saugier-veber P, Raux G, Sergeant N, Magnier P, Maisonneuve T, Eymard B, Duyckaerts C, Delacourte A, Frebourg T a Hannequin D (2004) A non-DM1, non-DM2 multisystem myotonic disorder with frontotemporal dementia: phenotype and suggestive mapping of the DM3 locus to chromosome 15q21-24. *Brain* 127:1979-1992
- Leeflang EP a Arnheim N (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum Mol Genet* 4:135-136
- Leeflang EP, Tavares S, Marjoram P, Neal CO, Srinidhi J, MacFarlane H, MacDonald ME, Gusella JF, de Young M, Wexler NS a Arnheim N (1999) Analysis of germline mutation spectra at the Huntington's disease locus supports a mitotic mutation mechanism. *Hum Mol Genet* 8:173-183
- Libby RT, Hagerman KA, Pineda VV, Lau R, Cho DH, Baccam SL, Axford MM, Cleary JD, Moore JM, Sopher BL, Tapscott SJ, Philippova GN, Pearson CE a La Spada AR (2008) CTCF cis-regulates trinucleotide repeat instability in an epigenetic manner: a novel basis for mutational hot spot determination. *PLoS Genet* 4:e1000257
- Lin Y, Hubert L, Jr. a Wilson JH (2009) Transcription destabilizes triplet repeats. *Mol Carcinog* 48:350-361
- Liquori CL, Ikeda Y, Weatherspoon M, Ricker K, Schoser BG, Dalton JC, Day JW a Ranum LP (2003) Myotonic dystrophy type 2: human founder haplotype and evolutionary conservation of the repeat tract. *Am J Hum Genet* 73:849-862
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW a Ranum LP (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293:864-867
- Loesch DZ, Huggins RM a Hagerman RJ (2004) Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:31-41
- Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell W T, Li W, Warren ST a Feng Y (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15201-15206
- Lubs HA (1969) A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 21:231-244
- Lugenbeel KA, Peier AM, Carson NL, Chudley AE a Nelson DL (1995) Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat Genet* 10:483-485
- MacDonald MC, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, Barnes G, et al. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983
- Macek M, Nedomova V, Bavorova H, Louckova M, Chudoba D, Seemanova E, Schmidtova A a Passarge E (1983) [Successful prenatal diagnosis of the fragile X chromosome without the use of folic acid antagonists]. *Cesk Pediatr* 38:525-527
- Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcelo J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-macdonald J, de Jong PJ, Wieringa B a Korneluk RG (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255:1253-1255
- Mahadevan MS, Foitzik MA, Surh LC a Korneluk RG (1993) Characterization and polymerase chain reaction (PCR) detection of an Alu deletion polymorphism in total linkage disequilibrium with myotonic dystrophy. *Genomics* 15:446-448
- Machuca-Tzili L, Brook D a Hilton-Jones D (2005) Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32:1-18

- Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC a Thornton CA (2002) Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10:35-44
- Margolis JM, Schoser BG, Moseley ML, Day JW a Ranum LP (2006) DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. *Hum Mol Genet* 15:1808-1815
- Marchini C, Lonigro R, Verriello L, Pellizzari L, Bergonzi P a Damante G (2000) Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 57:74-82
- Martin JP a Bell J (1943) A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiat* 6:154-157
- Martorell L, Gamez J, Cayuela ML, Gould FK, McAbney JP, Ashizawa T, Monckton DG a Baiget M (2004) Germline mutational dynamics in myotonic dystrophy type 1 males: allele length and age effects. *Neurology* 62:269-274
- Martorell L, Illa I, Rosell J, Benitez J, Sedano MJ a Baiget M (1996) Homozygous myotonic dystrophy: clinical and molecular studies of three unrelated cases. *J Med Genet* 33:783-785
- Martorell L, Monckton DG, Sanchez A, Lopez De Munain A a Baiget M (2001) Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation. *Neurology* 56:328-335
- Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB a Nelson DL (2006) Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10: repeat purity as a disease modifier? *Am J Hum Genet* 78:125-129
- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E, Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY a Ashizawa T (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26:191-194
- Messaed C a Rouleau GA (2009) Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis* 34:397-405
- Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA a Swanson MS (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19:4439-4448
- Miller SA, Dykes DD a Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Milunsky A, Huang X, Amos JA, Herskowitz J, Farrer LA a Wyandt HE (1993) 46,XY/47,XYY male with the fragile X syndrome: cytogenetic and molecular studies. *Am J Med Genet* 45:589-593
- Montermini L, Andermann E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, Cavalcanti F, Pianese L, Iodice L, Farina G, Monticelli A, Turano M, Filla A, De Michele G a Coccozza S (1997) The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet* 6:1261-1266
- Morleo M, Pramparo T, Perone L, Gregato G, Le Caignec C, Mueller RF, Ogata T, Raas-Rothschild A, de Blois MC, Wilson LC, Zaidman G, Zuffardi O, Ballabio A a Franco B (2005) Microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular characterization of 11 cases. *Am J Med Genet A* 137:190-198
- Moseley ML, Schut LJ, Bird TD, Koob MD, Day JW a Ranum LP (2000) SCA8 CTG repeat: en masse contractions in sperm and intergenerational sequence changes may play a role in reduced penetrance. *Hum Mol Genet* 9:2125-2130
- Mounsey JP, John JE, 3rd, Helmke SM, Bush EW, Gilbert J, Roses AD, Perryman MB, Jones LR a Moorman JR (2000) Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *J Biol Chem* 275:23362-23367
- Mulvihill DJ, Nichol Edamura K, Hagerman KA, Pearson CE a Wang YH (2005) Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome. *J Biol Chem* 280:4498-4503
- Muranyi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF a Hartshorne DJ (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett* 493:80-84
- Musova Z, Mazanec R, Krepelova A, Ehler E, Vales J, Jaklova R, Prochazka T, Koukal P, Marikova T, Kraus J, Havlovicova M a Sedlacek Z (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A* 149A:1365-1374
- Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R a Ceccherini I (2006) Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn* 8:544-550
- Nahas FA, Garbern J, Krajewski KM, Roa BB a Feldman GL (2005) Juvenile onset Huntington disease resulting from a very large maternal expansion. *Am J Med Genet A* 137A:328-331
- Nakamori M, Sobczak K, Moxley RT, 3rd a Thornton CA (2009) Scaled-down genetic analysis of myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Neuromuscul Disord* 19:759-762

- Napierala M a Krzyzosiak WJ (1997) CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins. *J Biol Chem* 272:31079-31085
- Napierala M, Michalowski D, de Mezer M a Krzyzosiak WJ (2005) Facile FMR1 mRNA structure regulation by interruptions in CGG repeats. *Nucleic Acids Res* 33:451-463
- Neville CE, Mahadevan MS, Barcelo JM a Korneluk RG (1994) High resolution genetic analysis suggests one ancestral predisposing haplotype for the origin of the myotonic dystrophy mutation. *Hum Mol Genet* 3:45-51
- Nielsen KB (1986) Sex chromosome aneuploidy in fragile X carriers. *Am J Med Genet* 23:537-544
- Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE, Jr., Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Vaisanen ML, von Koskull H a Sherman SL (2003) Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 72:454-464
- Novelli G, Gennarelli M, Menegazzo E, Angelini C a Dallapiccola B (1995) Discordant clinical outcome in myotonic dystrophy relatives showing (CTG) $n > 700$ repeats. *Neuromuscul Disord* 5:157-159
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M a Mandel J (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1097-1102
- Ogata T, Muroya K, Matsuo N, Shinohara O, Yorifuji T, Nishi Y, Hasegawa Y, Horikawa R a Tachibana K (2001) Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5498-5508
- Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Jr., Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP a Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4:221-226
- Pearson CE, Eichler EE, Lorenzetti D, Kramer SF, Zoghbi HY, Nelson DL a Sinden RR (1998) Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation. *Biochemistry* 37:2701-2708
- Pearson CE, Ewel A, Acharya S, Fishel RA a Sinden RR (1997) Human MSH2 binds to trinucleotide repeat DNA structures associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 6:1117-1123
- Pearson CE, Nichol Edamura K a Cleary JD (2005) Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6:729-742
- Pembrey ME, Winter RM a Davies KE (1985) A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J Med Genet* 21:709-717
- Pennacchio LA, Lehesjoki AE, Stone NE, Willour VL, Virtaneva K, Miao J, D'Amato E, Ramirez L, Faham M, Koskineniemi M, Warrington JA, Norio R, de la Chapelle A, Cox DR a Myers RM (1996) Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Science* 271:1731-1734
- Philips AV, Timchenko LT a Cooper TA (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280:737-741
- Ranum LP a Cooper TA (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 29:259-277
- Ranum LP a Day JW (2004) Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 74:793-804
- Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD a Day JW (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* 19:196-198
- Redman JB, Fenwick RG, Jr., Fu YH, Pizzuti A a Caskey CT (1993) Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *Jama* 269:1960-1965
- Reyniers E, Martin JJ, Cras P, Van Marck E, Handig I, Jorens HZ, Oostra BA, Kooy RF a Willems PJ (1999) Postmortem examination of two fragile X brothers with an FMR1 full mutation. *Am J Med Genet* 84:245-249
- Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Speich N, Reiners K, Schneider C a Moxley RT, 3rd (1995) Proximal myotonic myopathy. Clinical features of a multisystem disorder similar to myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 52:25-31
- Ridley AJ (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2:303-310
- Riggins GJ, Sherman SL, Oostra BA, Sutcliffe JS, Feitell D, Nelson DL, van Oost BA, Smits AP, Ramos FJ, Pfendner E a et al. (1992) Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 KB proximal to the fragile X site. *Am J Med Genet* 43:237-243
- Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J a Sutherland GR (1991a) Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet* 28:818-823

- Richards RI, Shen Y, Holman K, Kozman H, Hyland VJ, Mulley JC a Sutherland GR (1991b) Fragile X syndrome: diagnosis using highly polymorphic microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 48:1051-1057
- Rodriguez-Reventa L, Madrigal I, Pagonabarraga J, Xuncla M, Badenas C, Kulisevsky J, Gomez B a Mila M (2009) Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur J Hum Genet* 17:1359-1362
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, Tommerup N, Van Der Hagen C, DeLozier-Blanchet C, Croquette MF a et al. (1991) Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 325:1673-1681
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberle I a Mandel JL (1992) On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 43:197-207
- Salehi LB, Bonifazi E, Stasio ED, Gennarelli M, Botta A, Vallo L, Iraci R, Massa R, Antonini G, Angelini C a Novelli G (2007) Risk prediction for clinical phenotype in myotonic dystrophy type 1: data from 2,650 patients. *Genet Test* 11:84-90
- Sambrook J, Fritsch EF a Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, New York
- Sanger F, Nicklen S a Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Savkur RS, Philips AV a Cooper TA (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29:40-47
- Seemanova E, Passarge E, Schmidt A, Hyanek J a Salichova J (1982) [The fragile chromosome X syndrome]. *Cas Lek Cesk* 121:1238-1241
- Seemanova E, Schmidt A, Subrt I, Macek M, Goetz P, Marikova T a Sulcova V (1987) [The fragile X chromosome syndrome]. *Cesk Pediatr* 42:650-654
- Seemanova E, Schmidt A, Subrt I, Passarge E, Macek M a Nedomova V (1985) [The 47,XXX syndrome in a family with the fragile X chromosome syndrome]. *Cas Lek Cesk* 124:988-991
- Sharma R, Bhatti S, Gomez M, Clark RM, Murray C, Ashizawa T a Bidichandani SI (2002) The GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia shows a high level of somatic instability in vivo, with a significant predilection for large contractions. *Hum Mol Genet* 11:2175-2187
- Shaw DJ, McCurrach M, Rundle SA, Harley HG, Crow SR, Sohn R, Thirion JP, Hamshire MG, Buckler AJ, Harper PS a et al. (1993) Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* 18:673-679
- Shelbourne P, Davies J, Buxton J, Anvret M, Blennow E, Bonduelle M, Schmedding E, Glass I, Lindenbaum R, Lane R a et al. (1993) Direct diagnosis of myotonic dystrophy with a disease-specific DNA marker. *N Engl J Med* 328:471-475
- Sherman SL (2000) Premature ovarian failure among fragile X premutation carriers: parent-of-origin effect? *Am J Hum Genet* 67:11-13
- Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G a Watson M (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 69:289-299
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M a Sheth RD (2003) Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 60:367-380
- Schooser BG, Kress W, Walter MC, Halliger-Keller B, Lochmuller H a Ricker K (2004) Homozygosity for CCTG mutation in myotonic dystrophy type 2. *Brain* 127:1868-1877
- Slean MM, Panigrahi GB, Ranum LP a Pearson CE (2008) Mutagenic roles of DNA "repair" proteins in antibody diversity and disease-associated trinucleotide repeat instability. *DNA Repair (Amst)* 7:1135-1154
- Sobczak K a Krzyzosiak WJ (2004) Imperfect CAG repeats form diverse structures in SCA1 transcripts. *J Biol Chem* 279:41563-41572
- Sobczak K a Krzyzosiak WJ (2005) CAG repeats containing CAA interruptions form branched hairpin structures in spinocerebellar ataxia type 2 transcripts. *J Biol Chem* 280:3898-3910
- Sofola OA, Jin P, Qin Y, Duan R, Liu H, de Haro M, Nelson DL a Botas J (2007) RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. *Neuron* 55:565-571
- Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein DC, Almqvist EW, Turner D, Bachoud-Levi AC, Simpson SA, Delatycki M, Maglione V, Hayden MR a Donato SD (2003) Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126:946-955
- Stalker HJ, Keller KL, Gray BA a Zori RT (2003) Concurrence of fragile X syndrome and 47, XYY in an individual with a Prader-Willi-like phenotype. *Am J Med Genet A* 116A:176-178

- Steinert H (1909) Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwundes der Myotoniker. *Dtsch Z Nervenheilk* 37:38
- Stolle CA, Frackelton EC, McCallum J, Farmer JM, Tsou A, Wilson RB a Lynch DR (2008) Novel, complex interruptions of the GAA repeat in small, expanded alleles of two affected siblings with late-onset Friedreich ataxia. *Mov Disord* 23:1303-1306
- Strom CM, Crossley B, Redman JB, Buller A, Quan F, Peng M, McGinnis M, Fenwick RG, Jr. a Sun W (2007) Molecular testing for Fragile X Syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. *Genet Med* 9:46-51
- Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M a Sherman SL (2005) Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 20:402-412
- Sutherland GR a Ashforth PL (1979) X-linked mental retardation with macro-orchidism and the fragile site at Xq 27 or 28. *Hum Genet* 48:117-120
- Tassone F, Hagerman RJ, Ikle DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA a Taylor AK (1999) FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 84:250-261
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE a Hagerman PJ (2000) Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 66:6-15
- Telenius H, Kremer HP, Theilmann J, Andrew SE, Almqvist E, Anvret M, Greenberg C, Greenberg J, Lucotte G, Squitieri F a et al. (1993) Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Hum Mol Genet* 2:1535-1540
- Thompson J a Thompson M (1986) *Genetics in Medicine*. W.B.Saunders
- Timchenko L, Nastainczyk W, Schneider T, Patel B, Hofmann F a Caskey CT (1995) Full-length myotonin protein kinase (72 kDa) displays serine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5366-5370
- Timchenko LT, Miller JW, Timchenko NA, DeVore DR, Datar KV, Lin L, Roberts R, Caskey CT a Swanson MS (1996) Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24:4407-4414
- Tishkoff SA, Goldman A, Calafell F, Speed WC, Deinard AS, Bonne-Tamir B, Kidd JR, Pakstis AJ, Jenkins T a Kidd KK (1998) A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus: implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy mutations. *Am J Hum Genet* 62:1389-1402
- Trottier Y, Biancalana V a Mandel JL (1994) Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* 31:377-382
- Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum LP, Bassez G, Kress W, Schoser B a Moxley R (2006) 140th ENMC International Workshop: Myotonic Dystrophy DM2/PROMM and other myotonic dystrophies with guidelines on management. *Neuromuscul Disord* 16:403-413
- Vaisanen ML, Haataja R a Leisti J (1996) Decrease in the CGG_n trinucleotide repeat mutation of the fragile X syndrome to normal size range during paternal transmission. *Am J Hum Genet* 59:540-546
- Vazna A, Musova Z, Vlckova M, Novotna D, Dvorakova L, Hrdlicka M, Havlovicova M a Sedlacek Z FMR1 gene expansion, large deletion of Xp and Skewed X inactivation in a girl with mental retardation and autism. *American Journal of Medical Genetics, PartA*, in press
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP a et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905-914
- Wang YC, Lin ML, Lin SJ, Li YC a Li SY (1997) Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. *Hum Mutat* 10:393-399
- Wang Z, Willard HF, Mukherjee S a Furey TS (2006) Evidence of influence of genomic DNA sequence on human X chromosome inactivation. *PLoS Comput Biol* 2:e113
- Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR a Brock DJ (1996) A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet* 33:1022-1026
- Watson MS, Breg WR, Pauls D, Brown WT, Carroll AJ, Howard-Peebles PN, Meryash D a Shapiro LR (1988) Aneuploidy and the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 30:115-121
- Weinhausel A a Haas OA (2001) Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum Genet* 108:450-458
- Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M a Son LS (2005) Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Res* 33:3785-3798
- Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R a et al. (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 2:26-30
- Willemsen R, Olmer R, De Diego Otero Y a Oostra BA (2000) Twin sisters, monozygotic with the fragile X mutation, but with a different phenotype. *J Med Genet* 37:603-604

- Winchester CL, Ferrier RK, Sermoni A, Clark BJ a Johnson KJ (1999) Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 8:481-492
- Wolff DJ, Schwartz S a Carrel L (2000) Molecular determination of X inactivation pattern correlates with phenotype in women with a structurally abnormal X chromosome. *Genet Med* 2:136-141
- Wong LJ, Ashizawa T, Monckton DG, Caskey CT a Richards CS (1995) Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet* 56:114-122
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley J, Warren S, Schlessinger D a Et A (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252:1179-1181
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B a Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112:317-327
- Zhang L, Leeflang EP, Yu J a Arnheim N (1994) Studying human mutations by sperm typing: instability of CAG trinucleotide repeats in the human androgen receptor gene. *Nat Genet* 7:531-535
- Zhong N, Dobkin C a Brown WT (1993) A complex mutable polymorphism located within the fragile X gene. *Nat Genet* 5:248-253
- Zuhlke C, Dalski A, Hellenbroich Y, Bubel S, Schwinger E a Burk K (2002) Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles. *Eur J Hum Genet* 10:204-209
- Zuhlke C, Roeder E, Purmann S, Wiczorek D, Curry C, Loustalet C, Hellenbroich Y, Richardt HH a Gillissen-Kaesbach G (2007) Homozygous myotonic dystrophy: clinical findings in two patients and review of the literature. *Am J Med Genet A* 143A:2058-2061
- Zumrová A, Mazanec R, Vyhánek M, Krepelová A, Mušová Z, Krilová S, Appltová L a Havlovicova M (2005) Concomitancy of mutation in FRDA gene and FMR1 premutation in 58 year-old woman. *Neuro Endocrinol Lett* 26:71-74
- Zumrová A, Mušová Z, Havlovicová M, Schwabová J, Jech R a Hlavová E (2007) Syndrom fragilního chromosomu X s tremorem/ataxií (FXTAS) - pilotní studie v souboru pacientů s ataxií nejasné etiologie Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 70:558-561

8. PŘÍLOHY

8.1. Publikace v časopisech s IF vztahující se k tématu práce

Zumrová A, Mazanec R, Vyhnálek M, Krepelová A, Musová Z, Krilová S, Appltová L, Havlovicová M. Concomitancy of mutation in FRDA gene and *FMR1* premutation in 58 year-old woman. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26(1):71-74. IF 1.005.

Belšan T, Kraus J, Mazanec R, Mušová Z, Bóday A, Maříková T, Kynčl M. MRI zobrazení mozku u pacientů s myotonickou dystrofií DM 1. *Ces Slov Neurol Neurochirur.* 2007;70(3):266-271. IF 0.037.

Zumrová A, Mušová Z, Havlovicová M, Schwabová J, Jech R, Hlavová E. Syndrom fragilního chromozomu X s tremorem/ataxií (FXTAS): Pilotní studie na souboru pacientů s ataxií nejasné etiologie. *Ces Slov Neurol Neurochir.* 2007;70(5):558-561. IF 0.037.

Musova Z, Mazanec R, Krepelova A, Ehler E, Vales J, Jaklova R, Prochazka T, Koukal P, Marikova T, Kraus J, Havlovicova M, Sedlacek Z. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Amer J Med Genet A* 2009;149A(7):1365–1374. IF 2.555.

Vazna A, Musova Z, Vlckova M, Novotna D, Dvorakova L, Hrdlicka M, Havlovicova M, Sedlacek Z. *FMR1* gene expansion, large deletion of Xp and skewed X-inactivation in a girl with mental retardation and autism. *Amer J Med Genet A* 2010, v tisku.

8.2. Publikace v časopisech s IF s volným vztahem k tématu práce

Bauer PO, Kotliarova SE, Matoska V, Musova Z, Hedvicakova P, Boday A, Tomek A, Nukina N, Goetz P. Fluorescent multiplex PCR: Fast method for autosomal dominant spinocerebellar ataxias screening. *Rus J Genet.* 2005;41(6):675-682.

Musova Z, Hedvicakova P, Mohrmann M, Tesarova M, Krepelova A, Zeman J, Sedlacek Z. A novel insertion of a rearranged L1 element in exon 44 of the dystrophin gene: further evidence for possible bias in retroposon integration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):145-149.

Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, Marikova T. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):273-279.

8.3. Publikace v časopisech bez IF

Mušová Z, Mat'oska V, Krejčová S, Bóday A. Využitie polymorfizmov CA opakovaní v priamej a nepriamej diagnostike Duchenneovej a Beckerovej muskulárnej dystrofie. *Cas Lek Cesk.* 1997;136(3):90-94.

Bóday A, Mat'oska V, Konrádová V, Havlovicová M, Mušová Z, Krejčová S, Seemanová E. DNA diagnostika syndromu fragilního X chromozomu - FRAXA pomocí PCR. *Cas Lek Cesk.* 1998;137(1):22-25. Czech.

Havlovicová M, Propper L, Novotná D, Mušová Z, Hrdlička M, Sedláček Z. Genetická studie 20 pacientů s poruchami autistického spektra. *Cas Lek Cesk.* 2002;141(12):381-387.

Seemanová E, Mušová Z. Různorodá manifestace dystrofické myotonie Curschmannovy-Steinertovy v důsledku genomického imprintingu. *Čes.-slov. Pediat.* 2007;62(7-8):451-454.

Seemanová E, Mušová Z. Různé projevy syndromu fragilního X chromosomu a jejich příčiny. *Čes.-slov. Pediat.* 2007;62(6):417-422.

8.4. Přednášky a postery

V. Matoska, T. Marikova, P. Hedvicakova, Z. Musova, D. Novotna, M. Havlovicova, P. Seeman, E. Seemanova, P. Bauer, J. Kraus, A. Zumrova, R. Mazanec, P. Goetz. Two cases of coincidence of monogenic autosomal linked neurodegenerative disorders and the chromosomal abnormality of gonosomes (poster). *European Congress of Human Genetics*, 25. - 29. 5. 2002, Strasbourg, France. *Eur J Hum Genet.* 2002;10 (S1):127-128.

M. Havlovicova, M. Hrdlicka, D. Novotna, Z. Musova, E. Kocarek, L. Propper, Z. Sedlacek. A Genetic Study of 100 Patients with Autism Spectrum Disorders (poster). *European Human Genetics Conference 2003*, 3. - 6. 5. 2003, Birmingham, England. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(S1):109-110.

T. Marikova, B. Petrak, A. Krepelova, S. Bendova, E. Kocarek, Z. Musova, J. Kraus. The Neurofibromatosis Type 1 - Multisystem Disease Requiring Multidisciplinary Approach (poster). *European Human Genetics Conference 2005*, 7. - 10. 5. 2005, Prague, Czech Republic. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(S1):90.

Z. Musova, A. Zumrova, M. Havlovicova, A. Krepelova, A. Boday, J. Kraus, R. Mazanec, S. Krilova, L. Appltova, T. Marikova, M. Vyhnalek, E. Havrdova. Hereditary ataxias - differential diagnosis and comorbidity (poster). *European Human Genetics Conference 2005*, 7. - 10. 5. 2005, Prague, Czech Republic. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(S1):256.

J. Kraus, Z. Musova, R. Mazanec, T. Marikova, A. Boday, M. Havlovicova, M. Malikova, M. Mares, M. Bohm, V. Matousek, A. Krepelova. Molecular analysis of myotonic dystrophies DM1 and DM2 in Czech Republic (poster). *European Human*

Genetics Conference 2005, 7. - 10. 5. 2005, Prague, Czech Republic. Eur J Hum Genet. 2005;13(S1):268.

Z. Mušová, J. Kraus, T. Maříková, M. Malíková, R. Mazanec. Molekulárně-genetická analýza myotonické dystrofie (přednáška). Vědecká konference 2. lékařské fakulty UK, 24. - 25. 5. 2006 Praha.

M. Simandlova, D. Novotna, Z. Musova, M. Havlovicova. 47,XYY male with the fragile X syndrome: rare genetic association (poster). European Human Genetics Conference 2007, 16. - 19. 6. 2007, Nice, France. Eur J Hum Genet. 2007;15(S1):61.

Z. Musova, S. Bendova, K. Pavlikova, P. Hedvicakova, A. Krepelova. Assessment of the Fragile X PCR assay in routine diagnostic practice (poster). European Human Genetics Conference 2007, 16. - 19. 6. 2007, Nice, France. Eur J Hum Genet. 2007;15(S1):134-135.

Z. Mušová. Současný pohled na syndrom fragilního X chromozomu (přednáška). Odborný seminář ÚBLG, 2.LF UK, 15. 4. 2008.

Z. Mušová, R. Mazanec. Molekulárně-genetická analýza myotonické dystrofie (přednáška). Neuromuskulární kongres, 23. - 24. 5. 2008, Brno.

A. Vazna, Z. Musova, D. Novotna, M. Vlckova, M. Havlovicova, Z. Sedlacek. Fragile X syndrome and Xp deletion in a girl with autism and mental retardation (poster). European Human Genetics Conference 2008, 31. 5. - 3. 6. 2008, Barcelona, Spain. Eur J Hum Genet. 2008;16(S2):57.

A. Vážna, Z. Mušová, D. Novotná, M. Vlčková, Z. Vlčková, M. Havlovicová, Z. Sedláček. Syndróm fragilného X chromozomu a delécia Xp u pacientky s autizmom a mentálnou retardáciou (poster). XIX. Izakovičov memoriál, 3. - 5. 9. 2008, Podbanské, Slovensko.

Z. Mušová, A. Křepelová, R. Jaklová, R. Mazanec, E. Ehler, Z. Sedláček. Zaujímavé nálezy u myotonické dystrofie (přednáška). XIX. Izakovičov memoriál, 3. - 5. 9. 2008, Podbanské, Slovensko.

Z. Mušová, Křepelová A., Mazanec R., Ehler E., Jaklová R., Sedláček Z. Nález přerušení CTG repetície u myotonické dystrofie typu 1 (přednáška). 12. Celostátní konference DNA diagnostiky, 27. - 28. 11. 2008, Brno.

Z. Mušová. Diagnostika trinukleotidových expanzí a fragilního chromozomu X (přednáška). Kurz IPVZ 12. 3. 2009, Praha.

Z. Mušová, R. Mazanec, E. Ehler, Z. Sedláček. Molekulární analýza myotonické dystrofie (poster). XX. Izakovičov memoriál, 8. - 9. 10. 2009, Terchová, Slovensko.

Z. Mušová. Molekulární diagnostika myotonické dystrofie (přednáška). Kurz IPVZ 18. 11. 2009, Praha.