

JOLANTA KWIATKOWSKA¹, DOBRAWA LISIECKA¹,
RYSZARD SŁOMSKI^{1, 2}, BARBARA SIEMIENIAKO²,
JADWIGA SOWIŃSKA³, BOŻENA GALAS-ZGORZALEWICZ³,
EWA EMICH-WIDERA⁴, ELŻBIETA MARSZAŁ⁴, TADEUSZ CIESIELSKI⁵

¹Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

³Klinika Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej w Poznaniu

⁴II Klinika Pediatrii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

⁵Oddział Neurologiczny Szpitala Wojewódzkiego w Olsztynie

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A/BECKERA

WSTĘP

Analiza DNA pacjentów i ich rodzin umożliwia obecnie dla wielu przypadków pełną diagnostykę choroby genetycznej. Liczbę monogenowych chorób genetycznych człowieka szacuje się na ponad 3000 i dla wielu z nich jest znane tylko zaburzenie na poziomie biochemicznym. Już w 1861 i 1868 roku Duchenne opisał po raz pierwszy chorobę, nazwaną później dystrofią mięśniową Duchenne'a. Pierwsze doniesienia o chorobie były, jak na ówczesne lata, bardzo nowoczesne — zawierały dokładne opisy kliniczne uzupełnione wynikami badań z zakresu fizjologii i histologii mięśni (DUCHENNE 1861, 1868, GOWERS 1879).

Rozwój nowych technik badawczych w ostatnich latach umożliwił bliższe poznanie molekularnego podłoża dystrofii. W 1986 roku zlokalizowano w prążku Xp21 w chromosomie X gen wywołujący dystrofię (gen *DMD*)*.

Od tej pory rozwój wydarzeń potoczył się w błyskawicznym tempie. W okresie krótszym niż rok wyizolowano gen (MONACO i KUNKEL 1988, KOENIG i współaut. 1987), poznano strukturę cDNA i wykryto białkowy produkt genu, który nazwano dystrofina (HOFFMAN i współaut. 1987, 1988). Technika elektroforezy w zmiennym polu wykazano, że gen *DMD* zawiera 2,5 miliona par zasad (2,5 Mbp), co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X (0,001 genomu człowieka) (DEN DUNNEN i współaut. 1987, 1989). Liczba eksonów genu *DMD* nie jest dokładnie

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 6P 207 109 04.

*Wykaz stosowanych skrótów: CK — kinaza kreatynowa (E.C. 2.7.3.2), BMD — dystrofia mięśniowa typu Beckera, DMD — dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a, PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy, pz — pary zasad, RFLP — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, VNTR — tandemowe powtórzenia o dużej zmienności.

znana, ale przyjmuje się, że jest ich ponad 78. Eksony są przedzielone intronami o średniej wielkości 35 kb (KOENIG i współaut. 1987, VAN OMMEN i współaut. 1987). cDNA dystrofiny jest stosunkowo mały, złożony z 13 973 nukleotydów, z czego pierwsze 11 336 nukleotydów koduje białko, a reszta stanowi region nie ulegający translacji (KOENIG i współaut. 1988, 1989).

Dystrofina kodowana przez gen *DMD* jest dużym białkiem, o masie 427 kDa zbudowanym z 3685 aminokwasów i jest białkiem mocno konserwatywnym, szczególnie na końcu karboksylowym. Na przekrojach podłużnych i poprzecznych preparatów mikroskopowych włókien mięśniowych zaobserwowano, że dystrofina występuje w sarkolemnie, w postaci cienkiej, nieprzerwanej warstwy.

Dystrofie mięśniowe są zaliczane do najczęstszych chorób genetycznych. W oparciu o dane kliniczne i genetyczne wyodrębniono dystrofie sprzężone z chromosomem X (DMD, dystrofia Duchenne'a, BMD, dystrofia Beckera oraz dystrofia Emery-Dreifuss'a), dystrofie dziedziczone jako autosomalne cechy recesywne (np. dystrofia obřęczowo-kończynowa) i jako autosomalne cechy dominujące (np. dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramieniowa i dystrofia miotoniczna) (HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ 1992, ZAREMBA 1992). DMD jest chorobą letalną, występującą z częstością 1/3500 noworodków płci męskiej (EMERY 1991) i w 1/3 przypadków jest następstwem nowych, sporadycznych mutacji (MOSER 1984). BMD występuje z około 10-krotnie mniejszą częstością. Jako mutacje najczęściej występujące w locus DMD/BMD stwierdzono delecje; stanowią one 60%–65% wszystkich mutacji (KOENIG i współaut. 1987, DEN DUNNEN i współaut. 1987, FORREST i współaut. 1987, DARRAS i współaut. 1988, GILLARD i współaut. 1989) i często obejmują duże fragmenty genu. Duplikacje w locus DMD/BMD wykazano u około 5% pacjentów; obejmują one zarówno sekwencje wewnątrzgenowe, jak i położone w bezpośrednim sąsiedztwie genu. Pozostałe mutacje (około 30%) to prawdopodobnie mutacje punktowe. Zarówno delecje, jak i duplikacje oraz mutacje punktowe prowadzą do zmian w strukturze dystrofiny i w rezultacie do zaburzeń funkcji tego białka.

Współczesna diagnostyka chorób nerwowo-mięśniowych powinna uwzględniać wyniki badań klinicznych, biochemicznych i molekularnych. W wielu krajach u chorych z klinicznymi objawami dystrofii Duchenne'a lub Beckera i wykazujących podwyższoną aktywność kinazy kreatynowej wykonuje się już rutynowo badania molekularne. W naszym kraju badania molekularne są wykonywane w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN (Poznań), Instytucie Psychiatrii i Neurologii (Warszawa) i Centrum Zdrowia Dziecka (Warszawa). Materiałem do badań może być genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej, z fibroblastów lub kosmków łożyska, a w przypadku diagnostyki prenatalnej z fibroblastów płodu. Podstawową metodą badawczą zmian strukturalnych genu dystrofiny była do niedawna hybrydyzacja genomowego DNA pacjentów z radioaktywnymi sondami molekularnymi. Nowszą metodą wykrywania delecji jest amplifikacja *in vitro* (PCR) eksonów genu *DMD*. Reakcja PCR zrewolucjonizowała diagnostykę DMD i wielu chorób, umożliwiając znacznie szybsze przeprowadzenie analizy i uzyskanie wyniku bez konieczności stosowania radioizotopów.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wdrożenia diagnostyki molekularnej DMD, poznania częstości delecji i regionów najbardziej podatnych na delecje u badanych chorych oraz analizy transkryptów genu *DMD*.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były DNA i RNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej pacjentów kierowanych do Zakładu Genetyki Człowieka z Kliniki Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej w Poznaniu, Wojewódzkiej Poradni Neurologii Dziecięcej w Olsztynie i Kliniki Neurologii Akademii Medycznej w Katowicach. Ponadto 20 prób DNA otrzymano z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Ogółem wykonano badania u 60 chorych. DNA izolowano z 10 ml krwi obwodowej metodą MILLERA (1988).

Primerami w reakcjach PCR typu multiplex i w cDNA-PCR były syntetyczne oligonukleotydy, których sekwencje przedstawiono w pracy NIEMAN-SEYDE i współautorów (1992). DNA każdego z pacjentów poddawano reakcji łańcuchowej polimeryzacji w miejscach szczególnie łańliwych (1987). W jednej reakcji stosowano jednocześnie kilka par primerów. Sekwencje amplifikowano w 50 μ l mieszaniny zawierającej 0,1–0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 1 x w buforze firmy Amersham, i 25 pmoli każdego z primerów. Na próbki nawarstwiano 30 μ l oleju parafinowego. Po denaturacji DNA przez 7 min w 95°C dodawano do każdej z prób 2,5 jedn. polimerazy (z firmy, z której pochodził bufor) i przeprowadzano 30–35 cykli reakcji. Produkty PCR badano metodą elektroforezy w 1,5% żelach agarozowych.

Sekwencje regionów pERT87-15 i pERT87-8, wykazujących naturalny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, amplifikowano w trzech reakcjach PCR. Mieszanina reakcyjna (50 μ l) zawierała 0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 10% DMSO, 1 x w buforze firmy Amersham i 30 pmoli każdego z primerów: XmnI — P1, P2, BamHI — P1, P2 i TagI — P1, P2. Po amplifikacji 1/10 objętości mieszaniny reakcyjnej sprawdzano metodą elektroforezy w 1,8% żelach agarozowych. Następnie produkty poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Do trawienia pobierano 8 μ l mieszaniny reakcyjnej po amplifikacji, 8 μ l H₂O, 2 μ l buforu do trawienia oraz od 5–10 jednostek enzymu restrykcyjnego.

Sekwencje minisatelitarne locus DXS52 amplifikowano w 50 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 30 pM primera DXS52F, 30 pM primera DXS52R, 1 x w buforze firmy Amersham. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym.

RNA izolowano metodą CHOMCZYNSKIEGO i SACCHI'EGO (1987) z własnymi modyfikacjami. Do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA limfocytów pobierano 5–20 μ g całkowitego, komórkowego RNA i 200 ng primera specyficznego dla genu DMD (ROBERTS i współaut. 1990).

WYNIKI

Badanie DNA wykonano łącznie dla 60 osób, w tym 26 rodzin. DNA probanda był dostępny do badań w 58 przypadkach DMD i w 2 przypadkach BMD. Dla 20 pacjentów uzyskano informację o rozmiarach delecji określonych techniką Southern blotting w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. W tabeli 1 przedstawiono informacje o chorych kierowanych na badania.

Tabela 1

Informacje o pacjentach skierowanych na badania DNA do Zakładu Genetyki Człowieka PAN

Nr DNA	Inicjały	Rok urodzenia	Ośrodek	Rozpoznanie
1001	P.A.	NU	Poznań	NU
1002	J.A.	NU	Poznań	NU
1003	S.R.	NU	Poznań	NU
1004	K.P.	NU	Poznań	NU
1005	M.B.	1985	Poznań	DMD
1006	K.K.	1985	Poznań	DMD
1007	Z.K.	1983	Poznań	DMD
1008	S.K.	1982	Poznań	DMD
1009	B.P.	1977	Poznań	DMD
1010	B.W.	1978	Poznań	DMD
1011	B.M.	1979	Poznań	DMD
1012	N.M.	1986	Poznań	DMD
1013	D.G.	NU	Warszawa	DMD
1014	H.R.	NU	Warszawa	DMD
1015	K.J.	NU	Warszawa	DMD
1016	M.P.	NU	Warszawa	DMD
1017	M.B.	NU	Warszawa	DMD
1018	P.A.	NU	Warszawa	DMD
1019	R.J.	NU	Warszawa	DMD
1020	S.M.	NU	Warszawa	DMD
1021	Z.M.	NU	Warszawa	DMD
1022	Z.G.	NU	Warszawa	DMD
1023	D.J.	1977	Poznań	DMD
1024	D.G.	1976	Poznań	DMD
1025	J.M.	1975	Poznań	DMD
1026	G.D.	1980	Poznań	DMD
1027	B.A.	NU	Warszawa	DMD
1028	D.K.	NU	Warszawa	DMD
1029	H.S.	NU	Warszawa	DMD
1030	K.G.	NU	Warszawa	DMD
1031	K.L.	NU	Warszawa	DMD
1032	M.G.	NU	Warszawa	DMD
1033	M.L.	NU	Warszawa	DMD
1034	P.M.	NU	Warszawa	DMD
1035	S.A.	NU	Warszawa	DMD
1036	U.R.	NU	Warszawa	DMD
1037	T.M.	1079	Olsztyn	NU
1038	B.D.	1973	Olsztyn	NU

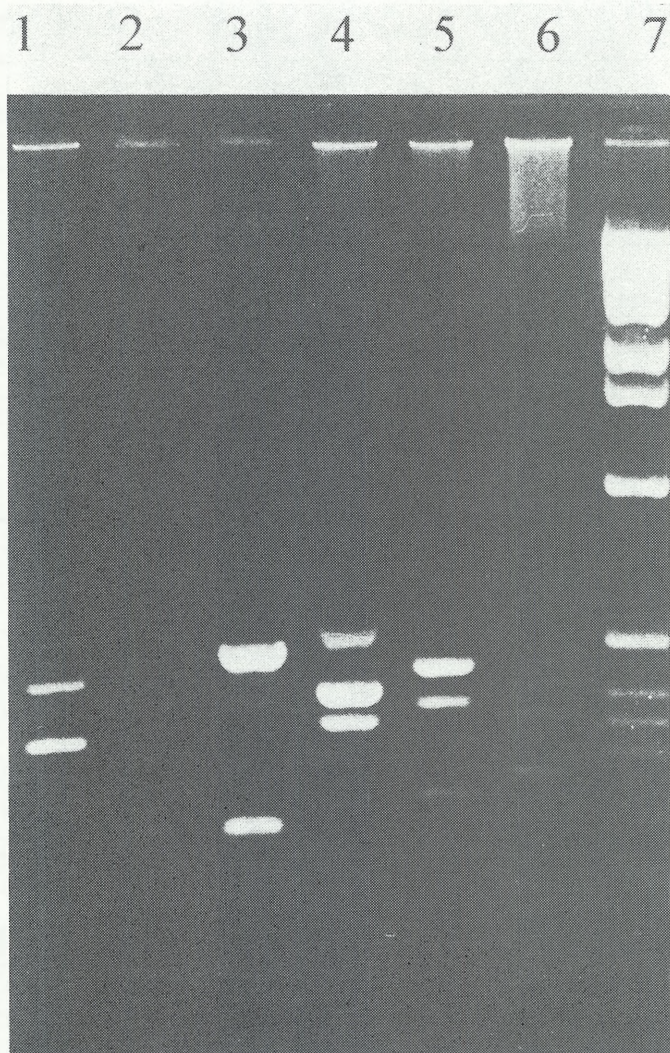
Tabela 1 (ciąg dalszy)

Nr DNA	Inicjały	Rok urodzenia	Ośrodek	Rozpoznanie
1039	L.M.	1977	Olsztyn	NU
1040	W.L.	1981	Olsztyn	NU
1041	G.M.	1979	Poznań	DMD
1042	K.P.	1981	Poznań	DMD
1043	S.M.	1985	Poznań	DMD
1044	K.G.	NU	Poznań	DMD
1045	J.R.	NU	Katowice	DMD
1046	D.P.	NU	Poznań	DMD
1047	D.M.	NU	Poznań	DMD
1048	G.L.	1979	Katowice	DMD
1049	D.M.	1979	Katowice	DMD
1050	S.P.	1985	Katowice	DMD
1051	W.J.	1985	Olsztyn	DMD
1051	L.G.	1984	Olsztyn	DMD
1053	B.P.	1984	Katowice	DMD
1054	K.R.	1986	Katowice	DMD
1055	P.L.	1985	Poznań	DMD
1056	S.M.	1986	Katowice	DMD
1058	Z.G.	1987	Katowice	DMD
1059	B.M.	1988	Katowice	DMD
1060	S.W.	1949	Poznań	FSH
1061	K.P.	1988	Poznań	DMD

NU — informacji o pacjencie nie udzielono; DMD — dystrofia mięśniowa Duchenne'a; FSM — dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramienna.

Reakcję PCR typu multiplex wykonano u 60 chorych, przy czym w 7 przypadkach analiza obejmowała również rodziny chorych. W rutynowej analizie DNA pacjentów zastosowano 20 par primerów. Na rycinach od 1–3 przedstawiono warianty wykonywanych reakcji multiplex PCR. Zastosowanie reakcji multiplex w badaniach przesiewowych (screening) genu *DMD* wykazało występowanie mutacji w 22 z 40 (55%) przypadków, skierowanych przez oddziały i kliniki neurologiczne. W reakcji PCR stosowano we wszystkich badanych DNA 20 par primerów obejmujących sekwencje kodujące oraz flankujące nukleotydy intronów. W dwóch przypadkach, dla eksonów 52 i 60 produkty PCR stanowiły wyłącznie sekwencje kodujące. Na rycinie 3 przedstawiono przykłady delecji występujących w badanej grupie pacjentów. W tabeli 2 przedstawiono wyniki molekularnej analizy genu *DMD*. W tabeli 3 zebrano wszystkie 42 delecje i odniesiono je do cDNA dystrofiny.

U 18 z 40 przypadków skierowanych do Zakładu Genetyki Człowieka PAN delecji nie zaobserwowano. Po przebadaniu 60 przypadków okazało się, że 36 delecji wystąpiło w regionie 5' genu, a 5 w regionie 3'. Nie wykazano delecji, które obejmowałyby cały gen dystrofiny, natomiast w 28 przypadkach delecje obejmo-



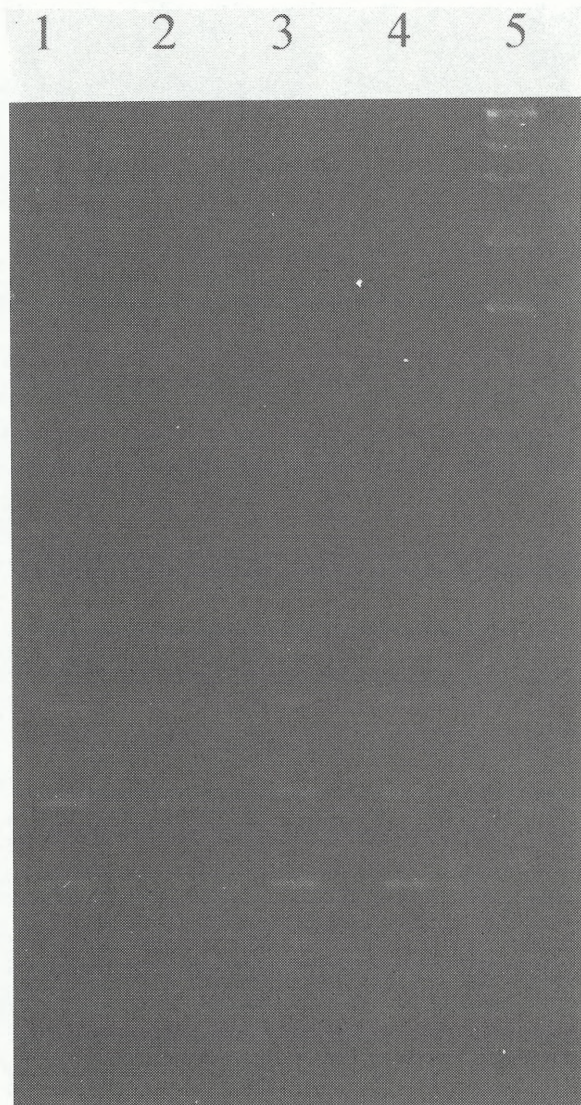
Ryc.1. Reakcja multiplex PCR dla 20 eksonów genu DMD.

Reakcję wykonywano w 1992 roku zastępując rozdzielanie w żelu poliakrylamidowym rozdzielaniem w 1,5% żelu agarozowym o wymiarach 10 x 10 cm. Na żel nakładano 1/5 produktu PCR. Tor 1 — produkty PCR zawierające promotor (535 pz) i eksony 49 (439 pz), 12 (331 pz), 52 (113pz); tor 2 — produkty PCR zawierające eksony: 4 (196 pz), 60 (139pz); tor 3 — produkty PCR zawierające eksony: 48 (506 pz), 50 (271 pz), 6 (202 pz), 46 (140pz); tor 4 — produkty PCR zawierające eksony: 45 (547 pz), 17 (416 pz), 43 (357 pz); tor 5 — produkty PCR zawierające eksony: 19 (459 pz), 51 (388 pz), 13 (238 pz), 47 (181 pz); tor 6 — produkty PCR zawierające eksony: 3 (410 pz), 8 (360 pz), 44 (268 pz); tor 7 — marker wielkości — KBL (GIBCO).

wały więcej niż 1 ekson. Bardzo często delecje rozpoczynały się między eksonem 44 a 45 (33%). Tylko w jednym przypadku stwierdzono delecję eksonu 60. Nie wykazano delecji promotora genu dystrofiny. U pacjentów z delecjami najczęściej dochodziło do usunięcia eksonów 45–50 (30%).

Stosując 20 par primerów ustalono dokładne granice delecji dla 25 z 42 przypadków z delecjami (60%). Włączenie do badań dodatkowej pary primerów dla eksonu 46 pozwoliło na określenie miejsca pęknięć nici DNA u 13 chorych z DMD.

W jednej rodzinie zaobserwowano aberracyjny fragment restrykcyjny stosując blotting Southerna i hybrydyzację z sondą cDNA. Aberracyjny prążek występował u chorego dziecka i jednej z jego sióstr. Druga siostra odziedziczyła prawidłowe fragmenty DNA od obydwu rodziców. Wyniki autoradiografii przedstawiono na rycinie 4.

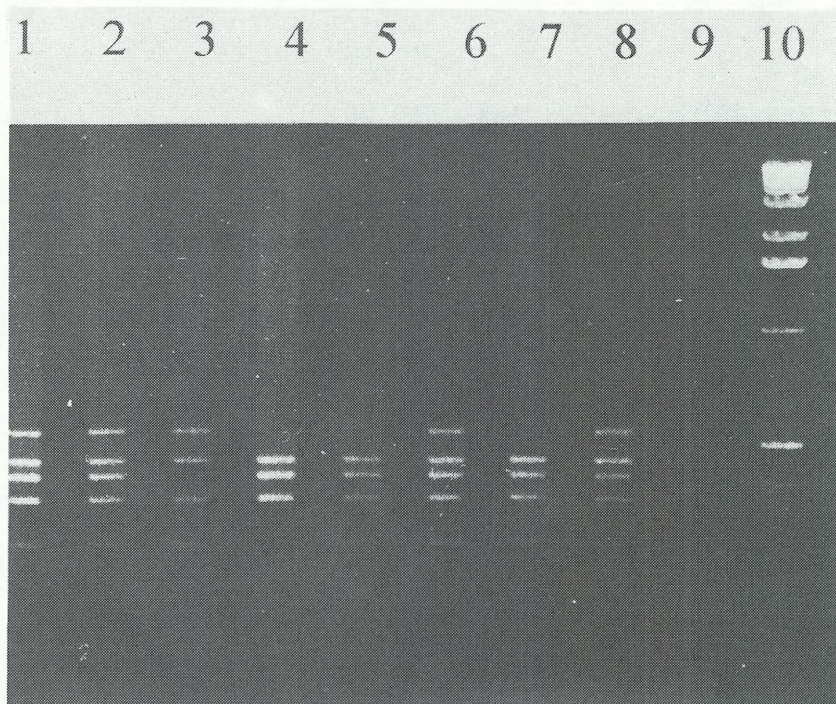


Ryc. 2. Reakcja multiplex PCR dla 17 eksonów w dwóch mieszaninach reakcyjnych.

Reakcję wykonywano w 1993 roku. 1/5 mieszaniny reakcyjnej nakładano na żele zawierające mieszaninę agarozy i hydroksyetylocelulozy (0,8% agarozą, 1% HEC), o wymiarach 10 x 10 cm. Rozdział prowadzono w buforze TBE. Tor 1 — kontrolny DNA; tor 2 — DNA pacjenta 1057; tor 3 — kontrolny DNA; tor 4 — DNA pacjenta 1058; tor 5 — marker wielkości KBL (GIBCO).

W 25 z 42 przypadków z delecjami analiza multiplex PCR pozwoliła na dokładne oznaczenie eksonów, które uległy delecji i jednoczesne określenie powstałych w ten sposób aberracyjnych cDNA. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Poznanie miejsc złamań DNA było przydatne również do określenia nosicielstwa wykonywanego później na podstawie badań RNA, gdyż umożliwiło dobór primerów zarówno do syntezy cDNA, jak i dalszych reakcji PCR. Na dokładne określenie delecji wpłynęło również włączenie do analizy oznaczania eksonu 46.

Z 25 przypadków, dla których oznaczono rozmiar delecji 21 (86%) było zgodne z hipotezą Monaco dotyczącą przesunięcia ramy odczytu w DMD. Z kolei dla 10 przypadków możliwe było poznanie tylko jednego z końców delecji, przy czym te wszystkie przypadki obejmowały określenie 5' końca delecji. W 27 przypadkach



Ryc. 3. Wykrywanie delecji genu *DMD* u pacjentów z dystrofią mięśniową.

Reakcję wykonywano dla 5 eksonów: 45 (547 pz), 19 (459 pz), 17 (416 pz), 8 (360 pz), 44 (268 pz). Nakładano 1/5 produktu PCR i rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym 10 x 10 cm w buforze TBE przy napięciu 70 V. Tor 1 — DNA pacjenta 1001; tor 2 — DNA pacjenta 1002; tor 3 — DNA pacjenta 1005 (delecja eksonu 17); tor 4 — DNA pacjenta 1006 (delecja eksonów 44 i 45); tor 5 — DNA pacjenta 1007 (delecja eksonu 45); tor 6 — DNA pacjenta 1009; tor 7 — DNA pacjenta 1008 (delecja eksonu 45); tor 8 — kontrola pozytywna; tor 9 — kontrola negatywna; tor 10 — marker wielkości KBL (GIBCO).

określono 5' i 3' koniec delecji. Po uwzględnieniu przypadków, dla których poznano obydwa końce delecji lub jeden z końców, pozostało jeszcze 5 przypadków o nie ustalonych miejscach początku i końca delecji.

Analizę transkryptów genu *DMD* wykonano u 8 chorych. Ze względu na ograniczenia materiałowe i na złożoność metod badania były ograniczone dla regionu obejmującego eksony 43–55. Rycina 5 przedstawia analizę transkryptu genu *DMD*, wskazującą na powstanie mutacji *de novo*.

Nosicielstwo nieprawidłowego allelu w grupie rodzin, w których wykazano delecje w genie *DMD* określano stosując reakcję PCR-RFLP. W pierwszym etapie amplifikowano polimorficzny region pERT genu *DMD*, po czym produkty PCR trawiono enzymem restrykcyjnym, rozpoznającym polimorfizm alleli. Produkty PCR z regionu pERT 87-8 trawiono restryktazą *TagI*, z regionu pERT 87-15 restryktazą *XmnI* lub *BamHI* (ryc. 6). Określenie nosicielstwa przeprowadzono dla 7 rodzin. W 5 przypadkach wykazano, że siostry chorych są nosicielkami nieprawidłowego genu. U jednej z analizowanych rodzin (5 osób) wykazano, że obydwie siostry odziedziczyły zmutowany allel. Wielkość analizowanych pro-

Tabela 2

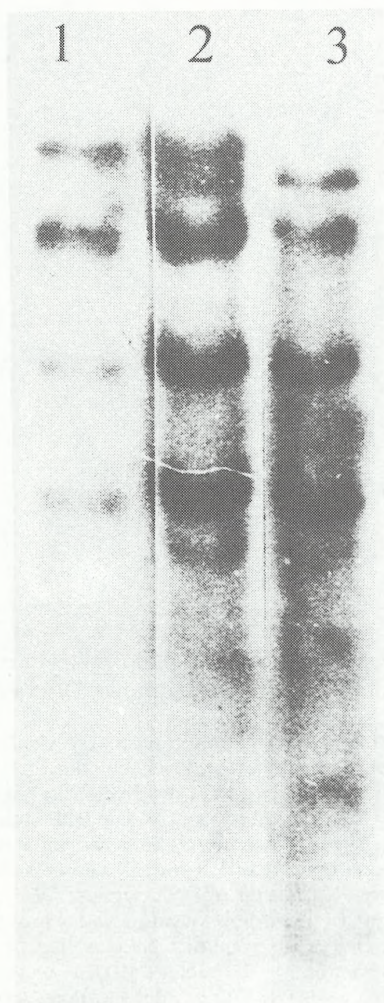
Minimalna wielkość delecji genu *DMD* u pacjentów skierowanych na badania
DNA w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

Primery wg Chamberlaina (litery) Primery wg Beggsa (liczby) Rozpoznanie

PCR	1	2	I	3	A	G	4	B	C	5	D	E	11	6	F	7	8	H	9	10	
Eksony	P	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	60	
Delecji nie wykryto																					
1001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1038	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1043	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1049	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1051	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1052	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1056	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1058	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
Delecja jednego eksonu																					
1023	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1024	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1037	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1005	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1027	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1018	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	DMD
1026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	DMD

Tabela 2 (ciąg dalszy)

Primery wg Chamberlaina (litery)											Primery wg Beggsa (liczby)											Rozpoznanie	
PCR	1	2	I	3	A	G	4	B	C	5	D	E	11	6	F	7	8	H	9	10			
Eksony	P	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	60			
Delecja dwóch eksonów																							
1019	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	DMD		
1021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	DMD		
1033	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	DMD		
Delecja trzech eksonów																							
BMD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	BMD		
BMD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	BMD		
1028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	DMD		
1032	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	DMD		
Delecja czterech eksonów																							
1015	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	DMD		
1029	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	DMD		
1040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+			
1020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	DMD		
1016	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	DMD		
1030	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	DMD		
1031	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	DMD		
1034	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	DMD		
Delecja pięciu eksonów																							
1006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	DMD		
1042	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	DMD		
1036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	DMD		
Delecja sześciu eksonów																							
1007	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	DMD		
1047	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	DMD		
1022	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	DMD		
1050	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	DMD		
Delecja siedmiu eksonów																							
1044	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	DMD		
Delecja ośmiu eksonów																							
1039	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
1045	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	DMD		
1017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	DMD		
Delecja dziewięciu eksonów																							
1035	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	DMD		

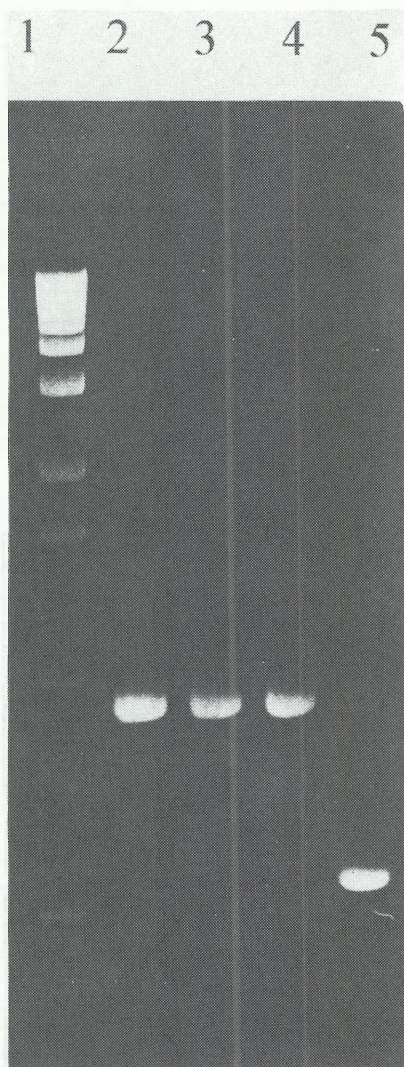


Ryc. 4. Aberracyjny fragment DNA występujący w rodzinie z DMD.

Genomowy DNA pacjenta i dwóch jego siostr trawiono enzymem restrykcyjnym HindIII, rozdzielano elektroforetycznie i hybrydyzowano według Southerna z sondą cDNAIII (4–5a). Tor 1 — siostra 1 pacjenta; tor 2 — siostra 2 pacjenta; tor 3 — pacjent z DMD. Z połączonych obliczeń wartości dla kinazy kreatynowej i położenia prążków hybrydyzacyjnych obliczono ryzyko wystąpienia DMD w badanej rodzinie, stosując program statystyczny „Linkage”. Zakładając, że u matki wystąpiła mutacja de novo ryzyko wystąpienia nosicielstwa DMD u siostry 1 wynosi 0,9%, a u siostry 2 — 86%. Zakładając, że ta mutacja jest przypadkiem rodzinnym, dla siostry 1 ryzyko nosicielstwa wynosi 1, a u siostry 2 — 99%.

Tabela 3
Rozkład delecji genu DMD u pacjentów skierowanych na badania DNA w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

Delecja eksonu	Liczba przypadków
Nie wykryto	20
2	2
4	1
17	1
44	1
45	5
46	1
49	1
50	1
47–48	1
49–50	2
45–47	2
48–50	2
45–48	2
46–49	1
47–50	1
49–52	4
44–48	1
46–50	1
48–52	1
45–50	2
46–51	1
47–52	1
46–52	1
3–19	1
45–52	1
46–60	1
44–52	1



Ryc. 5. Mutacja *de novo* wykryta u pacjenta z dystrofią mięśniową Duchenne'a.

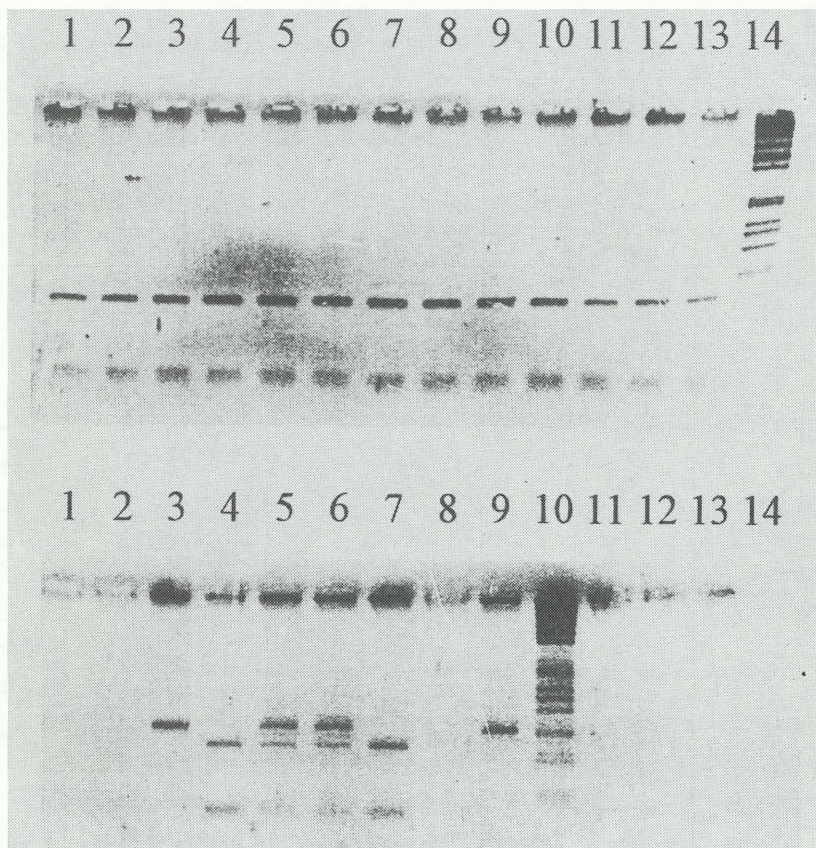
Syntezę cDNA wykonana na matrycy całkowitego mRNA z limfocytów krwi obwodowej. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono dla regionu 3' genu DMD. W pierwszej rundzie PCR stosowano primery dla eksonów 43 i 55, a w drugiej rundzie dla eksonów 44 i 51. Prawidłowa wielkość fragmentu transkryptu DNA wynosi 959 zasad. Fragment prawidłowy występował w próbce kontrolnej (tor 2), u matki pacjenta (tor 3) i ojca pacjenta (tor 4). U pacjenta (1028) występował prążek wielkości 562 pz z delecją eksonów 48-50 (tor 5). Tor 1, marker wielkości — KBL (GIBCO).

duktów PCR, wielkość fragmentów uzyskanych po działaniu enzymem restrykcyjnym oraz genotypy badanych osób przedstawiono w tabeli 4. Z tabeli wynika, że najbardziej informatywne było stosowanie polimorfizmu Tag I w regionie pERT 87.-8, dlatego obecnie ustalanie nosicielstwa rozpoczyna się od tego regionu. Na 7 ocenianych rodzin 6 informatywnych wyników uzyskano poprzez analizę regionu pERT 87.-8. Przy ustalaniu nosicielstwa można również korzystać z analizy techniką Southerna. Przykład takiej analizy przedstawiono w części dotyczącej aberracyjnego fragmentu genu DMD. Techniką uzupełniającą ustalanie nosicielstwa może być analiza minisatelitarnych regionów chromosomu X. Wyniki analizy locus DXS52 przedstawiono w tabeli 4 i na rycinie 7.

Tabela 4

Analiza regionu pERT genu *DMD* i locus DXS52 w rodzinach z dystrofią mięśniową Duchenne'a

Lp.	Nr rodziny	Analiza pERT			Analiza VNTR
		BamHI prod. 226 pz allel 1: 216/10 pz allel 2: 166/50/10 pz	XmnI prod. 740 pz allel 1: 730/10 pz allel 2: 520/210/10 pz	TagI prod. 155pz allel 1: 145/10pz allel 2: 74/71/10 pz	DXS52 700-3000 pz
1.	1006	n.i.	2	n.i.	
	1006.1		1		
	1006.2		2/2		
	1006.3		1/2		
2.	1007	n.i.	n.i.	2	3
	1007.1			1	1
	1007.2			1/2	2/3
	1007.3			1/2	1/2
3.	1008	n.i.	n.i.	1	1
	1008.1			1	2
	1008.2			1/2	1/3
	1008.3			1/2	1/2
	1008.4			1/2	1/2
4.	1037	1	1	1	
	1037.1	2	2	2	
	1037.2	1/2	1/2	1/2	
	1037.3	1/2	1/2	1/2	
5.	1044	n.d.	n.d.	1	
	1044.1			2	
	1044.2			1/2	
	1044.3			1/2	
	1044.4			2	
6.	1045	n.d.	2	n.d.	
	1045.1		2		
	1045.2		1/2		
	1045.3		1/2		
7.	1055	n.d.	n.d.	2	
	1055.1			2	
	1055.2			1/2	
	1055.3			1/2	
	1055.4			2	

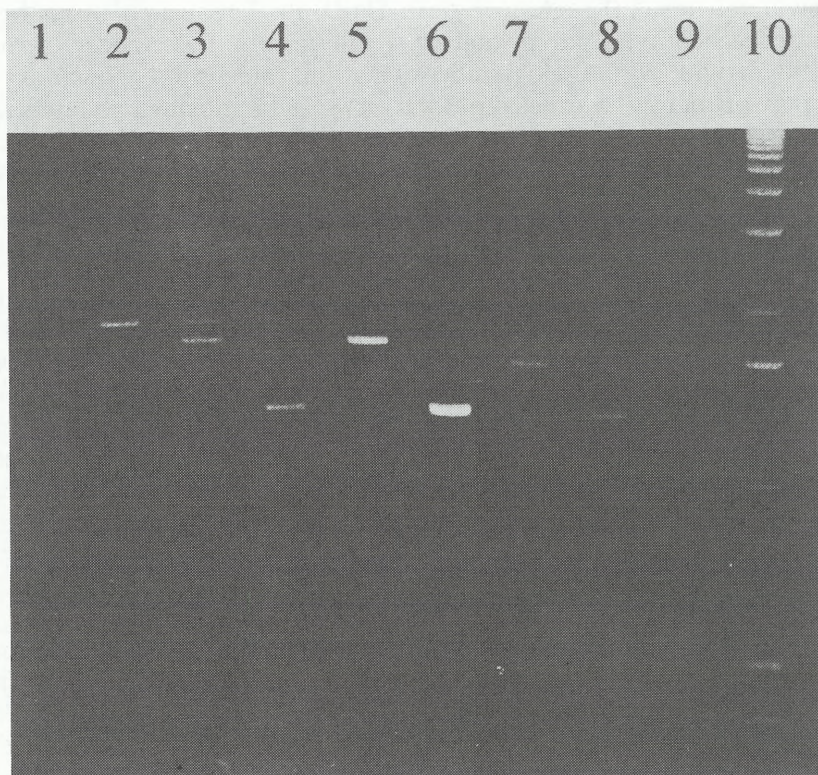


Ryc. 6. Wykrywanie nosicielstwa DMD z wykorzystaniem naturalnego polimorfizmu regionu pERT 87.15-BamHI.

DNA pacjentów i ich rodzin poddano amplifikacji obejmującej fragment regionu pERT genu *DMD*. Warunki reakcji podano w rozdziale *Materiał i metody*. Produkty PCR trawiono restryktazą BamHI i rozdzielano w 6% żelu PAA. Zdjęcie górne — produkt PCR regionu pERT 87.15 o wielkości 216 pz po trawieniu enzymem BamHI. Tor 1–4 — rodzina pacjenta 1006 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tory 5–8 — rodzina pacjenta 1007 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tory 9–13 — rodzina pacjenta 1008 w kolejności: pacjent, ojciec, matka, siostra 1 i siostra 2; tor 14 — marker wielkości — KBL. Zdjęcie dolne — produkt PCR regionu pERT 87.15 o wielkości 216, 166 i 50 pz po trawieniu enzymem BamHI. Tory 3–6 — rodzina pacjenta 1037 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tor 7 — kontrola (DNA z płacenty); tor 8 — kontrola negatywna; tor 9 — kontrola nie trawiona (DNA z płacenty); tor 10 — marker wielkości — KBL (GIBCO); tory 1, 2, 11–14 wolne.

DYSKUSJA

Opracowanie reakcji PCR i jej szybkie rozpowszechnienie się w diagnostyce znalazło swoje odbicie przede wszystkim w badaniach genu *DMD*. Wprowadzenie tej reakcji znacznie skróciło czas wykonywania analizy i jednocześnie skłoniło wiele ośrodków do wprowadzenia nowych wersji reakcji PCR opartych o jedno-



Ryc. 7. Wykrywanie nosicielstwa DMD z wykorzystaniem sekwencji minisatelitarnej locus DXS52.

DNA pacjentów i ich rodzin poddano amplifikacji obejmującej region minisatelitarny DXS52. Warunki reakcji podano w rozdziale Materiały i metody. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. Tor 1–4 — rodzina pacjenta 1008 w kolejności: ojciec, pacjent, siostra i matka; tory 5–8 — rodzina pacjenta 1007 w kolejności: ojciec, pacjent, siostra i matka; tor 9 — kontrola negatywna (bez DNA); tor 10 — marker wielkości — KBL (GIBCO).

czesną amplifikację kilku fragmentów genu *DMD*. To nowatorskie podejście metodyczne zaproponował CHAMBERLAIN dla 6 fragmentów genu *DMD* (1988, 1989). Właściwie co rok ukazywały się prace wzbogacające początkową reakcję multiplex-PCR. W 1991 roku BEGGS i współpracownicy donieśli o osiągnięciu prawie 100% wykrywalności delecji poprzez stosowanie 19 par primerów pokrywających region promotora i dwa podstawowe regiony, w których najczęściej występują delecje. W trakcie realizacji pracy stosowano właściwie wszystkie kombinacje primerów, o których donosiło piśmiennictwo. Powodowało to, że dla wielu próbek DNA analiza była wykonywana kilkakrotnie, aż do pełnego przebadania w 19 regionach. Do badań rutynowych włączono również parę primerów dla eksonu 46, co jeszcze zwiększyło wykrywalność delecji i przyczyniło się do poznania składowania mRNA dystrofiny.

Na podstawie własnych obserwacji należy stwierdzić, że w rutynowych badaniach najlepsze wyniki uzyskuje się wykonując 5 reakcji PCR, w których

amplifikowanych jest 20 regionów genu *DMD*. Przy realizacji niniejszej pracy dobranie poszczególnych par primerów w mieszaniny było trudnym rozwiązaniem metodycznym. Wymagało przede wszystkim takiego zgrupowania poszczególnych par primerów w mieszaninach, aby była możliwa ich jednoczesna amplifikacja, jak i rozdział elektroforetyczny zamplifikowanych fragmentów. Wykonano cały szereg badań, w których zmniejszono lub zwiększono stężenie primerów, aby w końcowym efekcie uzyskać równą intensywność produktów PCR. Z doniesień literaturowych wynika, że jest możliwe wykonanie reakcji multiplex dla genu *DMD* w dwóch reakcjach i analiza w żelu poliakryloamidowym. Własne obserwacje wskazują jednak, że tak zestawione mieszaniny nie nadają się do badań rutynowych. Znacznie dogodniejsze jest proponowane w niniejszej pracy wykonywanie trzech reakcji PCR i rozdział produktów w żelach agarozowych. Uzupełnienie elektroforezy o modyfikowane podłoże zawierające agarozę i celulozę dodatkowo zwiększa rozdzielczość i ułatwia interpretację wyników. Na podstawie własnych wyników stosowanie mieszanin agarozowo-celulozowych jest bardzo przydatne, gdyż w wyniku tak prowadzonej elektroforezy zmniejsza się dyfuzja najmniejszych produktów PCR przy jednoczesnym zwiększeniu rozdzielczości.

W niniejszej pracy delecje genu *DMD* zaobserwowano u 55% pacjentów. Wartość ta różni się nieco od danych literaturowych wskazujących na występowanie delecji u 60% pacjentów. Jest jednak zbliżona do wyników uzyskanych we współpracy w Instytucie Genetyki Człowieka w Getyndze. Wyniki tych badań wskazały, że częstość mutacji w populacji niemieckiej wynosiła 60%. Istotną różnicą jest zaobserwowanie w badanej grupie występowania znacznej liczby mutacji w regionie 3' genu. W regionie tym wystąpiło blisko 85% mutacji. Być może jest to wynik zbyt małej liczby pacjentów chociaż grupy pacjentów *DMD/BMD* liczniejsze niż 50 są zaliczane raczej do dużych grup. Najmniejsze delecje obejmowały tylko jeden ekson i występowały głównie w regionie 3' genu *DMD*, natomiast delecje duże przekraczające kilkanaście eksonów występowały w obydwu podatnych na mutacje regionach genu. Dane literaturowe wskazują, że duże delecje mogą obejmować znaczne regiony genu *DMD* przekraczające nawet połowę genu, jednak nie zaobserwowano dotychczas delecji, które obejmowałyby cały gen.

Z badań przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że za pomocą reakcji multiplex PCR obejmującej 20 eksonów można było ustalić dokładne rozmiary delecji w 60% przypadków, w których stwierdzono delecje. Dla 84% przypadków zaobserwowano zgodność z hipotezą Monaco, zakładającą wystąpienie przesunięć ramki odczytu w przypadkach *DMD*. Dotychczasowe doniesienia literaturowe obejmowały analizę 19 eksonów przy czym zakładano, że wykrywalność delecji jest zbliżona prawie do 100%. W niniejszej pracy włączono do badań zaproponowany przez R. Słomskiego zestaw primerów dla eksonu 46. Włączenie do badań eksonu 46 umożliwiło, jak już wspomniano, poznanie delecji dodatkowo w 13 przypadkach, natomiast ta sama analiza przeprowadzona bez eksonu 46 skuteczna byłaby dla 12 przypadków.

Analiza transkryptów genu *DMD* może być wykonana na materiale biopsyjnym lub w limfocytach krwi obwodowej. Materiał biopsyjny nie jest w przypadkach *DMD* ogólnie dostępny i wymagałby wezwania pacjenta i rodziny celem

dokonania biopsji mięśni. W trakcie realizacji niniejszej pracy pojawiły się doniesienia o możliwościach wykorzystania w celach diagnostycznych zjawiska nieuprawnionej transkrypcji. Najważniejszym warunkiem jest przygotowanie preparatów RNA w taki sposób, aby w dalszych etapach badań mogły być stosowane w reakcji odwrotnej transkrypcji i PCR. Wprawdzie metody izolacji RNA są znane już od wielu lat, jednak w połączeniu z syntezą cDNA nie zawsze można było je analizować. W przypadku genu *DMD* zasadniczym czynnikiem ograniczającym jest wielkość transkryptu przekraczająca 14 kb. Wykorzystując wcześniejsze doświadczenia Słomskiego, izolację RNA prowadzono w ten sposób, aby była ona maksymalnie szybka nawet kosztem czystości preparatu. Odbiałczanie preparatu prowadzono więc jednostopniowo. Stosowana metoda izolacji była na tyle skuteczna, że możliwe było wykonanie reakcji PCR dla całego transkryptu. Zapoczątkowanie syntezy cDNA było przeprowadzone z zastosowaniem specyficznych oligomerów. Próby zastosowania oligo-dT jako startera reakcji zakończyły się niepowodzeniem, choć dla innych nieuprawnionych transkryptów osiągnięto pozytywne rezultaty.

W chorobie genetycznej diagnostyka molekularna dotyczy nie tylko poznania defektu genu, lecz również określenia jego nosicielstwa w badanej rodzinie. W początkowym okresie nie wpływały zgłoszenia na określenie nosicielstwa. Od 1992 roku praktycznie wszystkie rodziny, w których wystąpiło rodzeństwo płci żeńskiej, zgłosiły chęć uzyskania informacji o nosicielstwie. W niniejszej pracy zastosowano jedną z rutynowo stosowanych form ustalania nosicielstwa — RFLP-PCR regionu pERT. W 1989 roku ROBERTS i współpracownicy opisali zastosowanie reakcji PCR do ustalania nosicielstwa. W niniejszej pracy wykorzystano to doniesienie do przygotowania primerów i opracowania własnych warunków reakcji. Najbardziej przydatne okazało się badanie regionu pERT-Tag I, które było informatywne dla 6 z 7 analizowanych rodzin. Z doniesień literaturowych wynika, że w wielu przypadkach wykonanie trzech reakcji dla regionu pERT może nie wyjaśnić nosicielstwa i dlatego w dalszym ciągu poszukuje się nowych rozwiązań, które mogą poprawić ustalanie nosicielstwa. Jednym z możliwych badań będzie oznaczanie sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych wewnątrz genu *DMD*. Z dotychczasowego stanu wiedzy o sekwencjach mikrosatelitarnych wiadomo, że dotyczą one głównie powtórzeń (CA)_n przy wielkości allelu 100–200 pz. Rozdział alleli różniących się tylko jednym powtórzeniem jest możliwy tylko na żelach sekwencyjnych, co stanowi duże utrudnienie w stosowaniu w rutynowej diagnostyce. Zachodzi również konieczność ustalenia ewentualnych sprzężeń między sekwencjami mikrosatelitarnymi, a kodującymi regionami genu *DMD*. Znacznie łatwiejsza wydaje się analiza sekwencji minisatelitarnych, różniących się powtórzeniem motywu o długości kilkudziesięciu nukleotydów. Dla chromosomu człowieka opisano marker ST14 (DXS52) wykonywany głównie w hemofilii. W badaniu tego markera występowały trudności techniczne zgłaszane przez ośrodki zamierzające stosować go rutynowo. W niniejszej pracy opracowano warunki PCR zapewniające powtarzalność wyników. Wyniki własnych badań wskazują, że trudności w innych laboratoriach polegały na zbyt krótkich czasach poszczególnych etapów PCR opublikowanych przez Richardsa. Własne doświadczenia potwierdzają to i dlatego po kilku nieudanych próbach zastosowano własne parametry reakcji PCR i zaobserwo-

wano, że występuje korelacja między wynikami uzyskanymi dla ustalenia nosicielstwa przez badanie regionu pERT i badanie locus DXS52. W świetle uzyskanych wyników potwierdzających polimorfizm tego locus może on być wykorzystany również w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku potomstwa płci żeńskiej.

Badania genu *DMD* nadal trwają i obejmują coraz szerszą grupę zjawisk. Główne kierunki diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a są już sprecyzowane i w najbliższych latach będą obejmować zarówno bezpośrednie badanie genu, jak i produktu genu. Rutynowa analiza będzie rozpoczynać się od próby wykrycia delekcji w genomowym DNA i oceny ekspresji dystrofiny w mięśniu. Najlepszą metodą wykrycia delekcji jest zastosowana w niniejszej pracy metoda PCR dla 20 eksonów. Ocena ekspresji dystrofiny będzie możliwa dwiema metodami — metodą immunofluorescencji z wykorzystaniem przeciwciał przeciw dystrofynie i biopsji mięśnia oraz metodą western blotting, w której etap detekcji dystrofiny przeciwciałem jest poprzedzony frakcjonowaniem w żelu poliakryloamidowym. Bezpośrednia ocena ekspresji dystrofiny wiąże się jednak z pobraniem materiału biopsyjnego. Sytuację komplikuje również wykrywanie coraz to nowych białek należących do dużego kompleksu glikoprotein, które mogą krzyżowo reagować z przeciwciałami. Duże znaczenie w diagnostyce molekularnej dystrofii mięśniowej ma analiza transkryptów genu, która stała się możliwa po wykryciu nieuprawnionej transkrypcji zachodzącej w limfocytach. Ta analiza może być z powodzeniem stosowana nie tylko do wykrywania delekcji lecz również nosicielstwa. Najbardziej kontrowersyjne są poszukiwania innych mutacji niż delekcje, które muszą występować u około 30% pacjentów. Wykrycie pojedynczej mutacji w tak dużym genie jak *DMD* nie musi oznaczać, że powstanie zdefektowane białko. Dotychczas doniesiono o nielicznych mutacjach punktowych, z których w zasadzie tylko takie, które powodują przedwczesną terminację translacji możnaby zaliczyć do uzasadnionych. Na opisane powyżej zjawiska nakłada się alternatywny splicing genu *DMD*, który może powodować, że niektóre mutacje punktowe lub małe delekcje nie zmieniają fenotypu. Badania genu *DMD* są więc nadal kontynuowane i dostarczają coraz to nowych obserwacji o znaczeniu poznawczym i praktycznym.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY

Summary

The main method for detection of deletions which are responsible for approximately 60% of all mutations of *DMD* gene, is multiplex PCR. Deletions were detected mainly in 3' region of *DMD* gene. The smallest deletions involving only 1 exon were detected in 14 patients. The remaining group of deletions was heterogeneous and some of them involved more than 9 exons. With the use of multiplex PCR for 20 regions of *DMD* gene it was possible to establish the precise size of deletions in 60% of the cases with deletions. Approximately in 84% of the analysed cases the results were in agreement with the hypothesis of Monaco. Analysis of RNA was performed for 9 patients and their family members, and one novel mutation was observed. By analysis of polymorphism of *DMD* gene, mutant allele were detected in 7 families.

LITERATURA

- BECKER P. E., KIENER F. 1955. *Eine neue X-chomosome Muskeldystrophie*. Arch. Psychiatr. Neurol. 193, 427–448.
- BEGGS A. H., KOENIG M., BOYCE F. M., KUNKEL L. M., 1990. *Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction*. Hum. Genet. 86, 45–48.
- CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., RANIER J. E., NGUYEN P. N., CASKEY C. T., 1988. *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res. 16, 11141–11156.
- CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., RANIER J. E., CASKEY C. T., 1989. *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy*. W: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (red. INNIS M., GELFAND D., SNINSKI J., WHITE T.). Academic Press, San Diego, 272–281.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162, 156–159.
- DARRAS B. T., BLATTNER P., HARPER J. F., SPIRO A. J., ALTER S., FRANKE U., 1988. *Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: Location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations*. Am. J. Hum. Genet. 43, 620–629.
- DEN DUNNEN J. T., GROOTSCHOLTEN P. M., BAKKER E., BLONDEN L. A. J., GINJAAR H. B., WAPENAAAR M. C., VON PAASSEN H. M. B., VON BROECKHOVEN C., PEARSON P. L., VAN OMMEN G. J. B., 1989. *Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications*. Am. J. Hum. Genet. 45, 835–847.
- DEN DUNNEN J. T., BAKKER E., KLEIN BRETELER E. G., PEARSON P. L., VAN OMMEN G. J. B., 1987. *Direct detection of more than 50% of the DMD-mutation by field inversion gels*. Nature 329, 640–642.
- DUCHENNE G. B. A., 1861. W: *De l'électrisation localisée et son application à la pathologie et à la thérapeutique* (red. BAILLIERE), Paris.
- DUCHENNE G. B. A., 1868. *Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*. Arch. Gen. Med. 11,
- EMERY A. E. H., 1987. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Oxford Monographs in medical genetics, Oxford University Press, Oxford
- EMERY A. E. H., 1991. *Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — a world survey*. Neuromuscular Disorders 1, 19–29.
- FORREST S. M., CROSS G. S., THOMAS N. S. T., HARPER P. S., SMITH T. J., READ A. D., MOUNTFORD R. C., 1987. *Effective strategy for prenatal prediction of Duchenne Becker muscular dystrophies*. Lancet 2, 1294–1297.
- GILLARD E. F., CHAMBERLAIN J. S., MURPHY E. G., DUFF C. L., SMITH B., BURGHES A. H. M., THOMPSON M. W., 1989. *Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene*. Am. J. Hum. Genet. 45, 507–520.
- GOWERS W. R., 1879. W: *Pseudo-hypertrophic muscular paralysis- A clinical lecture* (red. CHURCHILL J. I. A.).
- HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ J., 1992. *Dystrofie mięśniowe postępujące*. Post. Psychiatr. Neurol. 1, 117–124.
- HOFFMAN E. P., BROWN R. H., KUNKEL L. M., 1987. *Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell 51, 919–928.
- HOFFMAN E. P., FISCHBECK K. H., BROWN R. H., JOHNSON M., MEDORI R., LOIKE J. D., HARRIS J. B., WATERSON R., BROOKE M., SPECHT L., KUPSKY W., CHAMBERLAIN J., CASKEY C. T., SHAPIRO F., KUNKEL L. M., 1988. *Dystrophin characterization in muscle biopsies from Duchenne and Becker muscular dystrophy patients*. N. Engl. J. Med. 318, 1363–1368.
- HOFFMAN E. P., HUDECKI M., ROSENBERG P., POLLINA C. M., KUNKEL L. M., 1988. *Cell and fiber-type distribution of dystrophin*. Neuron 1, 411–420.
- KOENIG M., HOFFMAN E. P., BERTELSON C. J., MONACO A. P., FEENER C., KUNKEL L. M., 1987. *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals*. Cell 50, 509–517.
- KOENIG M., BEGGS A. H., MOYER M., SCHERPF S., HEINRICH K., BETTECKEN T., MENG G., MILLER C. R., LINDLF M., KAARIJAINEN H., CHAPPELLE A., KIURU A., SAVONTAUS M. L., GILGENKRANTZ H., RECAN D., CHELLY J., KAPLAN J. C., COVONE A. E., ARCHIDIACONO N., ROMEO G., LIECHTI-GALLATI S., SCHNEIDER V., BRAGA

- S., MOSER H., DARRAS B. T., MURPHY P., FRANCKE U., CHEN J. D., MORGAN G., DENTON M., GREENBERG C. R., WROGEMANN K., BLONDEN L. A. J., VON PAASSEN H. M. B., VON OMMEN G. J. B., KUNKEL L. M., 1989. *The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion*. Am. J. Hum. Genet. 45, 498-506.
- KOENIG M., MONACO A. P., KUNKEL L. M., 1988. *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. Cell 53, 219-228.
- MILLER S. A., DYKES D. D., POLESKY H. F., 1988. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 16, 1215.
- MONACO A. P., KUNKEL L. M., 1988. *Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus*. W: Advances in Human Genetics (red. H. HARRIS, K. HIRSCHORN), vol. 17. New York, Plenum Publishing.
- MONACO A. P., NEVE R. L., COLLETTI-FEENER C., BARTELSON C. J., KURNIT D. M., KUNKEL L. M., 1986. *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene*. Nature 323, 646-650.
- MOSER H. 1984. *Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention*. Hum. Genet. 66, 17-40.
- NIEMANN-SEYDE S., SLOMSKI R., RININSLAND F., ELLERMAYER U., KWIATKOWSKA J., REISS J., 1992. *Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum. Genet. 90, 65-70.
- ROBERTS R. G., COLE C. G., HART K. A., BOBROW M., BENTLEY D. R., 1989. *Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Nucleic Acids Res. 17, 811.
- ROBERTS R. G., BENTLEY D. R., BARBY T. F. M., MANNERS E., BOBROW M., 1990. *Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA*. Lancet 336, 1523-1526.
- SCHLOESSER M., SLOMSKI R., WAGNER M., BERG L. P., KAKKAR V. V., COOPER D. N., REISS J. 1990. *Characterization of pathological dystrophin transcripts from the lymphocytes of a muscular dystrophy carrier*. Mol. Biol. Med. 7, 519-523.
- VAN OMMEN G. J. B., BERTELSEN C., GINJAAR H. B., DEN DUNNEN J. T., BAKKER E., CHELLY J., MATTON M., VAN ESSEN A. J., BARTLEY J., KUNKEL L. M., PEARSON P. L., 1987. *Long range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker*. Genomics 1, 329-336.
- ZAREMBA J., 1992. *Genetyka chorób nerwowo-mięśniowych*. Post. Psychiatr. Neurol. 1, 147-151.