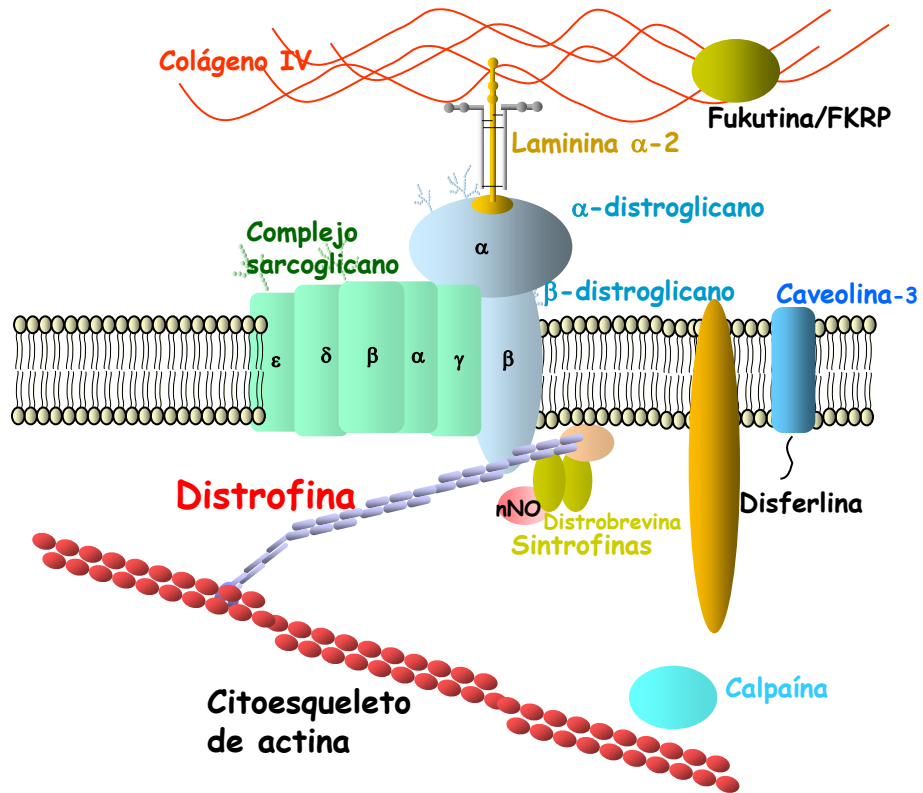


DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA DMD



Pia Gallano
Servicio de Genética
Hospital de Sant Pau
Barcelona

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

Ausencia de distrofina

Afectación clínica grave

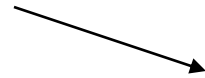
3.500 varones que nacen

DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER (DMB)

Reducción de distrofina

Afectación clínica más benigna

20.000 varones que nacen



Herencia: recesiva ligado al cromosoma X

Gen responsable: **GEN DMD**

- localizado en Xp21
- 79 exones
- DNA genómico: 2300 Kb
- mRNA: 11 Kb
- distrofina: 427 KDa, 3655aa

DIAGNÓSTICO GENÉTICO ¿POR QUÉ?

1. Confirmar el diagnóstico clínico y anatomopatológico de distrofinopatía

- Distinguir las distrofinopatías de otras distrofias musculares
- Permitir el consejo genético
 - ✓ Detección de portadoras
 - ✓ Diagnóstico prenatal / preimplantacional

2. Comprender el defecto molecular

- Pronóstico (correlaciones genotipo/ fenotipo)
- **Herramienta imprescindible para terapias mutación-específicas (PTC124, *exon-skipping*)**

PATOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN *DMD*

Grandes reordenamientos intragénicos

(pérdida o ganancia de uno o más exones) **(70%)**:

- Deleciones (65%)
- Duplicaciones (5%)

Tecnología: *MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

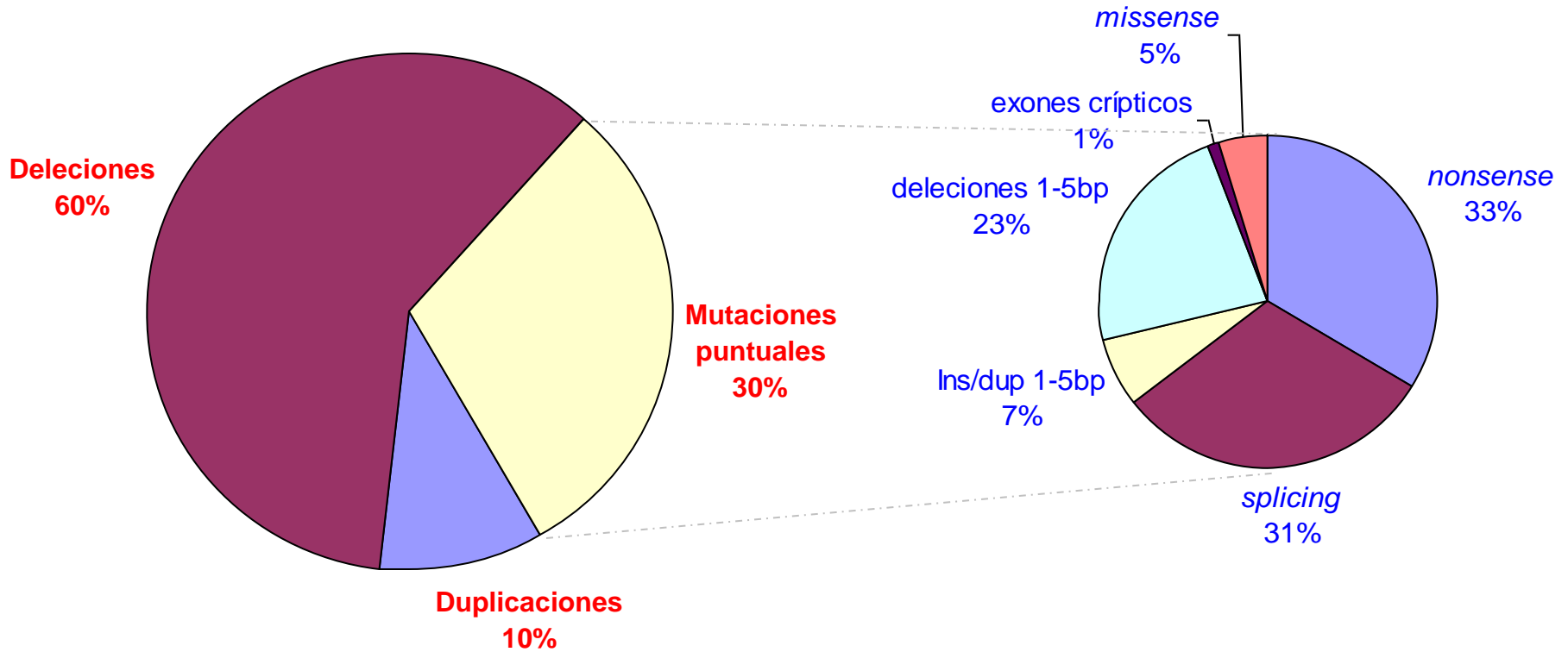
Mutaciones puntuales (alteración de una o pocas bases) **(30%)**:

- Mutaciones *nonsense* (codón de stop prematuro)
- Mutaciones de *splicing* (procesamiento anómalo del mensajero)
- Inserciones / duplicaciones (1-5bp)
- Mutaciones *missense* (cambio de aminoácido)
- Creación exones crípticos

Tecnología: *Secuenciación masiva (NGS): multiplexom DMD, MiSeq Illumina*

PATOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN *DMD*

La mayoría de mutaciones: deleciones o duplicaciones de 1 o más exones (70%)



DIAGNÓSTICO GENÉTICO ¿CÓMO?

La longitud del gen y su complejidad (2,4 Mb y 79 exones) implica un estrategia diagnóstica

1. Grandes reordenamientos intragénicos

(pérdida o ganancia de uno o más exones):

- Deleciones
- Duplicaciones

Cuantificación número de exones

Tecnología: *MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

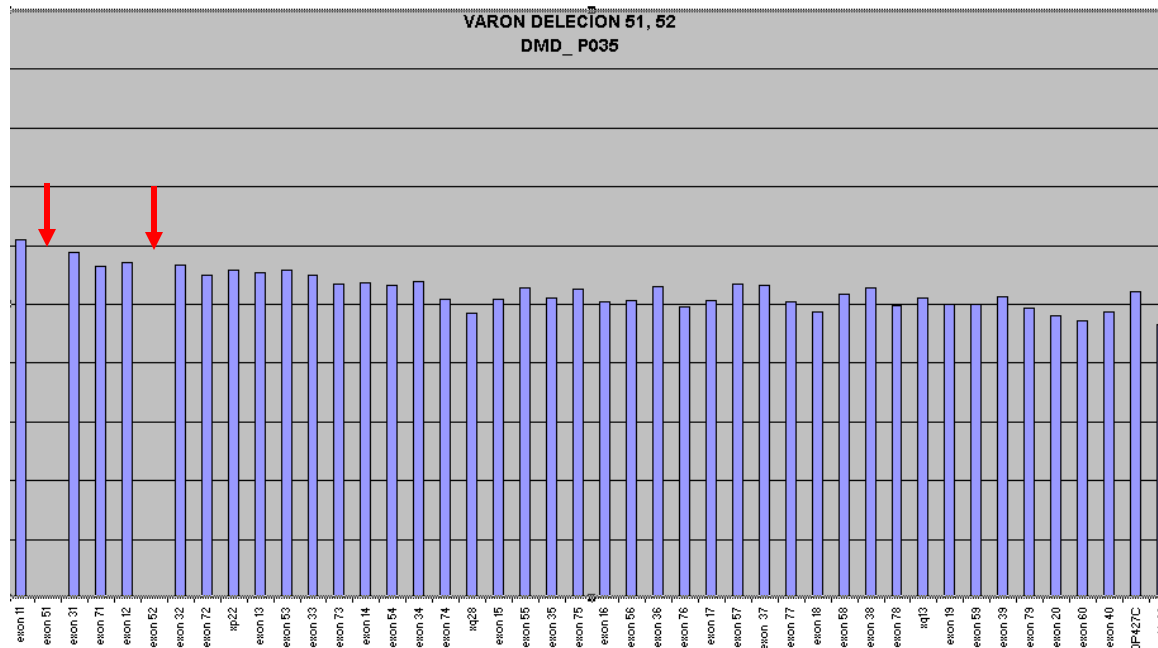
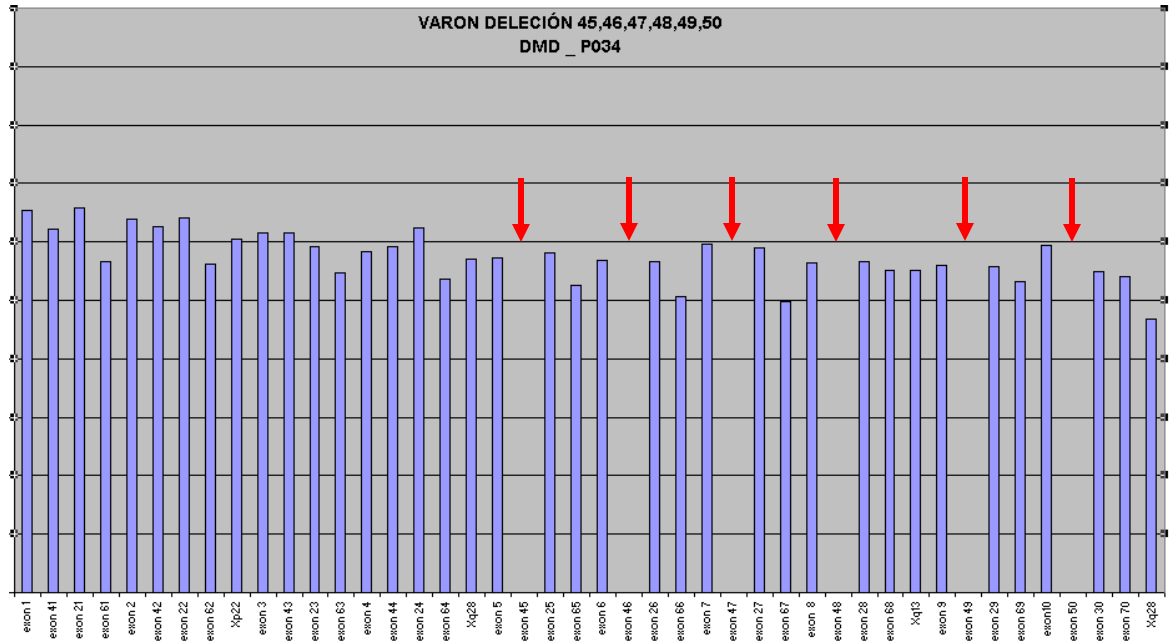
2. Mutaciones puntuales (alteración de una o pocas bases):

- Mutaciones *nonsense* (codón de stop prematuro)
- Mutaciones de *splicing* (procesamiento anómalo del mensajero)
- Inserciones / duplicaciones (1-5bp)
- Mutaciones *missense* (cambio de aminoácido)
- Creación exones crípticos

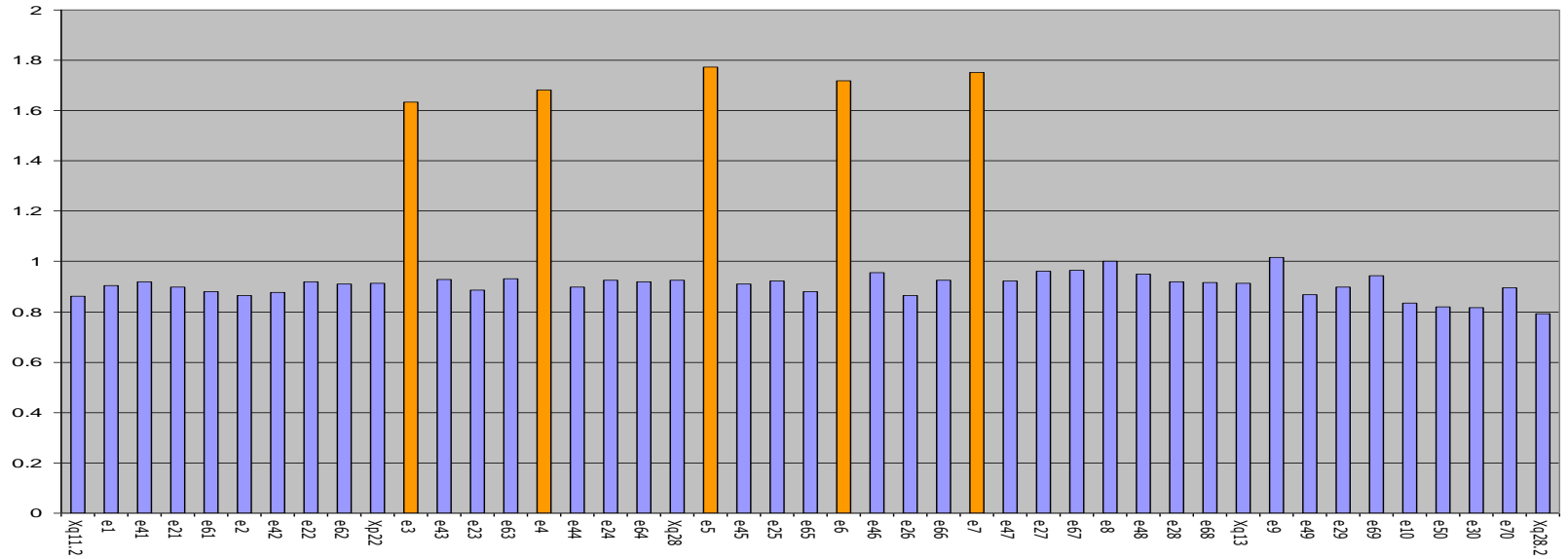
Secuenciación DNA
Secuenciación mRNA

Tecnología: *Secuenciación masiva (NGS): multiplicom DMD, MiSeq Illumina*

ANÁLISIS MLPA: PACIENTE DMD DELECIÓN EXONES 45>52 (Frameshift)

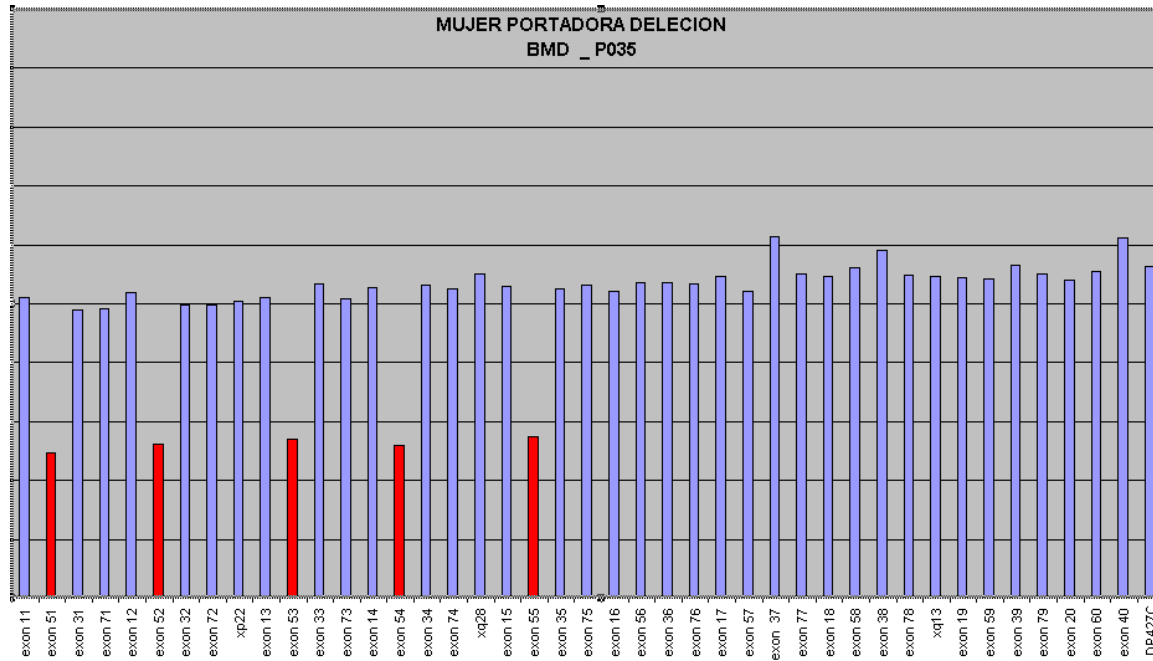
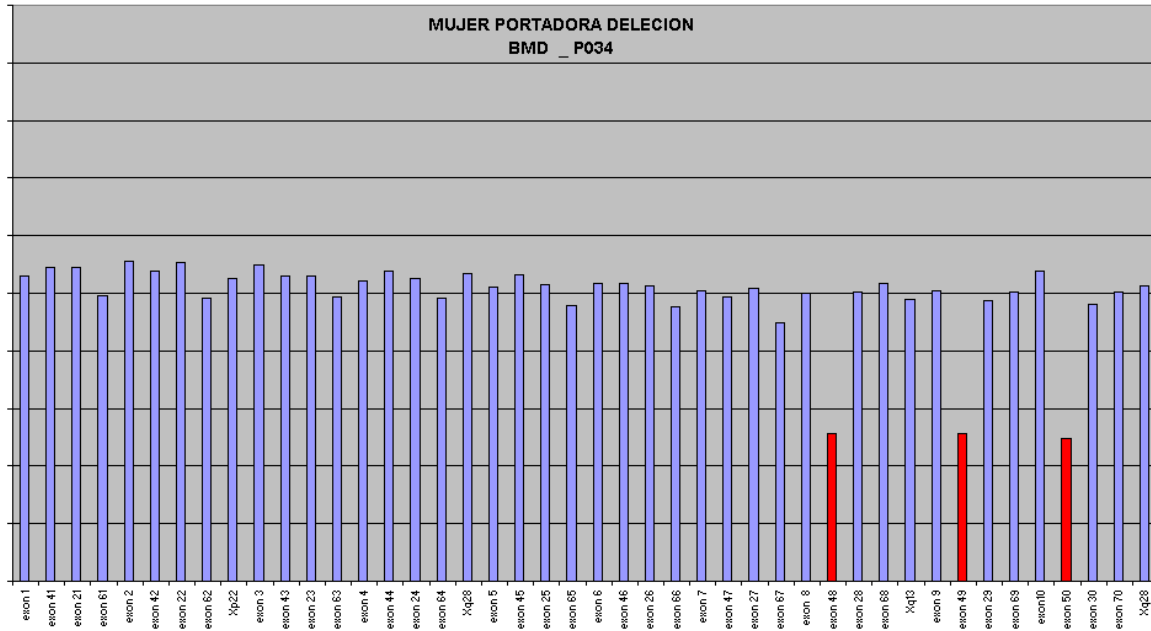


ANÁLISIS MLPA: PACIENTE DMD (Frameshift)

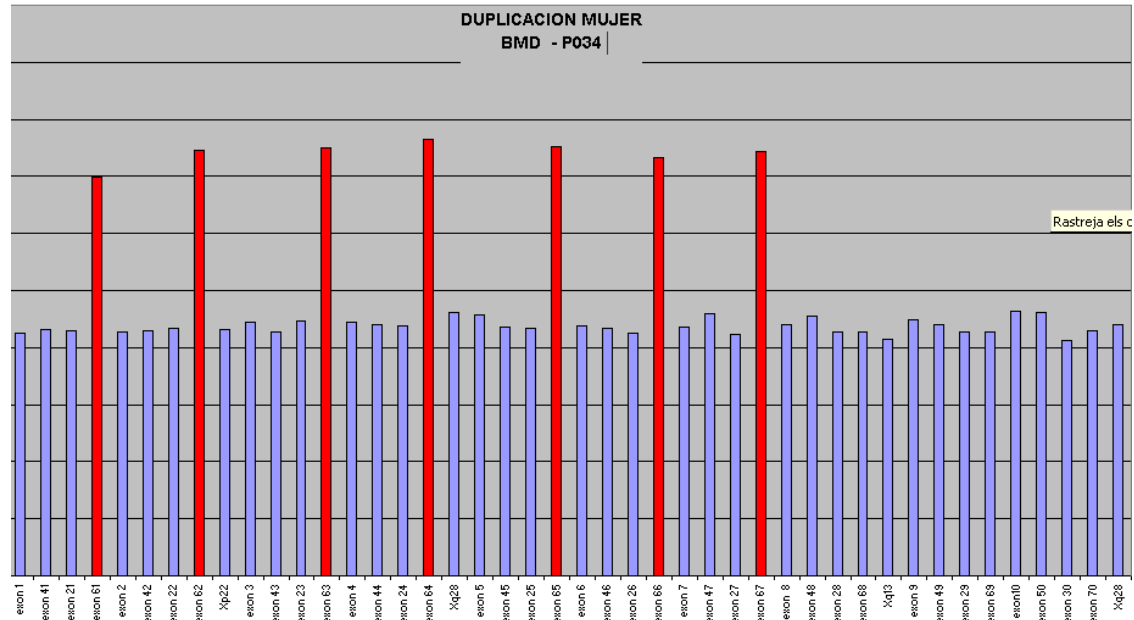
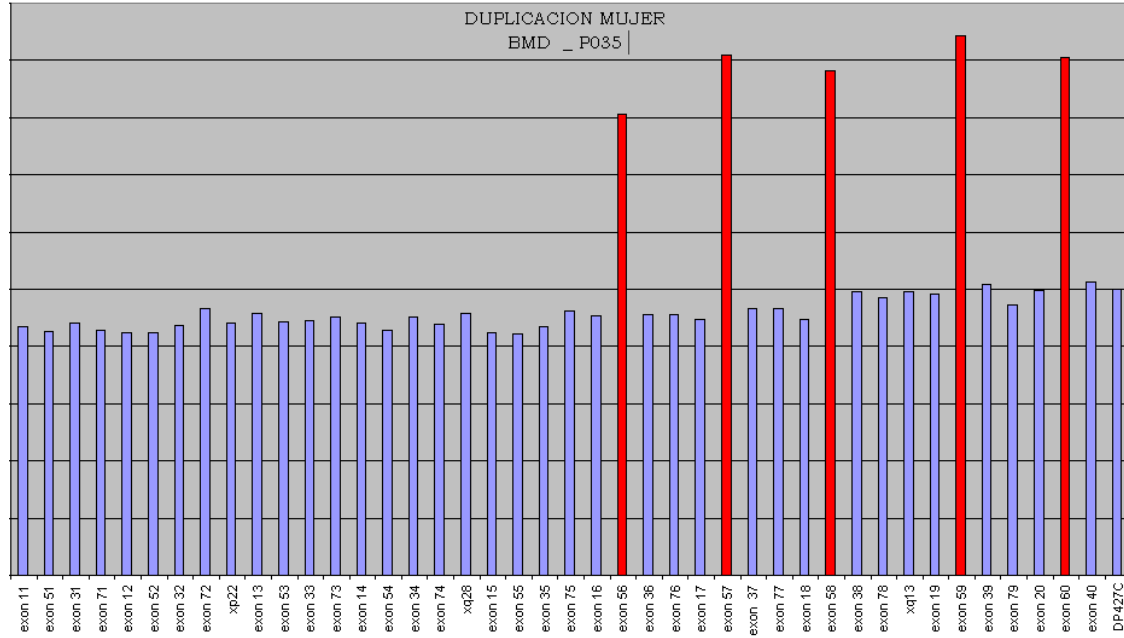


Duplicación exones 3>7

ANÁLISIS *MLPA*: MUJER PORTADORA DELECIÓN EXONES 48>55 (In Frame)

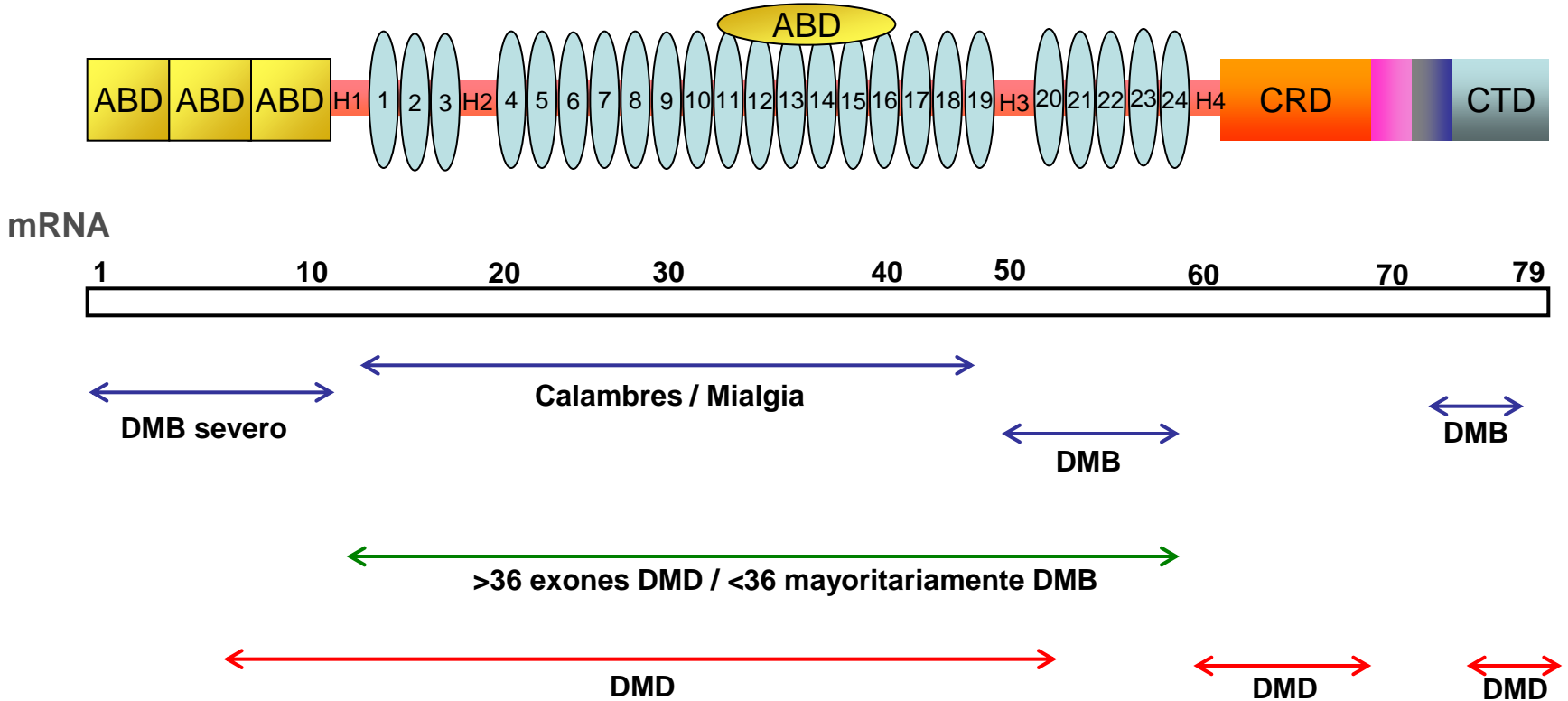


ANÁLISIS MLPA: MUJER PORTADORA DUPLICACIÓN EXONES 56>67 (In Frame)



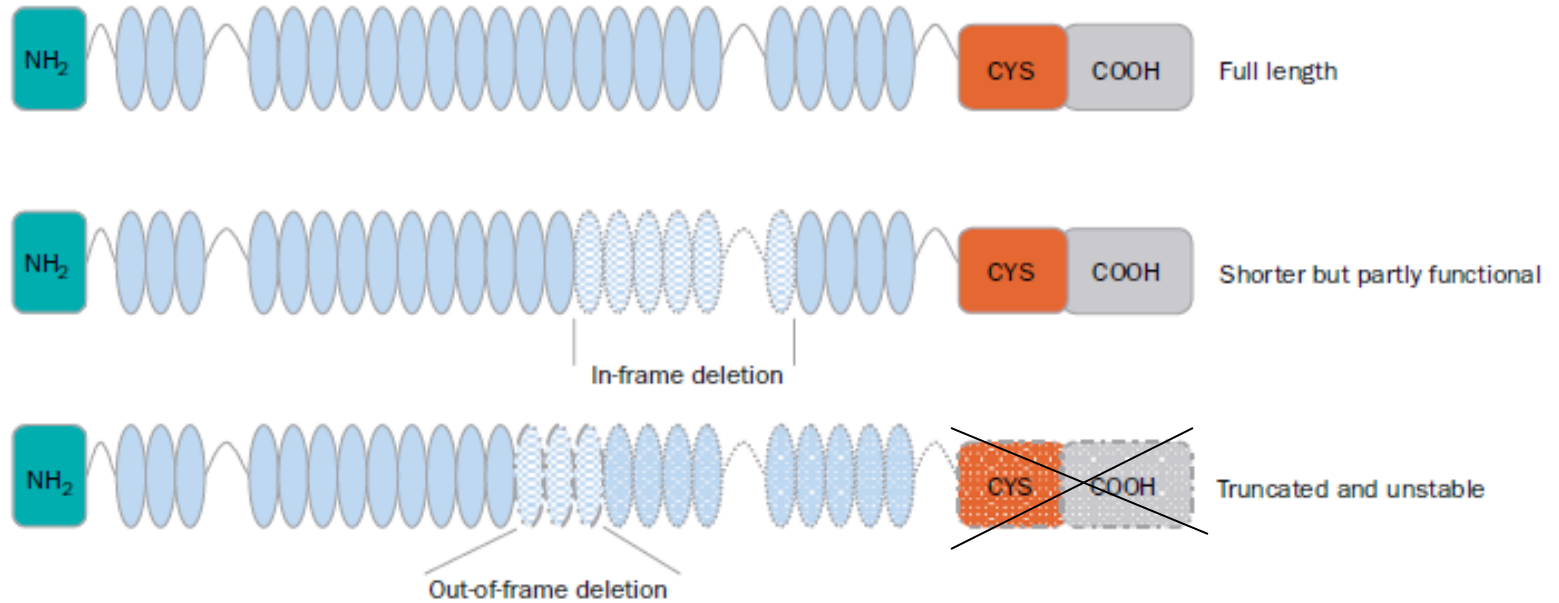
PATOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN *DMD*

Ley de Chamberlain



Relación de la mutación *in-frame* y la severidad fenotípica

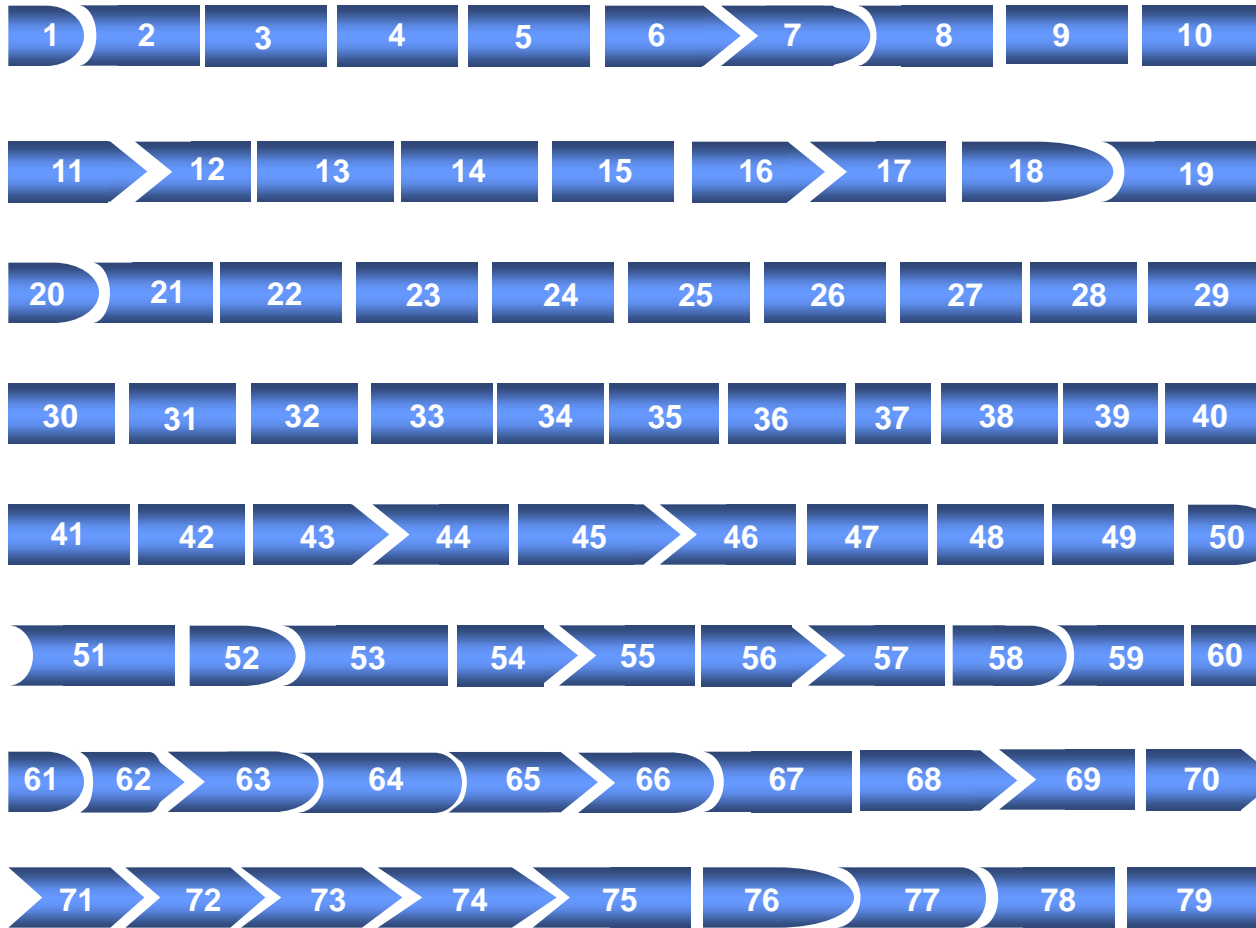
EFEECTO DE LAS MUTACIONES EN LA PROTEÍNA



Delección *in-frame* de parte del dominio espectrina → proteína más corta pero funcional

Delección *out-of-frame* → proteína truncada, rápidamente degradada en el músculo

Organización exónica del gen *DMD*



PATOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN *DMD*

Ley de Monaco, *Reading frame rule*

FENOTIPO SEVERO

Mutación en gen *DMD*

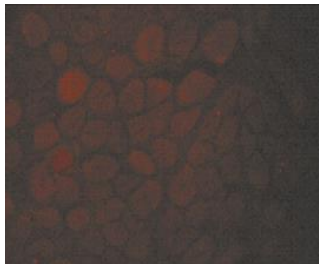
Destruye la pauta de lectura del gen

Creación de un **codón de terminación prematuro**

Ausencia expresión distrofina (o < 5%)

Déficit secundario proteínas complejo DGC

Fenotipo severo tipo **Duchenne**



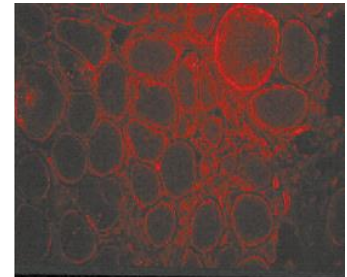
IHQ anti-distrofina paciente Duchenne

Restaura la pauta de lectura del gen

Expresión distrofina
Proteína alterada semi-funcional: alteración en tamaño o cantidad

Formación complejo DGC

Fenotipo leve tipo **Becker**



IHQ anti-distrofina paciente Becker

FENOTIPO LEVE

Excepciones aprox. 10%

DIAGNÓSTICO GENÉTICO ¿CÓMO?

La longitud del gen y su complejidad (2,4 Mb y 79 exones) implica un estrategia diagnóstica

1. Grandes reordenamientos intragénicos

(pérdida o ganancia de uno o más exones):

- Deleciones
- Duplicaciones

Cuantificación número de exones

Tecnología: PCR múltiple

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

2. Mutaciones puntuales (alteración de una o pocas bases):

- Mutaciones *nonsense* (codón de stop prematuro)
- Mutaciones de *splicing* (procesamiento anómalo del mensajero)
- Inserciones / duplicaciones (1-5bp)
- Mutaciones *missense* (cambio de aminoácido)
- Creación exones crípticos

Secuenciación DNA
Secuenciación mRNA

Tecnología: *Secuenciación masiva (NGS): multiplicom DMD, MiSeq Illumina*
Sanger

SECUENCIACIÓN DEL ADN

Next Generation Sequencing: NGS

Sec. Sanger



Sistemas de NGS



1. Acortar el tiempo de respuesta
2. Reducir costes
3. Aumentar la sensibilidad (secuenciación de moléculas)
4. Análisis sencillo de resultados (no bioinformático)

El poder obtener un número muy elevado de secuencias al mismo tiempo eleva significativamente el rendimiento a un menor coste.

Sistemas de NGS "Bench"



- 2010: resultado de 8 pacientes genes *DMD* en 4 meses
- 2016: resultado de 8 pacientes genes *DMD* en 1 semana

SECUENCIACIÓN DEL ADN



MSR: Resequencing

MSR Version: 2.4.0.0
Variant Caller: GATK
Aligner: BWA
Assembler:

89 files (95.68 MB)

High Percentages

Category	Percentage
AT	94.7%
Alp1	26.5%
Alp2	26.4%
GG1	95.9%
GG2	92.5%
TC	81.1%



OMIM

orphanet

ClinVar
Clinically relevant variation

1000 Genomes
A Deep Catalog of Human Genetic Variation

exac.broadinstitute.org

The Exome Aggregation Consortium (ExAC)

This mutation is predicted to be **BENIGN** with a score of **0.287** (sensitivity: 0.91; specificity: 0.89)

Variant: Chr3(GRCh37):g.37048495G>C

gDNA: NM_002049.3(PLM1):c.394G>C

Location: Exon 5

Type: Substitution

Coding Effect: Missense

AA/AA: p.Asp132His

Classification: 5 Classes

Class: Class 3-Unknown pathogenicity

Pathogenicity class is NOT automatically computed

Comment:

Report and Export: Summary | Export to: Tab

Known Variations

dbSNP: rs28930073

Minor Allele: Freq: Count: Clin. signif: significance, benign, path. fact

ESP: EA: C=0.01% - AA: C=0.00%

ESP Report

GoLD: HGVd:

HGMD: Phenotype:

ClinVar: BC0000115462.2 / BC0000018628.1 / BC0000075697.2

PubMed Extracts | LSDB List | LOVD

Missense Predictions

Align GVD... Class C55 (GV: 0.00 - GD: 81.24)

SIFT... Deleterious (score: 0)

MutationTaster... Disease causing (p-value: 1)

PolyPhen-2... Pathogenic

KD... Pathogenic

Splicing Predictions

Possible effect at nearest splice site. Check predictions in the Splicing Window.

Splicing Window

Save | Cancel

MSR: Resequencing

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type	Genotype	Exonic	Filters	Quality	QD	Allelic Ratio	Strandedness	Alt/Ref Ratio	Repeat ID
BRN1L3	C>T	2	13382	1	SNV	het	int	DPFilter	55	33	2	0	0	0
BRN1L3	GAG>GAG	2	13386	3	del	het	int	DPFilter	58	37	1	0	0	0
BRN1L3	C>G	2	13388	1	SNV	het	int	DPFilter	5	6	1	0	0	0
BRN1L3	C>C	2	14422	1	SNV	het	int	DPFilter	62	34	1	0	0	0
BRN1L3	G>G	2	14423	1	SNV	het	int	DPFilter	2	1	1	0	0	0
BRN1L3	G>G	2	14473	1	SNV	het	int	DPFilter	52	32	1	0	0	0
BRN1L3	A>A	2	8594	1	SNV	het	int	DPFilter	53	33	1	0	0	0
BRN1L3	G>G	2	8597	1	SNV	het	int	DPFilter	6	6	1	0	0	0
BRN1L3	G>G	2	17020	1	SNV	het	int	DPFilter	15	15	1	0	0	0
BRN1L3	G>G	2	17062	1	SNV	het	int	DPFilter	35	15	1	0	0	0
BRN1L3	T>T	2	24871	1	SNV	het	int	DPFilter	0	0	1	0	0	0
BRN1L3	T>T	2	24883	1	SNV	het	int	DPFilter	2	0	1	0	0	0
BRN1L3	T>T	2	24889	1	SNV	het	int	DPFilter	2	0	1	0	0	0
BRN1L3	T>T	2	89213	1	SNV	het	int	DPFilter	6	6	1	0	0	0
BRN1L3	G>A	2	76375	1	SNV	het	int	DPFilter	58	34	2	0	0	0
BRN1L3	T>T	2	76394	1	SNV	het	int	DPFilter	0	0	1	0	0	0
BRN1L3	T>A	2	76322	1	SNV	het	int	DPFilter	17	15	2	0	0	0
BRN1L3	A>A	2	85242	1	SNV	het	int	DPFilter	2	0	1	0	0	0
BRN1L3	A>A	2	88827	1	SNV	het	int	DPFilter	0	0	1	0	0	0
BRN1L3	A>A	2	88827	1	SNV	het	int	DPFilter	0	0	1	0	0	0
BRN1L3	A>A	2	87926	1	SNV	het	int	DPFilter	0	0	1	0	0	0

Polimorfismos/Variantes vs. Mutaciones

- El orden de la secuencia de las bases es la única variable en la molécula del DNA.
- **Polimorfismos y Mutaciones:** cambios en la secuencia de las bases.

Criterios de clasificación:

1) **Efecto patogénico:**

El polimorfismo no tiene significación clínica.

La mutación tiene efecto patogénico.

2) **Frecuencia:**

Una variante genética de la población general, detectable en al menos el 1 por 100 de individuos: Polimorfismo

No obstante:

A menudo el umbral del 1p. 100 no se alcanza: **Variante Rara**

ANÁLISIS DE PATOGENICIDAD DE UN CAMBIO LA SECUENCIA EN EL GEN DMD

- Base de datos LOVD, Universidad de Leiden
- Programas software
ALAMUT
 - Polyphen-2
 - Mutation tester
 - SpliceSiteFinder
 - MaxEntScan
 - NNSplice
 - GeneSplicer
 - HumanSplicingFinder
- Segregación del cambio en la familia

LISTADO (propio) POLIMORFISMOS GEN DMD

Name	HGVS	Position
ex1		
ex2	c.93+303T>A	33.037.953
ex3	c.94-133G>A	32.868.070
	c.94-17_94-16insT	32.867.954 - 953
	c.94-9dupT	32.867.946
	c.152T>A	32.867.879
	c.186+35A>T	32.867.810
ex4		
ex5	*c.303T>C	32.841.466
	*c.357+170C>A	32.841.242
	c.265-46G>A	32.841.550
ex6	c.358-139G>A	32.834.896
ex7		
ex8	c.649+145T>C	32.827.465
	c.802T>C	32.717.252
	*c.831+148_831+149dup	32.727.081-717.080
	c.831+144_831+145del	32.717.085
ex9	c.832-54 A>G	32.716.169
	*c.832-53C>T	32.716.168
	c.832-18_832-17delinsGA	32.716.133
	c.837G>A	32.716.110
	c.960+50del	32.715.937
	*c.960+166T>C	32.715.821
ex10	c.961-109A>G	32.663.378
	c.961-124G>C	32.663.393
	c.1098A>T	32.663.132

Name	HGVS	Position
ex11	c.1225A>T	32.662.355
	c.1331+55A>G	32.662.194
	c.1331+127G>A	32.662.122
ex12	c.1482+178 A>G	32.632.242
ex13	c.1483-123G>T	32.614.116
	c.1483-110G>A	32.614.103
	c.1483-67A>T	32.614.060
ex14	c.1635A>G	32.591.931
	c.1704+51T>C	32.591.811
ex15	c.1812+118A>G	32.591.529
ex16	c.1869C>T	32.583.942
	*c.1992+102G>T	32.583.717
	c.1993-37T>G	32.563.488
	c.2168+13T>C	32.563.263
ex17	c.2169-96T>C	32.536.344
ex18	*c.2293-123A>G	32.520.082
ex19		
ex20	c.2391T>G	32.509.625
	c.2622+33A>G	32.509.361
	c.2623-11C>G	32.503.227
ex21	c.2645G>A	32.503.194
ex22		
ex23	c.3021G>A	32.486.756
ex24	c.3277-152A>G	32.481.863
	c.3277-30C>T	32.481.741
ex25		

Name	HGVS	Position
ex26	c.3603+15dupA	32.472.764
	c.3786+296C>T	32.466.573
	c.3603+16_3603+15del	32.472.763
ex27		
ex28	*c.3921+39G>A	32.459.258
	c.3921+128C>T	32.459.169
	*c.3921+39G>A	32.459.258
ex29	*c.4072-213C>A	32.430.030
ex30	*c.4234-31A>G	32.408.329
	c.4234-13A>G	32.408.311
ex32	*c.4447A>G	32.407.689
	*c.4472A>C	32.407.664
ex33	*c.4675-87A>C	32.398.884
ex34	c.4845+69G>A	32.398.558
	c.4846-153G>A	32.388.316
	c.4790G>A	32.398.682
ex35	c.5025+103G>A	32.383.034
	c.5026-63T>A	32.382.890
	c.5026-93A>G	32.382.920
ex36		
ex37	c.5234G>A	32.380.996
ex38	*c.5448+67A>G	32.366.456
	c.5448+169A>T	32.366.354
ex39	*c.5419C>T	32.366.552
	c.5586+94_5586+95dup	32.363.966 - 965
	c.5586+96_5586+97del	32.363.964 - 963

LISTADO POLIMORFISMOS GEN *DMD* (cont)

Name	HGVS	Position
ex40	*c.5740-102G>T	32.360.501
	c.5740-67G>T	32.360.466
ex41	c.5922+77_5922+78del	32.360.140- 139
	c.5923-179G>A	32.328.572
ex42	c.6105G>T	32.328.211
	c.6118-63_6118-62dup	32.305.881- 880
ex43	c.6143G>A	32.305.793
	c.6290+27T>A	32.305.619
	*c.6291-155G>A	32.235.335
	c.6291-115G>A	32.235.295
	*c.6291-39 T>	32.235.219
	c.	32.305.879
ex44		
ex45	c.6463C>T	31.986.607
	c.6614+7C>T	31.986.449
	c.6614+26G>T	31.986.430
	c.6615-27A>T	31.950.371
ex46	c.6762+141C>T	31.950.056
ex47	c.6912+124_6912+128dup	31.947.589- 585
	c.6913-114A>T	31.893.604
ex48	c.7096C>A	31.893.307
ex49	c.7200+53C>G	31.854.782
ex50	*c.7309+26delC	31.838.066
	c.7309+176T>C	31.837.916
ex51	c.7542+13A>G	31.792.064
	c.7543-156C>G	31.748.021

Name	HGVS	Position
ex52	c.7661-61T>A	31.697.764
ex53	c.7728T>C	31.697.636
ex54	c.8027+11C>T	31.676.096
ex55		
ex56		
ex57	c.8547+153C>T	31.514.752
ex58	c.8668+209C>T	31.496.891
	c.8669-75C>G	31.496.566
ex59	c.8729A>T	31.496.431
	c.8810A>G	31.496.350
	c.8762A>G	31.496.398
	c.8734A>G	31.496.426
	c.8767G>T	31.496.393
ex60		
ex61	c.9163+189G>T	31.366.484
ex62		
ex63		
ex64	c.9361+138T>C	31.241.026
	*c.9361+200C>T	31.240.964
ex65	c.9564-97C>T	31.224.881
ex66	c.9649+15 T>C	31.224.684
ex67	c.9807+218C>G	31.221.860
ex68	c.9938G>A	31.200.891
	c.9947G>T	31.200.882
	c.9974+13delA	31.200.842
	c.9974+22dup	31.200.833
	c.9974+22delA	31.200.833

Name	HGVS	Position
	c.9975-79G>A	31.198.677
ex69		
ex70	c.10224-101T>C	31.196.188
ex71		
ex72	c.10328+67A>G	31.191.589
ex73		
ex74		
ex75	c.10789C>T	31.165.400
	c.10797+82G>A	31.165.310
	c.10798-100G>C	31.164.630
ex76		
ex77		
ex78		
ex79		

Paciente DMD

- Cambio de una base que genera la formación de un codón de terminación prematuro.
- Tipo de mutación puntual más frecuente en DMD.

Mutación *nonsense* (creación codon stop)

```

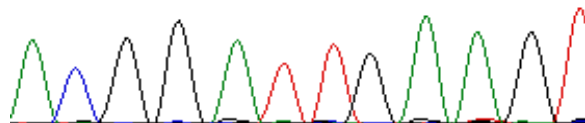
GAACAATCATTACGGATCGAAGTAAGTTTTT
GAACAATCATTACGGATCGAA
GAACAATCATTACGGATTGAAGTAAGTTTTT
  
```

```

| 350 | 360 | 370
GAACAATCATTACGGATTGAAGTAAGTTTTT
.....
  
```

• B05_09.704_gDNA_DMD_e52R Fragment bases

A	C	G	G	A	T	T	G	A	A	G	T
T	a	J	J	T	A	A	J	T	T	J	A



DNA: c.7657 C>T
Prot.: p.Arg2553*

Exón 52 : CGA → TGA
Arg → STOP

DMD Variation

Class 3-Unknown pathogenicity

Transition from C to T in exon 52.

Nonsense substitution.

The reading frame is interrupted by a premature STOP codon.

The mRNA produced might be targeted for nonsense mediated decay (NMD).

This variation is known to dbSNP as [rs398124050](#) (not validated dbSNP entry - **Clinical significance: pathogenic).**

According to the HGVS recommendations version 2.0, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA):	NM_004006.2:c.7657C>T
DNA Level (genomic):	ChrX(GRCh37):g.31747751G>A
Protein Level:	p.Arg2553*

Splicing predictions at nearest natural junction

Predicted change at donor site 4 bps downstream: -0.0%

- MaxEnt: 0.0%
- NNSPLICE: -0.0%
- HSF: 0.0%

LOVD - Variant listings

About this overview [[Show](#)]

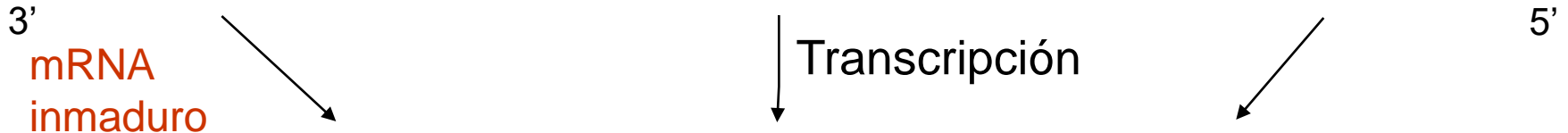
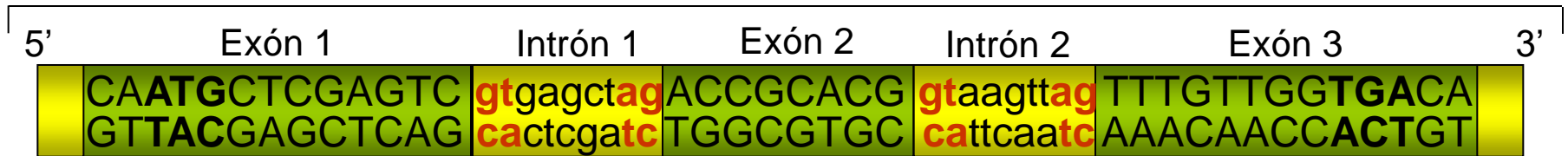
Patient data (#0007697)	
Phenotype	dystrophy, muscular, Duchenne (DMD)
Phenotype additional	-
Reference	France:Paris
Remarks	-
Geographic origin	France
Ethnic origin	-
Gender	M
Inheritance	isolated (sporadic)
Consanguinity	-
Fam_Pat	-
# reported	1
CK level	-
Protein data	WB no DMD
Submitter	Human Genetics Diagnostic Laboratory - Cochin Hosp J Chelly, F Leturcq

Allele	Unknown
Reported pathogenicity	Pathogenic
Concluded pathogenicity	Unknown
Exon	52
DNA change	c.7657C>T (View in UCSC Genome Browser , Ensembl)
Var_pub_as	-
RNA change	r.7657c>u
Protein change	p.Arg2553*
DB-ID	DMD_00273
Variant remarks	de novo, in patient
Genet_ori	de novo
Segregation	-
Reference	Deburgrave 2007 , UMD-1643
Template	DNA, RNA
Technique	RT-PCR, SEQ
Frequency	-
RE-site	DpnI-; DpnII-; MboI-; Sau3AI-; TaqI-

Proceso de "splicing"

DNA

Gen



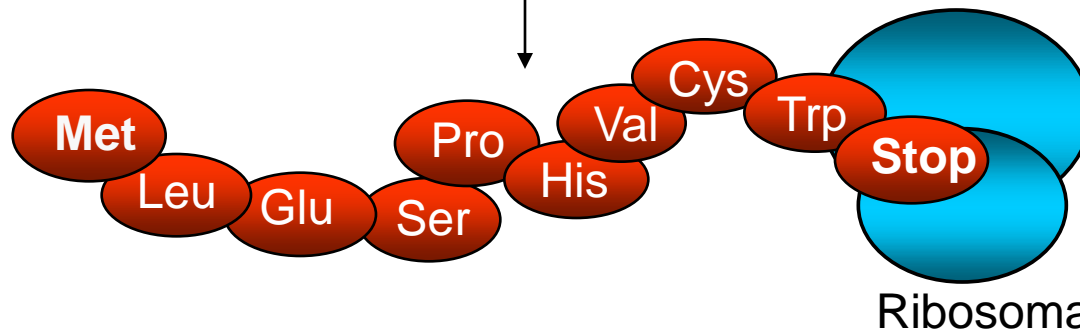
mRNA maduro

maduración de RNA por corte y empalme

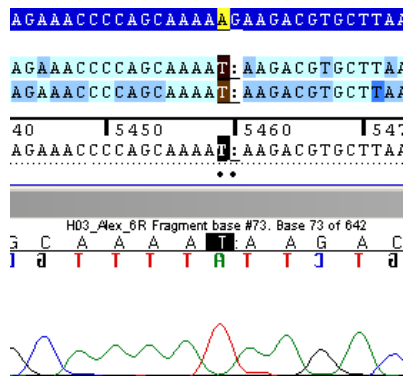


Proteína

Traducción



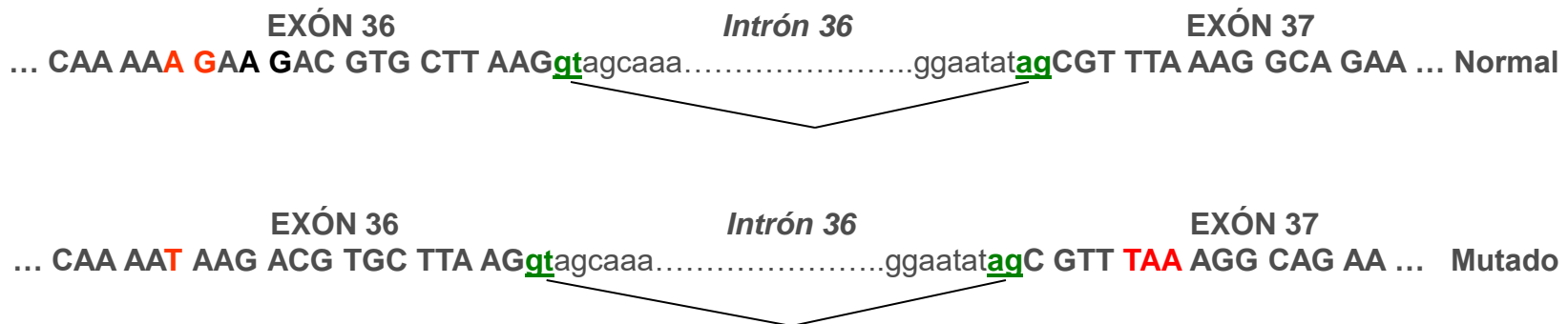
Mutación indel (inserción-delección)



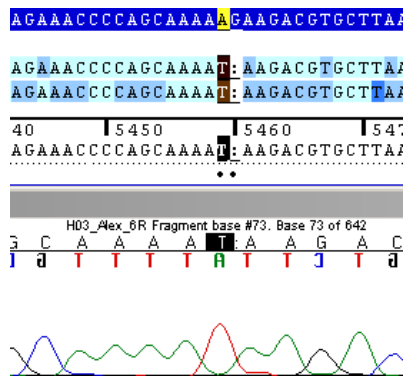
Paciente DMD

Exón 36: la delección de **AG** e inserción de **T** desplaza la pauta de lectura. Se crea un codón stop 7 codones más allá, en el exón 37.

DNA: c.5139_c.5140del AG_insT
 Prot.: p.Lys1713Asn_fs*8



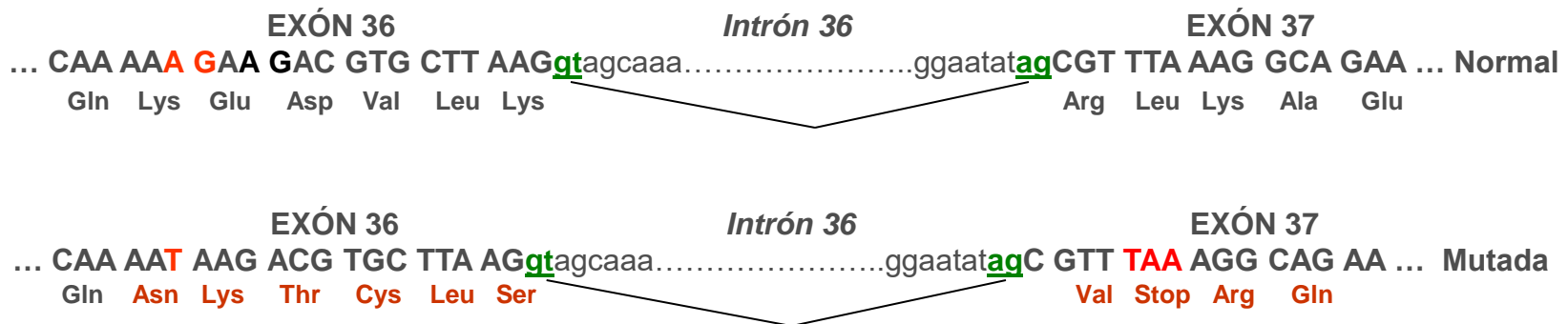
Mutación indel (inserción-delección)



Paciente DMD

Exón 36: la delección de **AG** e inserción de **T** desplaza la pauta de lectura. Se crea un codón stop 7 codones más allá, en el exón 37.

DNA: c.5139_c.5140del AG_insT
 Prot.: p.Lys1713Asn_fs*8



DMD Variation

Class 3-Unknown pathogenicity

Deletion (2 bps)/insertion (1 bp) in exon 36.

This delins creates a frame shift starting at codon Lys1713. The new reading frame ends in a STOP codon 7 positions downstream.

The mRNA produced might be targeted for nonsense mediated decay (NMD).

According to the HGVS recommendations version 2.0, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_004006.2:c.5139_5140delinsT**

DNA Level
(genomic): **ChrX(GRCh37):g.32382713_32382714delinsA**

Protein Level: **p.Lys1713Asnfs*8**

Splicing predictions at nearest natural junction

Predicted change at donor site 15 bps downstream: -7.1%

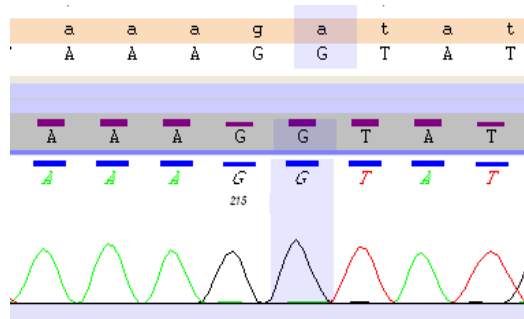
- MaxEnt: 0.0%
- NNSPLICE: 0.0%
- HSF: -21.4%

LOVD - Variant listings

About this overview [[Show](#)]

Patient data (#0030156)	
Phenotype	dystrophy, muscular, Duchenne (DMD)
Phenotype additional	-
Reference	Spain:Barcelona
Remarks	carrier mother
Geographic origin	Spain
Ethnic origin	-
Gender	M
Inheritance	familial, X-linked recessive
Consanguinity	-
Fam_Pat	-
# reported	2
CK level	-
Protein data	IHC no DMD
Submitter	Jonàs Juan-Mateu

Variant data	
Allele	Maternal (confirmed)
Reported pathogenicity	Pathogenic
Concluded pathogenicity	Unknown
Exon	36
DNA change	c.5139_5140delinsT (View in UCSC Genome Browser , Ensembl)
Var_pub_as	-
RNA change	r.5139_5140delinsu
Protein change	p.Lys1713Asnfs*8
DB-ID	DMD_02969
Variant remarks	-
Genet_ori	germline (inherited)
Segregation	-
Reference	-
Template	DNA, RNA
Technique	RT-PCR, PCR, SEQ, MLPA
Frequency	-
RE-site	-



DNA: sustitución A>G

Paciente DMD con mutación *missense*

Exón 38

DNA: c.5444 A>G
Prot.: p.Asp1815Gly

No descrita en LOVD

EXON 38 *intrón 38* EXON 39
 ...AAT AAA GAT ATGgtaaaattggtg.....ttttgatcagAAT GAA GAC...

Secuencia normal

EXON 38 *intrón 38* EXON 39
 ...AAT AAA GGT ATGgtaaaattggtg.....ttttgatcagAAT GAA GAC...

Secuencia mutada

Class 3-Unknown pathogenicity

Transition from A to G in exon 38.

Missense substitution.

Asp at position 1815 is changed to Gly.

According to the HGVS recommendations version 2.0, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_004006.2:c.5444A>G**

DNA Level
(genomic): **ChrX(GRCh37):g.32366527T>C**

Protein Level: **p.Asp1815Gly**

Pathogenicity clues

- Moderately conserved nucleotide (phyloP: 3.68 [-14.1;6.4])
- Highly conserved amino acid, up to Chicken (considering 7 species)
- Moderate physicochemical difference between Asp and Gly (Grantham dist.: 94 [0-215])
- This variation is in protein domains:
 - Spectrin/alpha-actinin
 - Dystrophin/utrophin
- Align GVGD: C0 (GV: 213.16 - GD: 64.73)
- SIFT: Deleterious (score: 0, median: 4.32)
- MutationTaster: disease causing (p-value: 0.996)

Splicing predictions at nearest natural junction

Predicted change at donor site 5 bps downstream: -10.4%

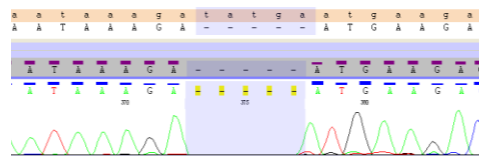
- MaxEnt: 0.0%
 - NNSPLICE: -31.3%
 - HSF: 0.0%
-

El diagnóstico genotípico directo sobre mRNA

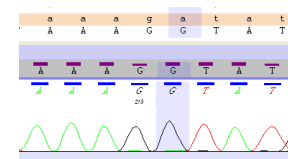
- El método de **RT-PCR** permite retrotranscribir el mRNA gracias a la transcriptasa inversa y así obtener un cDNA de doble cadena que podrá ser secuenciado directamente
- La exploración de los mRNA patológicos permite visualizar las **consecuencias de las mutaciones de *splicing***, ya se trate de:
 - un salto de exón (*skipping*)
 - una activación de nuevos sitios de *splicing*

El diagnóstico prenatal se realizará mediante secuenciación del DNA fetal

Creación de un nuevo sitio donador de *splicing*



RNA → cDNA: **delección 5 bp**



DNA: **substitución A>G**

Paciente DMD con mutación *splicing*
El efecto de la mutación solo detectable en RNA

EXON 38 *intrón 38* EXON 39
...AAT AAA GAT ATG **gt**aaattggttg.....ttttgatc**ag**AAT GAA GAC...

EXON 38 *intrón 38* EXON 39
...AAT AAA **G**T ATG **gt**aaattggttg.....ttttgatc**ag**AAT GAA GAC...

EXON 38 *intrón 38* EXON 39
...AAT AAA **G**gtatggttaaattggttg.....ttttgatc**ag**AA **TGA** AGA CAA...

DNA: c.5444 A>G
Prot.: p.Asp1815Gly



RNA: r.5444_r.5448del
DNA: c.5444 A>G
Prot.: p.Asp1815Glu_fs*2

LOVD - Variant listings

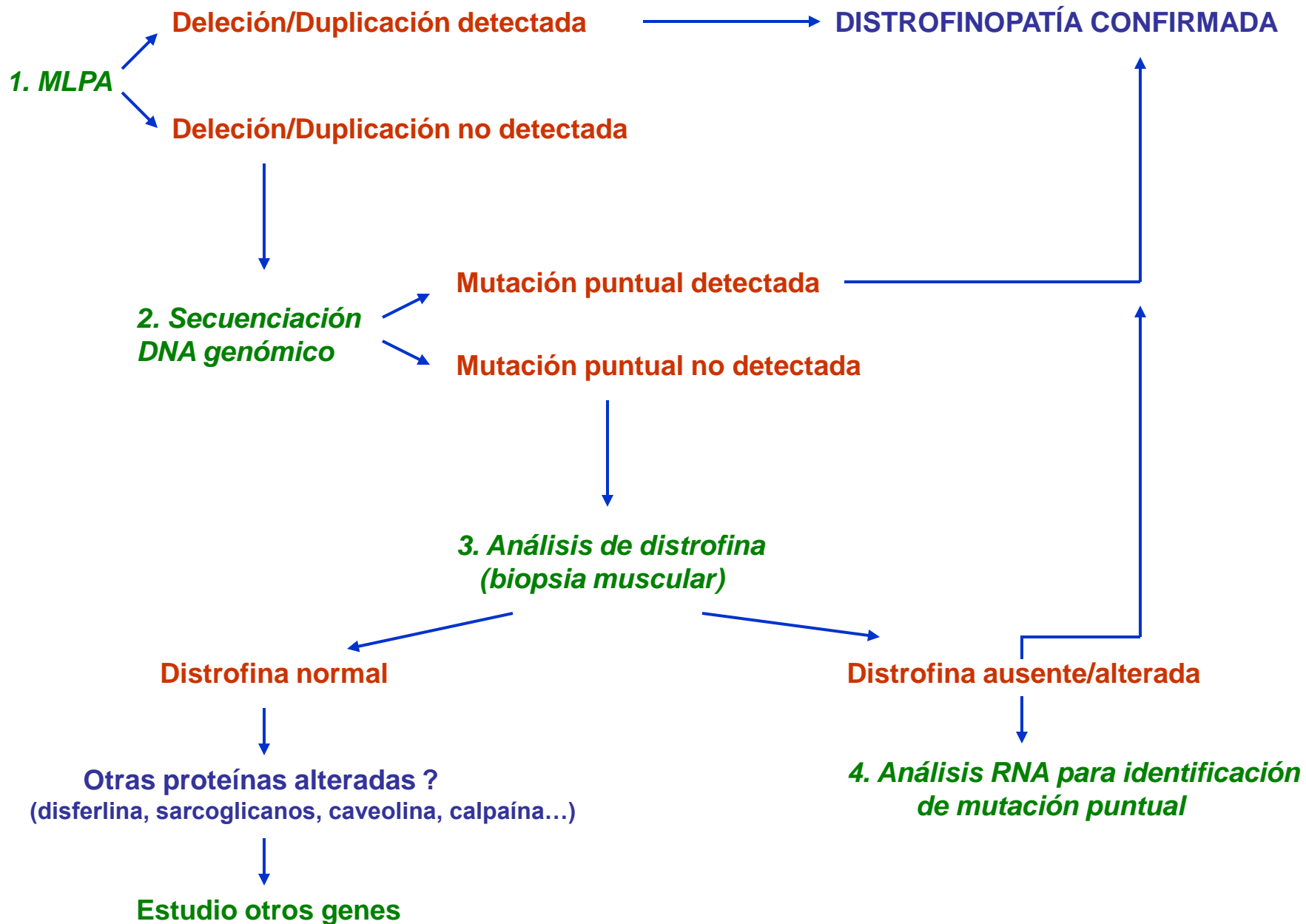
About this overview [[Show](#)]

Patient data (#0019631)

Phenotype	dystrophy, muscular, Duchenne (DMD)
Phenotype additional	-
Reference	Spain:Barcelona
Remarks	-
Geographic origin	Spain
Ethnic origin	-
Gender	M
Inheritance	unknown
Consanguinity	-
Fam_Pat	-
# reported	1
CK level	-
Protein data	-
Submitter	Jonàs Juan-Mateu

Variant data

Allele	Unknown
Reported pathogenicity	Pathogenic
Concluded pathogenicity	Unknown
Exon	38
DNA change	c.5444A>G (View in UCSC Genome Browser , Ensembl)
Var_pub_as	-
RNA change	r.5444_5448del
Protein change	p.Asp1815Glufs*2
DB-ID	DMD_02528
Variant remarks	only one RNA transcript detected
Genet_ori	unknown
Segregation	-
Reference	Juan-Mateu 2013 , ESHG2010 Juan-Mateu
Template	DNA, RNA
Technique	MLPA, RT-PCR, SEQ
Frequency	-
RE-site	-



SECUENCIACIÓN DEL ADN

NGS: tres aproximaciones diferentes

SECUENCIACIÓN DE PANELES (PS)

- Análisis de docenas a cientos de genes
- Hasta 96 muestras (códigos de barras)
- Cobertura ALTA-> sensibilidad y especificidad muy altas
- Bajo coste
- No "unsolicited findings"
- Aplicación directa la diagnóstico
- No bioinformático

SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO (WES)

- Análisis de secuencias de todos los genes que codifican a proteínas
- "kits" comerciales disponibles
- Cobertura/sensibilidad/especificidad menos que en PS
- Costes más elevados
- No restringido a genes conocidos
- Bioinformático

SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (WGS)

- Incluye las zonas no codificantes de todos los genes y reg. intergénicas
- No hace falta enriquecimiento
- Servicios comerciales atractivos
- Bioinformático

¿Cuándo se deben utilizar? ¿Cuál es su utilidad en el diagnóstico?

PANEL DE GENES MIOPATÍAS DE DISEÑO PROPIO

<i>AARS</i>	<i>CHRND</i>	<i>DYNC1H1</i>	<i>KLHL9</i>	<i>NEB</i>	<i>SPEG</i>
<i>ACTA1</i>	<i>CHRNE</i>	<i>DYSF</i>	<i>LAMA2</i>	<i>PABPN1</i>	<i>STIM1</i>
<i>ACVR1</i>	<i>CHRNA1</i>	<i>EMD</i>	<i>LAMB2</i>	<i>PLEC</i>	<i>SYNE1</i>
<i>AGRN</i>	<i>CNTN1</i>	<i>FHL1</i>	<i>LAMP2</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>SYNE2</i>
<i>ALG13</i>	<i>COL12A1</i>	<i>FKRP</i>	<i>LARGE</i>	<i>POMGNT1</i>	<i>SYT2</i>
<i>ALG14</i>	<i>COL6A1</i>	<i>FKTN</i>	<i>LDB3</i>	<i>POMT1</i>	<i>TCAP</i>
<i>ALG2</i>	<i>COL6A2</i>	<i>FLNC</i>	<i>LMNA</i>	<i>POMT2</i>	<i>TIA1</i>
<i>ANO5</i>	<i>COL6A3</i>	<i>GAA</i>	<i>LMOD3</i>	<i>POMT2</i>	<i>TMEM43</i>
<i>B3GALNT2</i>	<i>COLQ</i>	<i>GARS</i>	<i>LRP4</i>	<i>PREPL</i>	<i>TMEM5</i>
<i>B3GNT1</i>	<i>CRYAB</i>	<i>GFPT1</i>	<i>MEGF10</i>	<i>PTPLA</i>	<i>TNNT1</i>
<i>BAG3</i>	<i>DAG1</i>	<i>GMPPB</i>	<i>MSTN</i>	<i>PTRF</i>	<i>TNPO3</i>
<i>BIN1</i>	<i>DES</i>	<i>GNE</i>	<i>MTM1</i>	<i>RAPSN</i>	<i>TPM2</i>
<i>CAPN3</i>	<i>DMD</i>	<i>GTDC2</i>	<i>MTMR14</i>	<i>RYR1</i>	<i>TPM3</i>
<i>CAV3</i>	<i>DNAJB6</i>	<i>HSPB8</i>	<i>MUSK</i>	<i>SCN4A</i>	<i>TRIM32</i>
<i>CCDC78</i>	<i>DNM2</i>	<i>IGHMBP2</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>SEPN1</i>	<i>TRPV4</i>
<i>CFL2</i>	<i>DOK7</i>	<i>ISPD</i>	<i>MYF6</i>	<i>SGCA</i>	<i>TTN</i>
<i>CHAT</i>	<i>DPAGT1</i>	<i>ITGA7</i>	<i>MYH2</i>	<i>SGCB</i>	<i>VCP</i>
<i>CHKB</i>	<i>DPM1</i>	<i>KBTBD13</i>	<i>MYH7</i>	<i>SGCD</i>	
<i>CHRNA1</i>	<i>DPM2</i>	<i>KLHL40</i>	<i>MYO18B</i>	<i>SGCG</i>	
<i>CHRNA1</i>	<i>DPM3</i>	<i>KLHL41</i>	<i>MYOT</i>	<i>SGK196</i>	

Servicio de Genética, Hospital de Sant Pau, Barcelona

Grupo Distrofias Musculares: Lidia González-Quereda, M^a José Rodríguez

Andres Nascimento, Carlos Ortez, Jaume Colomer
Unidad de Enfermedades Neuromusculares
Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona

Francina Munell
Servicio de Neurología
Hospital Materno Infantil Vall d'Hebró, Barcelona



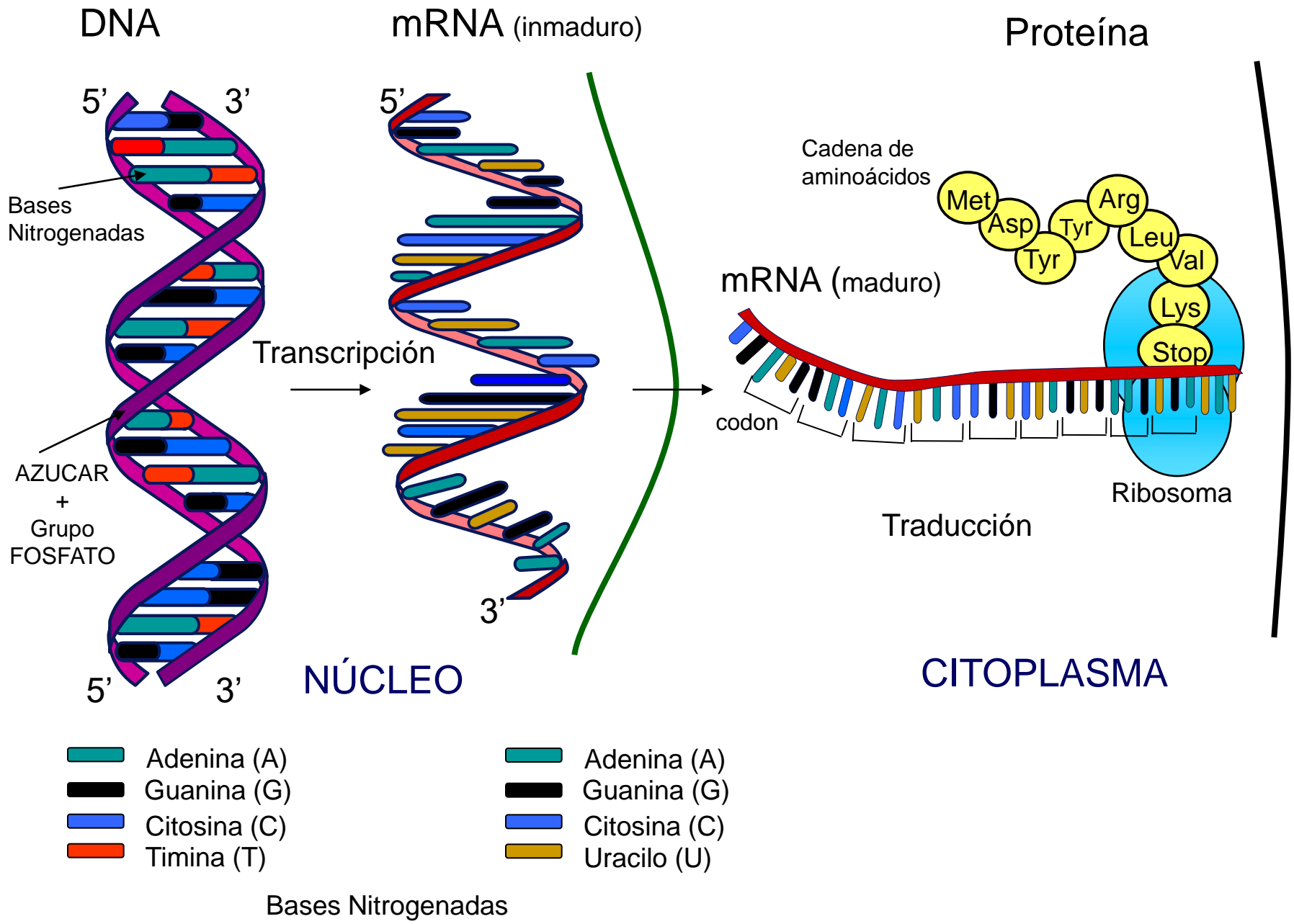
Servicio de Genética Hospital de Sant Pau, Barcelona

Grupo Distrofias Musculares Lidia González-Quereda, M^a José Rodríguez



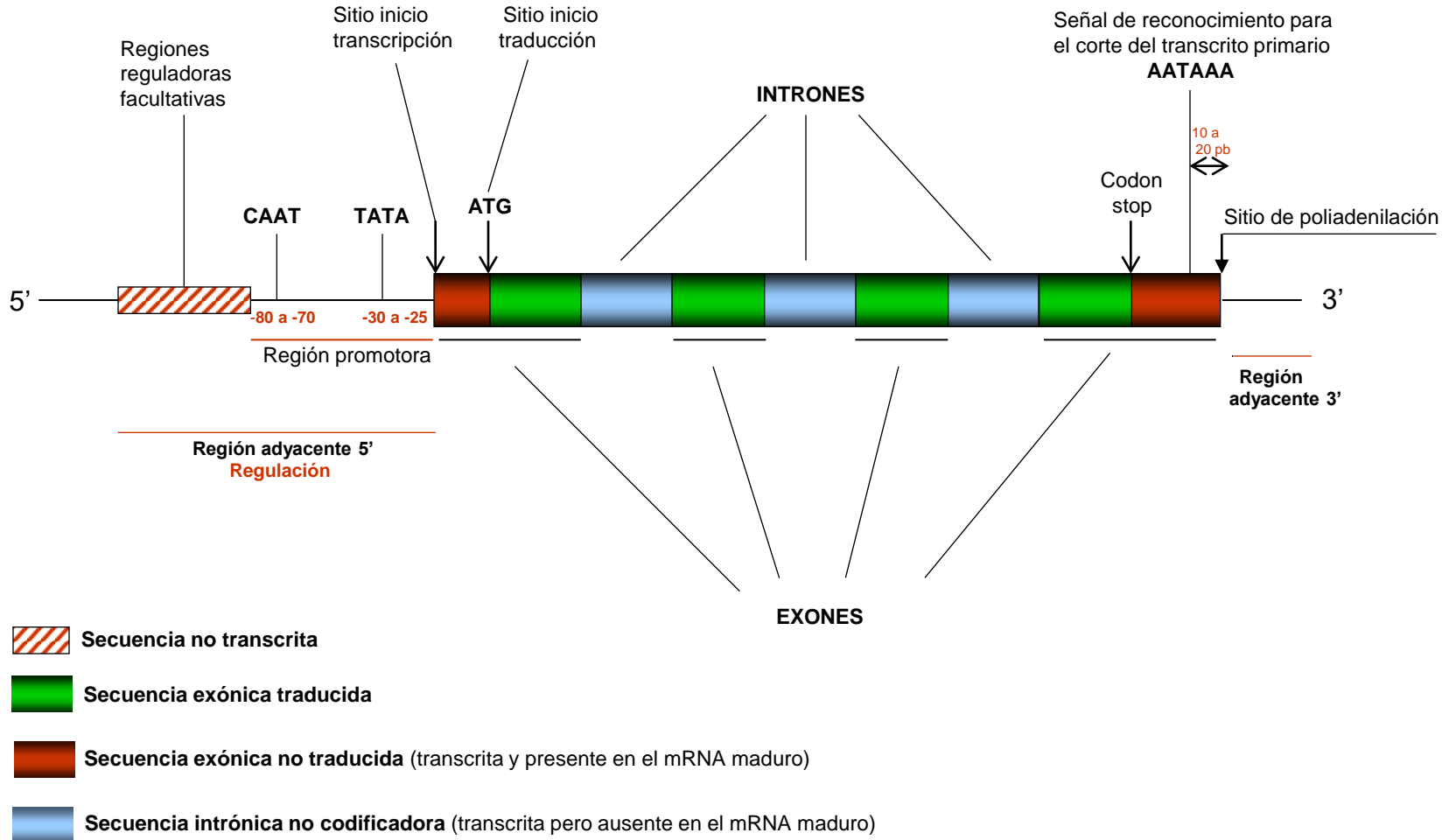
Andres Nascimento, Carlos Ortez, Jaume Colomer
Unidad de Enfermedades Neuromusculares
Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona

Francina Munell
Servicio de Neurología
Hospital Materno Infantil Vall d'Hebró, Barcelona



GEN DE CLASE II

Genes que codifican para una proteína. Son transcritos por la *RNA pol II*.





Deleciones en el gen *DMD*

PANEL DE GENES DE DISEÑO PROPIO

Contiene 117 genes que representan 646,7 Kb

Cobertura Media= 249X

Uniformidad de Cobertura= 95,3%

Region a cobertura mínima 20X= 97,8%

Region a cobertura mínima 50X= 94%

ESTUDIO GENÉTICO DEL GEN *DMD*: Algoritmo diagnóstico

