

**Univerzita Karlova**  
**Prírodovedecká fakulta**

Študijný program: Špeciálne chemicko-biologické odbory  
Študijný obor: Molekulárna biológia a biochémia organizmov



**Anna Mária Paliesková**

Vplyv mutácie v *DMD* géne na rast a vývoj svalového tkaniva  
The effect of *DMD* gene mutation on the growth and development of muscle tissue

Bakalárska práca

Školiteľ: Ing. Martin Knytl, Ph.D.

Praha, 2021

Podakovanie patrí Ing. Martinovi Knytlovi, Ph.D. za cenné rady a ochotu pri vypracovávaní bakalárskej práce.

Prehlasujem, že bakalársku prácu na tému „Vplyv mutácie v *DMD* géne na rast a vývoj svalového tkaniva“ som vypracovala sama na základe uvedenej literatúry.

Praha 3.5.2021

Anna Mária Paliesková

.....

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vývoj svalového tkaniva.....	2
2.1	Formovanie somitov .....	2
2.2	Transkripčné faktory <i>MRFs</i> a ich funkcia počas myogenézy.....	3
2.3	Rozdelenie myogenézy do dvoch vývojových fáz .....	3
2.4	Satelitné bunky .....	3
3	Zloženie kostrového svalu .....	4
3.1	Sarkoméra .....	4
3.2	Stabilizácia myofibril väzbou ku sarkoléme .....	4
3.2.1	Vinculín-talín-integrínový systém.....	4
3.2.2	Dystrofín-glykoproteínový komplex (DGC).....	5
3.2.3	Proteín dystrofín.....	6
3.2.3.1	Štruktúra proteínu dystrofínu Dp427.....	7
3.2.3.2	Funkčná úloha domén proteínu dystrofínu Dp427 .....	7
4	Mutácie v <i>DMD</i> géne pre dystrofín .....	8
5	Duchennova a Beckerova muskulárna dystrofia.....	9
6	Vplyv mutácií v <i>DMD</i> géne na vývoj svalového tkaniva .....	9
6.1	Poruchy myogenézy u modelových organizmov.....	10
6.1.1	<i>Mdx</i> myš .....	10
6.1.2	Dáňio pruhované ( <i>Danio rerio</i> ).....	12
6.2	Ovplyvnenie myogenézy na transkripčnej úrovni pri absencii proteínu dystrofín....	12
6.2.1	Narušenie homeostázy vápnika .....	13
6.2.2	Narušenie signalizačnej aktivity kináz.....	13
6.2.3	Zmena svalového vlákna vplyvom mutácie <i>DMD</i> génu .....	14
6.3	Human induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC) model myogenézy u <i>DMD</i> .....	14
6.3.1	Prejav fibrózy u <i>DMD</i> hiPSC.....	15
6.4	Vplyv mutácie dystrofínu na kmeňové bunky kostrového svalstva .....	16
7	Záver .....	18
8	Zoznam literatúry .....	20

## Abstrakt

Duchennova muskulárna dystrofia patrí medzi najčastejšie vrodené, veľmi závažné ochorenia svalov postihujúce prevažne chlapcov. Ochorenie je spôsobené mutáciou v *DMD* géne, ktorý kóduje proteín dystrofín. Tento proteín je lokalizovaný v bunkách svalových vlákien na vnútornej strane sarkolémy. Dystrofín slúži na prepojenie aktínových vlákien s extracelulárnou matrix v svalovom tkanive a je dôležitý pre správne fungovanie svalov počas kontrakcie a relaxácie. Ako je vysvetlené v tejto práci, jeho tvorba má zásadný význam už pri samotnom vývoji svalového tkaniva. Expresia *DMD* génu ovplyvňuje zároveň expresiu ďalších génov, ktoré sú kľúčové pre správny vývoj a rast svalového tkaniva. V dôsledku mutácií v *DMD* géne nastávajú zmeny v expresii génov signalizačných kaskád, napr. PKA, čo ovplyvňuje reguláciu expresie ďalších génov. *Mdx* myši, ktoré slúžia na štúdium DMD, vykazujú v prenatalných štádiách abnormality v podobe nesprávne zarovnaných myotubulov, ďalej v lokalizácii jadier svalových buniek a v celkovom zvýšení počtu rýchlych myozínových vlákien (FMyHC). Absencia dystrofínu negatívne vplyva aj na kmeňové satelitné bunky. Dochádza k narušeniu signálnej dráhy potrebnej ku správnej orientácii deliaceho vretienka. Nesprávnou orientáciou zlyháva asymetrické delenia buniek a dochádza k ich predčasnému „starnutiu“.

Kľúčové slová: dystrofín, Duchennova muskulárna dystrofia, DGC komplex, myogenéza, svalové tkanivo, *mdx* myš

## Abstract

Duchenne muscular dystrophy is one of the most frequent and very severe congenital myopathies, affecting mainly boys. The disease is caused by a mutation in the gene encoding the dystrophin protein. The gene is located in the muscle tissue cells on the inner side of the sarcolemma. Dystrophin provides a link between the actin filaments and the extracellular matrix. It is important for the proper functioning of muscles during contraction and relaxation. As explained in this thesis, the production of dystrophin is of critical importance already at the muscle tissue development stage. The *DMD* gene expression also affects the expression of the other genes which play a key role in the right development and growth of muscle tissue. Mutations in the *DMD* gene cause changes in the signalling pathway genes such as PKA, thus affecting the expression control of other genes. *Mdx* mice used in DMD studies show abnormalities at prenatal stages, which are manifested through wrong organisation of microtubules and location of muscular cell nuclei, and a general increase in the number of fast myosin fibres (FMyHC). The absence of dystrophin also has an adverse effect on the satellite stem cells. The signalling pathway required for the correct spindle apparatus orientation is damaged. The wrong orientation causes the asymmetric cell division to fail, which leads to the premature “ageing” of cells.

Keywords: dystrophin, Duchenne muscular dystrophy, DGC complex, muscle tissue, myogenesis, *mdx* mouse

## Zoznam skratiek

Actn3	alfa- actinine3
ANGPT1	angiopoietin 1
BMP	Bone morphogenetic proteins
BMD	Becker muscular dystrophy
Ca <sup>2+</sup>	vápenatý kation
Capn3	calpain 3
Casq1	calsequetrin1
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDM	central dermomyotome
Cmya5	cardiomyopathy-associated protein 5
COL1A2	collagen type I alpha 2 chain
CTGF	connective tissue growth factor
DAPC	dystrophin-associated protein complex
DGC	dystrophin glycoprotein complex
DMD gén	gén kódujúci proteín dystrofín
DMD	Duchenne muscular dystrophy
DML	dorsomedial lip
Dp116	izoforma dystrofínu o veľkosti 116 kDa
Dp140	izoforma dystrofínu o veľkosti 140 kDa
Dp427	izoforma dystrofínu o veľkosti 427 kDa
Dp71	izoforma dystrofínu o veľkosti 71 kDa
E8.5-E17.5	myši embryonálny deň od 8.5 dňa po 17.5 deň
FMyHC	Fast Myosin Heavy Chain
GLI3	GLI family zinc finger 3
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
H19	gén pre dlhú nekódujúcu RNA
hiPSC	human induced pluripotent stem cell
IGF2	insulin-like growth factor 2
kDa	kilodalton
Lpin1	lipin1
LPM	lateral plate mesoderm

Maob	monoamine oxidase B
Map3k7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
Mark2	microtubule affinity-regulating kinase 2
Mbp	mega párov báz
Mdx myš	modelový organizmus na štúdium DMD s bodovou mutáciou v géne DMD
MET	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
miR-133	typ dlhej nekódujúcej mikroRNA exprimovanej v svalovom tkanive
MMP	matrix metalloproteinase
MRF	myogenic regulatory factors
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mRNA-seq	mRNA sequencing
Mybpc2	myosin binding protein C2
Myf5	myogenic factor 5
Myf6	myogenic factor 6
MyHC	myosin heavy chain
MyoD	myoblast determination protein 1
myomiR	mikroRNA kostrového svalstva
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NR2F2	nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
Par1b	partitioning-defective 1b
Pax3	paired box gene 3
Pax7	paired box gene7
Pfkm	6-phosphofructokinase
Phkg1	phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1
PKA	protein kinase A
PLOD1	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1
PLOD2	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2
Prox1	Prospero Homeobox 1
Pygm	glycogen phosphorylase
RRBP1	ribosome binding protein 1
Scn1b	sodium voltage channel subunit beta-1 protein
SEMA6A	semaphorin 6A
Shh	Sonic hedgehog

TGF-beta	transforming growth factor beta
TIMP	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1
VLL	ventrolateral lip
Wnt	Wingless-related integration site
WT	wild type = divoký fenotyp
Xp21	lokus 21 na krátkom (p) ramene chromozómu X
Zn <sup>2+</sup>	zinočnatý kation



# 1 Úvod

*DMD* gén, kódujúci proteín dystrofín, patrí medzi najväčší gén v ľudskom tele. Dystrofín je pomerne dlho podrobne študovaným proteínom, ktorého dysfunkcia bola spojená so svalovými dystrofiami a inými patológiami. Napriek intenzívnemu výskumu a množstvu publikovaných prác, nie je funkcia dystrofínu zatiaľ presne objasnená. Primárnou a najčastejšie popisovanou funkciou proteínu dystrofín v zdravých svaloch je prepojenie aktínových vlákien cez DGC komplex s extracelulárnou matrix. Týmto spôsobom je v svalových vláknach zabezpečené efektívne pracovanie kontraktilného aparátu (sarkoméry) počas kontrakcie a relaxácie svalového tkaniva. Na základe rozsahu a typu mutácie v *DMD* géne rozlišujeme „ťažšiu“ Duchennovu a „ľahšiu“ Beckerovu formu dystrofie. Primárne postihnutie kostrového svalstva pacientov s *DMD/BMD* je často sprevádzané výskytom kardiomyopatií, mentálnym zaostávaním a inými patológiami. Funkcia dystrofínu začala byť študovaná okrem postnatálneho života aj v prenatálnych štádiách vývoja plodu. V tejto práci som sa zamerala primárne na ovplyvnenie vývoja a rastu svalového tkaniva v prenatálnom štádiu pri chýbaní alebo dysfunkcii dystrofínu. Súčasný prístup v molekulárnej biológii umožňujú analyzovať dysfunkciu dystrofínu na transkripčnej úrovni. Takýmto spôsobom bolo identifikovaných množstvo génov, ktorých regulácia transkripcie je vplyvom mutácie *DMD* génu ovplyvnená. Zvýšená alebo znížená úroveň transkripcie (up/down regulácia) génov závislých na dystrofíne, má rovnako ako dystrofín samotný, vplyv na správny vývoj svalového tkaniva. Doterajšie poznatky neposkytujú presné informácie o mechanizme tejto regulácie, ktorá sa prejavuje v zmenenom vývoji svalového tkaniva. V tejto práci sú zhrnuté doterajšie poznatky o narušenej myogenéze vplyvom mutácii v *DMD* géne. Úplne pochopenie úlohy dystrofínu v procese myogézy by prinieslo možnosť vývoja presnejších a účinnejších cielených liečebných prístupov.

Cieľom bakalárskej práce bolo zhrnúť doterajšie poznatky o vývoji a raste svalového tkaniva, ktoré je ovplyvnené mutáciami v géne, ktorý kóduje proteín dystrofín. Ďalej popísať molekulárne mechanizmy a fenotypové prejavy defektov, ktoré sú spojené s mutáciami v géne pre dystrofín, a teda aj zníženou produkciou dystrofínu.

## 2 Vývoj svalového tkaniva

Na základe rozdielnej štruktúry poznáme 3 typy svalového tkaniva, a to konkrétne hladké, srdcové a kostrové svalové tkanivo (priečne pruhované svalové tkanivo).

Vývoj a diferenciácia svalového tkaniva je vysoko konzervovaný proces, ktorý je riadený programovanou génovou expresiou v čase a priestore. Tento proces zahŕňa vznik embryonálnych myogénnych prekursorov, ich diferenciáciu na myoblasty. Konkrétne u kostrového svalového tkaniva to zahŕňa aj splývanie embryonálnych myoblastov do mnohojadrových svalových vlákien a následné správne fungovanie kontraktilného aparátu a sarkoméru, správny rast svalov, regeneráciu pri zranení a poškodení (Sher et al. 2012)\*.

### 2.1 Formovanie somitov

Počas gastrulácie sa vytvárajú 3 zárodočné vrstvy (ektoderm, mezoderm, endoderm). Mezoderm sa ďalej delí na 4 kompartmenty: axiálny, paraxiálny, stredný mezoderm a laterálny platničkový mezoderm. Z paraxiálneho mezodermu vznikajú somity, ktoré sa diferencujú na ventrálnu mezenchymálnu polovicu somitu (sklerotóm) a dorzálnu epiteliálnu polovicu (dermomyotóm) (Christ and Ordahl 1995) pôsobením signálnych molekúl *Shh* (notochord), *Wnts* (neurálna trubica), *BMP* (LPM). Dermomyotóm možno rozdeliť ešte na centrálny dermomyotóm (*cDM*), ventrolaterálny (*VLL*), dorzomediálny (*DML*) dermomyotóm (Chal and Pourquie 2017). Bunky lokalizované na ventrálnej strane dermomyotómu sa označujú ako prekursori hypaxiálnych svalov (svaly končatín, bránice), zatiaľ čo bunky na dorzálnnej strane dermomyotómu ako prekursori epaxiálnych svalov (hlboké chrbtové svaly) (Tajbakhsh and Buckingham 1999). Signálne molekuly ako je *Shh* a *Wnt* aktivujú helix-slučka-helix (helix-loop-helix) transkripčné faktory *MRFs*, konkrétne *Myf5* signalizáciu čím sa zahajuje myogenéza v novo vytvorených somitoch (Cossu et al. 2000). Podľa štúdie Ott et al. (1991) *Myf5* je detekovateľný od 8. embryonálneho dňa v dorzálnnej časti dermomyotómu, pred tým ako je vytvorený myotóm a sklerotóm. V dorzálnnej a ventrálnej časti dermomyotómu sú prítomné skoré progenitorové bunky pozitívne na *Pax3* (Kassar-Duchossoy 2005), pričom podľa výsledkov Daston et al. (1996), *Pax3* reguluje migráciu delaminovaných buniek z laterálnej časti dermomyotómu do končatín. *Pax7* pozitívne progenitorové bunky sú lokalizované skôr v centrálnej časti dermomyotómu a podieľajú sa na fetálnom vývoji svalov a satelitných buniek (Kassar-Duchossoy 2005; Seale et al. 2000).

---

\* Označenie sekundárnej citácie

## 2.2 Transkripčné faktory *MRFs* a ich funkcia počas myogenézy

Po tom ako delaminované bunky z dermomyotómu migrovajú do končatinového pletenca začnú exprimovať *Myf5* a *MyoD* a diferencujú na myoblasty (Tajbakhsh a Buckingham 1994; Rudnicki et al. 1993). Z myoblastov vznikajú jednojadrové myocyty exprimujúce myogénin, ktorý podporuje splývanie myocytov navzájom za vzniku myofibril – primárnych vlákien (Christ and Ordahl 1995). Štvrtým transkripčným faktorom z rodiny *MRF* je *Myf6* (*MRF4* – herkulín), ktorý na rozdiel od *Myf5*, *MyoD* a myogéninu je exprimovaný hlavne až vo fetálnych a dospelých vláknach kostrového svalstva (Muntoni et al. 2003).

## 2.3 Rozdelenie myogenézy do dvoch vývojových fáz

Primárna (skorá) myogenéza – počas tejto fázy progenitorové jednojadrové svalové bunky *Pax*<sup>3+</sup> spolu splývajú a vytvárajú mnohoadrové myotubuly, z ktorých vznikajú primárne svalové vlákna (myofibrily). Počas primárnej fázy vzniká skorý myotóm a svaly končatín, na ktorých sa bude zakladať dospelé svalové tkanivo. Primárne svalové vlákna exprimujú I/beta (pomalý) MyHC a ľahkú myozínovú hlavičku. Primárna myogenéza prebieha u myši medzi E10.5-E12.5 embryonálnym dňom vývoja (Biressi et al. 2007; Chal and Pourquié 2017)\*.

Sekundárna (fetálna) myogenéza – počas tejto fázy progenitorové svalové bunky *Pax*<sup>3+</sup> začínajú exprimovať *Pax7* a downregulovať *Pax3*, pričom dochádza ku splývaniu fetálnych myoblastov s primárnymi vláknami (myofibrilami). Zároveň fetálne myoblasty splývajú medzi sebou, čím vznikajú sekundárne svalové vlákna (fetálne vlákna). Sekundárne svalové vlákna exprimujú rýchly MyHC a táto fáza u myši prebieha medzi E14.5-E17.5 embryonálnym dňom vývoja (Biressi et al. 2007; Chal and Pourquié 2017)\*.

## 2.4 Satelitné bunky

Satelitné bunky sú bunky, ktoré sa v dospelom kostrovom svale pri poraní alebo veľkej námahe množia a diferencujú na svalové bunky, čím zabezpečujú regeneráciu svalu. Tieto bunky sú *Pax7*<sup>+</sup> a od neskorého fetálneho štádia sú v kostrovom svale lokalizované medzi bazálnou laminou a svalovými vláknami v pokojnom štádiu. Ako bolo ukázané podľa štúdie Gros et al. (2005), väčšina satelitných buniek pozitívnych na *Pax7* pochádza z centrálného dermomyotómu.

### **3 Zloženie kostrového svalu**

#### **3.1 Sarkoméra**

Sarkoméra je základná kontraktilná jednotka myofibril, ktorá je tvorená aktínom, myozínom, titínom, nebulínom a inými proteínmi (tropomyozínom, troponínom). Sarkoméra je rozdelená do niekoľkých oblastí: I-prúžku (svetlé pásmo) tvoreného len aktínovými tenkými filamentami, A-prúžku (tmavé pásmo) tvoreného myozínovými hrubými filamentami, ktoré zároveň prekrývajú aktínové filamenty, Z-línie, ktorá kotví tenké aktínové filamenty, M-línie kotviacej myozínové filamenty, H-pásma tvoreného myozínovými filamentami (Squire 1997).

Pozdĺž tenkých aktínových filament sa tiahne troponín, tropomyozín a nebulín. Interakcia myozínových filamentov s aktínovými filamentami prebieha cez myozínové hlavy, ktoré vytvárajú s aktínovými filamentami interaktívne mostíky (Squire 1997).

Myofibrily tvorené sarkomérami sú zoskupené do svalového vlákna, ktoré obaluje bunková membrána – sarkoléma. Sarkoléma je obklopená bazálnou membránou a medzi týmito membránami sú lokalizované satelitné bunky, ktoré slúžia na regeneráciu svalového tkaniva pri poškodení, zranení (Yin et al. 2013).

#### **3.2 Stabilizácia myofibril väzbou ku sarkoléme**

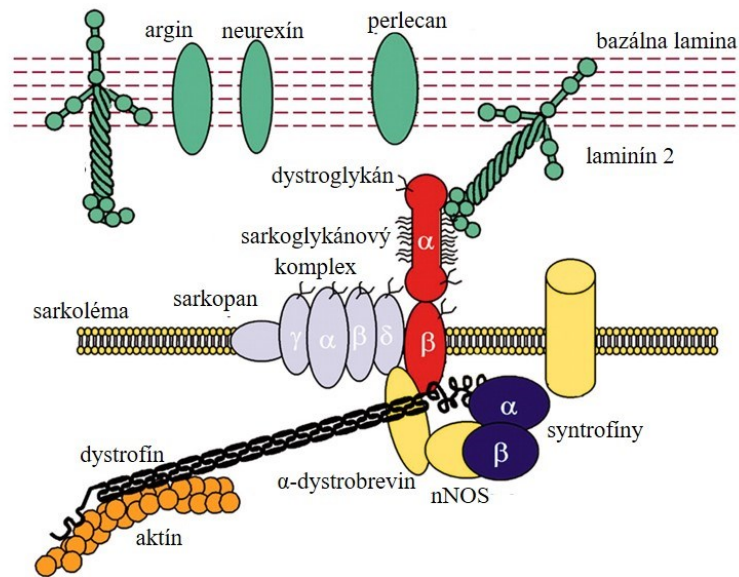
Pre správnu a efektívnu svalovú prácu je potrebné, aby myofibrily boli ukotvené ku sarkoléme. Toto prepojenie je sprostredkované kostamérmi. Kostaméry pozostávajú z dystrofín-glykoproteínového komplexu a vinculín-talín-integrínového systému. Úlohou kostamérnych regiónov je signalizácia, mechanické spojenie a stabilizácia. Stabilizácia pri kontrakcii a relaxácii svalu je zabezpečená práve kostamérmi, ktoré prenášajú vzniknutú silu do extracelulárnej matrix z kontraktilného aparátu (myofibril) (Anastasi et al. 2008). Podľa Chiesi et al. (1981), myofibrily sú Z-líniou cez kostaméry ukotvené k vnútronému povrchu sarkolémy. Podľa Porter et al. (1992), kostaméry kotvia myofibrily aj cez M-líniu ku sarkoléme.

##### **3.2.1 Vinculín-talín-integrínový systém**

Integríny sú heterodimérické proteíny zložené z alfa a beta podjednotky, pričom každý integrín pozostáva z veľkej extracelulárnej domény a krátkej transmembránovej domény (Burrige a Chrzanowska-Wodnicka 1996). Na cytoplazmatickú beta podjednotku integrínu sa viaže cytoplazmatický proteín talín, ktorý viaže aktínové vlákna (Calderwood et al. 1999). Talín viaže vinculín, ktorý cez desmín viaže Z-disk myofibril. Takýmto spôsobom je zabezpečené prepojenie myofibril so sarkolémou a extracelulárnou matrix (Feher 2017).

### 3.2.2 Dystrofín-glykoproteínový komplex (DGC)

DGC je multimerný komplex, ktorý je tvorený transmembránovými, cytoplazmatickými a extracelulárnymi proteínmi – sarkoglykánmi, dystroglykánom, dystrobrevínom, syntrofínom, sarkopánom, dystrofínom, nNOS a kaveolínom-3. Funkciou tohto komplexu je zabezpečiť mechanické prepojenie, stabilizáciu a signalizáciu medzi cytoskeletom, membránou a extracelulárnou matrix (Lapidos et al. 2004). Dystroglykán je zložený z dvoch domén – alfa-dystroglykánu a beta-dystroglykánu. Extracelulárna doména (alfa-dystroglykán) obsahuje väzbové miesto pre laminín, ktorý prepája sarkolému s bazálnou laminou a extracelulárnou matrix (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992). Intracelulárna doména beta-dystroglykánu ukotvená v sarkoléme viaže intracelulárne dystrofín. Dystrofín viaže N-koncom aktínové vlákna. Na vonkajšej strane sarkolémy intracelulárna doména beta-dystroglykánu viaže extracelulárnu doménu alfa-dystroglykánu (Michele and Campbell 2003)\*. Kaveolín-3 je lokalizovaný v sarkoléme. Svojou WW doménou priamo rozpoznáva C-koniec beta-dystroglykánu (Sotgia et al. 2000). DGC komplex ďalej pozostáva z alfa-dystrobrevínu, nNOS, syntrofínu, sarkopánu, sarkoglykánového komplexu, tak ako je naznačené na obrázku 1 (Michele and Campbell 2003). Ako bolo zhrnuté v Durbeej et al. (2000), sarkoglykánový komplex je komplex transmembránových proteínov, ktoré jedenkrát prechádzajú cez membránu a spolu so sarkopánom vytvárajú subkomplex DGC, ktorý stabilizuje dystroglykán v sarkoléme. Syntrofín exprimuje 3 izoformy (alfa1, beta1 a beta2), ktoré asociujú s dystrofínom/utrofínom, alfa-dystrobrevínom. Konkrétne alfa1-syntrofín môže fungovať ako adaptérový proteín, ktorý prepojuje signalizáciu nNOS s dystrofínovým komplexom (Peters et al. 1997; Kameya et al. 1999). Dystrobrevín C-koncovým špirálovým (helixovým) coiled-coil motívom špecificky viaže C-koniec dystrofínu (Sadoulet-Puccio et al. 1997).



**Obr. 1:** Štruktúrne prepojenie aktínových vlákien so sarkolémou (prevzané z Michele and Campbell 2003 a upravené podľa potrieb bakalárskej práce). Prepojenie aktínových vlákien so sarkolémou prostredníctvom dystrofinu a DGC komplexu (alfa-dystrobrevín, nNOS, syntrofiny, sarkoglykánový komplex a dystroglykán). Afla podjednotka dystroglykánú prepája sarkolému cez laminin s bazálnou laminou.

### 3.2.3 Proteín dystrofin

Proteín dystrofin je lokalizovaný na vnútornej strane plazmatickej membrány, viaže aktínové vlákna a asociuje s dystrofin-glykoproteínovým komplexom, čím prepája vnútorný cytoskelet bunky s extracelulárnou matrix (Le et al. 2018). *DMD* gén, ktorý kóduje proteín dystrofin, je lokalizovaný na krátkom ramene X chromozómu (Xp21) (Bodrug et al. 1987). *DMD* gén obsahuje približne 2.5 Mbp usporiadaných do 79 exónov. Expresia je spúšťaná zo 7 rôznych promótorov. Najdlhšie transkripty mRNA, tzv. „full-length“, sú transkribované z 3 promótorov označovaných ako B (brain), M (muscle) a P (Purkinje) podľa predominantného miesta expresie a sú lokalizované na 5' konci génu. Každá mRNA kóduje jeden z troch 427-kDa proteínov líšiacich sa iba sekvenciou na N-konci. Proteíny sa označujú : Dp427(B), Dp427 (M) a Dp427 (P). *DMD* gén kóduje celkovo 7 izoforiem proteínu. Menšie izoformy sú produkované z vnútorných distálnejšie lokalizovaných promótorov. Tieto promótory sú exprimované v retine (R: Dp260), mozgu (B3: Dp140), Schwannových bunkách (S: Dp116) alebo v celkom organizme (G: Dp71) (Blake et al. 2002)\*.

### 3.2.3.1 Štruktúra proteínu dystrofínu Dp427

Izoforma dystrofínu Dp427 sa nachádza na cytoplazmatickej strane sarkolémy svalových buniek (Porter et al. 1992). Proteín dystrofín je zložený zo 4 domén : amino-koncovej domény (NH<sub>2</sub> domény), ktorá sa viaže na aktínové vlákna (ABD1), centrálnej tyčovej domény (rod doména), domény bohatej na cysteín a karboxylového konca (-COOH doména) (Gao and McNally 2015).

### 3.2.3.2 Funkčná úloha domén proteínu dystrofínu Dp427

NH<sub>2</sub> doména (ABD – actin-binding domain) dystrofínu pozostáva z dvoch homológnych domén kalponínu, ktoré sa označujú ako CH1 a CH2. Tieto dve domény sa nachádzajú aj v iných cytoskeletálnych proteínoch ako je utrofín, fimbrín. V rámci NH<sub>2</sub> domény CH1 priamo viaže F-aktín sarkoméru (Norwood et al. 2000).

Centrálnu doménu dystrofínu tvorí tyčová „rod“ doména, ktorá pozostáva z 24 opakujúcich sa trojito špirálovitých (helikálnych) podjednotiek (Mandel 1989). Rod doména je zároveň prerušená štyrmi, tzv. pántami – oblasťami bohatými na prolín čo celkovo prispieva k elasticite proteínu (Koenig and Kunkel 1990). Časť podjednotiek rod domény (bázických) je schopná na základe elektrostatických interakcií viazať F-aktín, a teda rod doména ma taktiež aktín-väzbovú aktivitu (Amann et al. 1998).

Na konci rod domény je štvrtý pánt bohatý na prolín, po ktorom nasleduje WW doména. WW doménu tvorí 38-40 aminokyselín. Pomenovaná je podľa dvoch vysoko konzervovaných tryptofánov (W), ktoré sú lokalizované medzi 20-22 aminokyselinou. Štúdia Rentschler et al. (1999) ukázala, že táto doména je schopná viazať beta-dystroglyklán cez jeho koncový karboxy motív Prolín-Prolín-x-Serín (PPxS).

Nasledujúcou doménou je doména bohatá na cysteín označovaná ako CR doména. CR doména pozostáva z dvoch motívov: EF-rúk a ZZ-domény. Motív EF-rúk je tvorený dvomi alfa-helixami, ktoré sú prepojené krátkou slučkou, ktorá vytvára väzbové miesto pre vápenaté katióny (Ca<sup>2+</sup>). Za prítomnosti Zn<sup>2+</sup> sa vytvára ZZ-doména so sekvenčným motívom Cys-x<sub>2</sub>-Cys (Koenig et al. 1988; Ponting et al. 1996). Tak ako WW doména, tak aj motív EF-rúk a ZZ-doména viaže beta-dystroglyklán, ktorý kotví dystrofín v sarkoléme (Rentschler et al. 1999; Hnia et al. 2007).

Poslednou doménou proteínu dystrofínu je C-koncová doména (-COOH doména) označovaná aj ako CC doména, pretože je tvorená dvomi coiled-coil alfa-helixami, ktoré sú prepojené krátkou slučkou tvorenou prolínmi (2-7 prolínov). CC doména viaže syntrofín cez

väzbové miesto na prvom alfa-helixe, a teda táto doména zabezpečuje proteín-proteínovú interakciu (Derek J.Blake et al. 1995). CC doména špecificky interaguje s dystrobrevínom, ako bolo spomínané vyššie (Sadoulet-Puccio et al. 1997).

#### 4 Mutácie v *DMD* géne pre dystrofín

Mutácie v *DMD* géne, teda v géne kódujúcom proteín dystrofín, vedú ku vzniku dystrofinopatii, ako je Duchennova Muskulárna Dystrofia (DMD), Beckerova Muskulárna Dystrofia (BMD), ale aj kardiomyopatiám a iným. Tieto ochorenia sú spôsobené deléciami, duplikáciami jedného alebo viacerých exónov alebo malými mutáciami (menšími ako jeden exón). Za malé mutácie možno považovať malé delécie, duplikácie, dobové mutácie, nonsense mutácie, missense mutácie. Podľa štúdie TREAT-NMD DMD Global database, delécie spôsobujú ~ 68 %, duplikácie ~ 11 % a malé mutácie ~ 20 % prípadov. Tieto mutácie sa môžu vyskytnúť kdekoľvek na géne, ale najčastejšia mutačná frekvencia delécii a duplikácii (veľkých mutácii) je medzi 45-55 exómom a 2-20 exómom (Bladen et al. 2015). To, či sa prejaví ťažšia alebo ľahšia forma dystrofie, závisí od toho, či delécie/duplikácie vznikajú v čítacom rámci alebo mimo neho. Ak počet delécii/duplikácii nukleotidov v rámci exónu je deliteľné číslom 3, tak vzniknutá mutácia neporušuje čítací rámec (in-frame mutácia). Zo zostrihutej mRNA je syntetizovaná síce funkčná forma dystrofinu (prítomná je -N aj -C terminálna doména), ale s kratšou/dlhšou centrálnou rod doménou, čo sa prejavuje ako BMD. Ku posunu a porušeniu čítacieho rámca (out-of-frame) dochádza, pokiaľ počet deletovaných/duplikovaných nukleotidov exónu nie je deliteľný číslom 3. Výsledkom takýchto mutácii je vznik predčasného stop kodónu a následnej syntézy krátkeho, nefunkčného dystrofinu, čo vedie k ochoreniu s fenotypom DMD (Aartsma-Rus et al. 2016)\*. Medzi malé mutácie patria bodové mutácie (malé delécie /inzercie), ktoré opäť môžu vytvoriť predčasný stop kodón. Bodovými mutáciami sa taktiež môžu narušiť zostrihové miesta intrónov (splice site), ktoré sú za normálnych okolností rozpoznávané zostrihovým aparátom. V prípade mutácie dochádza ku vyštiepeniu aj exónu spolu s intrónom, ktorého zostrihové miesto bolo mutované a exón je vylúčený z mRNA. Aj v tomto prípade fenotypový prejav ochorenia závisí od toho, či vyštiepenie exónu porušilo čítací rámec alebo nie. Medzi malé mutácie zaradíme aj nonsense a missense mutácie, ktoré sú však oproti iným zriedkavejšie (Aartsma-Rus et al. 2016; Bladen et al. 2015).



## 5 Duchennova a Beckerova muskulárna dystrofia

Ako už bolo spomínané, Duchennova a Beckerova muskulárna dystrofia sú spôsobené mutáciou génu *DMD* na Xp21 (Hoffman and Kunkel 1989). Svalové dystrofie sú recesívne, geneticky podmienené ochorenia, ktoré postihujú väčšinou chlapcov. Ženy (matky) sú v tomto prípade prenášačkami. Súčasný výskyt DMD ochorenia je u narodených chlapcov 1:5000, zatiaľ čo u BMD pacientov 1:17 000. Chlapci postihnutí DMD ochorením sa rodia bez príznakov, ktoré sa však začínajú objavovať približne od tretieho roku života. Prvými príznakmi je neskorší nástup chodenia, nestabilná a kolísavá chôdza. Pri chôdzi nastupujú na špičky kvôli skráteniu trojhlavých lýtkových svalov. Medzi významný indikátor ochorenia patrí Gowersov manéver. Pri tomto manévri chlapci používajú ruky a paže na to, aby sa zdvihli zo zeme. S postupom ochorenia sú charakteristické aj nasledovné znaky: bedrová hyperlordóza a pseudohypertrofia lýtok. Chlapci okolo 13. roku života usadajú na invalidný vozík. Výrazná slabosť svalov sa rozvíja aj na horných končatinách a dýchacích svaloch. Vplyvom ochabnutia svalov chrbta dochádza k rozvoju skoliózy. S muskulárnou dystrofiou je spojená aj hypertrofická kardiomyopatia a srdcová arytmia, ktorá nastupuje v období puberty. Pacienti trpiaci DMD ochorením sa dožívajú 25-30 rokov a príčinou smrti býva dychová nedostatočnosť a zlyhanie srdca (Mrázová 2016). Z patofyziologického hľadiska chýbanie dystrofinu a narušenie celého DGC komplexu vedie ku krehkosti, nadmernej priepustnosti membrány, narušeniu homeostázy vápnika a oxidačnému stresu. Tieto abnormality vedú ku nekróze svalových buniek (Deconinck a Dan 2007). U pacientov s BMD ochorením sa svalová slabosť začína prejavovať podstatne neskôr (okolo 10 roku života). Funkčnosť dystrofinu je čiastočne zachovaná a pacienti sú schopní chodiť až do dospelosti. Z tohto dôvodu sa Beckerova svalová dystrofia (BMD) označuje aj ako „ľahšia“ forma svalovej dystrofie (Mrázová 2016).

## 6 Vplyv mutácií v *DMD* géne na vývoj svalového tkaniva

Niekoľko štúdií ukázalo a podporilo myšlienku, že mutácie v géne pre proteín dystrofin môže významne ovplyvniť myogenézu u ľudí, niektorých modelových organizmov (napr. *mdx* myš, danio pruhované) alebo v modeloch odvodených od pluripotentných kmeňových buniek. Pluripotentné kmeňové bunky sú bunky, z ktorých môžu vzniknúť všetky typy buniek organizmu. Mutácie v *DMD* géne môžu myogenézu ovplyvniť už na úrovni regulácie transkripcie cez zmeny v signálnych kaskádach. Fenotypovým prejavom je napr. chybné zarovnanie myotubulov počas myogenézy, narušená lokalizácia jadri v svalových vláknach, prípadne iný fenotyp (Merrick et al. 2009; Bassett 2003; Ghahramani Seno et al. 2010; Mournetas et al. 2021; Jin and Takahashi 2012).

Štúdia Clerk et al. (1992) uvádza, že v ľudskom plode je dystrofín detekovateľný už v 9. týždni tehotenstva. Dystrofín bol študovaný v ľudských fetálnych kostrových svaloch medzi 9. až 26. týždňom tehotenstva. Imunohistologické farbenie dystrofínu odhalilo, že v rôznych štádiách tehotenstva sú prítomné rôzne izoformy dystrofínu. Od 26. týždňa tehotenstva boli intenzívne zafarbené všetky myotubuly, čo svedčí o prítomnosti dystrofínu (Clerk et al. 1992). U plodov, ktoré mali podozrenie na DMD, boli preukázané histologické zmeny v štruktúre svalových vlákien v porovnaní s histologickým obrazom svalov u zdravých plodov. Mužské plody s mutovaným génom pre dystrofín vykazovali od 16. týždňa tehotenstva zvýšenú variabilitu vo veľkosti svalových vlákien. Priemer takýchto svalových vlákien bol o 50 % väčší ako v kontrolných vzorkách (Toop a Emery 1974). Histologicky bolo tiež preukázané zväčšenie jadier svalových buniek u plodov, ktoré mali podozrenie na DMD. Celková priemerná veľkosť jadier svalových vlákien u DMD plodu je signifikantne väčšia ( $35 \mu\text{m}^2 \pm 4.2$ ) ako v kontrolnej skupine ( $28 \mu\text{m}^2 \pm 9.2$ ) (Vassilopoulos and Emery 1977). Vassilopoulos a Emery (1977)\* uvádzajú, že tieto zmeny vo veľkosti jadier môžu pravdepodobne súvisieť so zmenou génovej expície. Výskyt týchto abnormalít podporil myšlienku, že DMD sa môže začínať prejavovať už prenatálne od druhého trimestra tehotenstva (Emery 1977). Pozorované zmeny sú veľmi podobné pre-klinickým zmenám vo fenotype u DMD pacientov (Toop a Emery 1974).

## **6.1 Poruchy myogenézy u modelových organizmov**

### **6.1.1 *Mdx* myš**

Merrick et al. (2009) demonštroval poruchy v myogenéze na myšiach s mutáciou v *DMD* géne pre dystrofín a fenotypovým prejavom DMD (ďalej *Mdx* myš). Muskulárna dystrofia začína v skorých štádiách embryonálneho vývoja. Expícia *DMD* génu pre dystrofín prebieha od 9.5 dňa embryonálneho vývoja myši (E9.5) (Houzelstein et al. 1992). Je to čas medzi expíciou *Myf5* v štádiu E8.5 a expíciou prvého ťažkého myozínového reťazca (MyHC) v štádiu E10.5 (Lyons et al. 1990; Ott et al. 1991). Nedostatok proteínu dystrofín spôsobuje oneskorenie aj kvalitu myogenézy. *Mdx* myši vykazovali nasledovné morfológické zmeny svalov: hypotrofiu a celkovo znížený počet myotubulov, redukciu hustoty medzirebrových svalových vlákien v E17.5 o 37,5 %, pokles hustoty svalových vlákien v končatinách, vysoký počet centrálne lokalizovaných jadier v myocytoch, vychýlenie myotubulov, ich vetvenie a štiepenie. Vetvenie a štiepenie svalových vlákien bolo pozorované u *mdx* embryí medzi E13.5-E17.5 v epaxiálnych, hypaxiálnych svaloch a svaloch tváre. Mechanizmus zarovnania svalových vlákien je významne narušený v porovnaní s WT (divokým typom). V medzirebrových svaloch bolo v štádiu E13.5 až 12 % myotubulov nesprávne zarovnaných.

Jadrá svalových buniek u *mdx* embryí v štádiu E15.5 sú lokalizované prevažne v stredovej línii myotubulov ďalej od seba, zatiaľ čo u WT embryí je rozmiestnenie svalových jadier rovnomerné pozdĺž myotubulov (Merrick et al. 2009).

Rovnako, kmeňové bunky vykazujú u myši vplyvom absencie dystrofinu odlišnosti oproti WT. Kmeňové bunky týchto myši vykazovali od E11.5 štádia hyperproliferáciu (nadmerné delenie) a zvýšenú apoptózu (Merrick et al. 2009). Podľa Merrick et al. (2009) sú *Pax7*<sup>+</sup> kmeňové bunky kostrového svalstva u *mdx* embryí oslabené a medzi E15.5-E17.5 dochádza dokonca k ich podstatnému vyčerpaniu. Celkové množstvo proteínu Pax7 bolo u dystrofických embryí redukované o 15 %. Poškodenie regeneračného aparátu u *mdx* myši je prítomné od narodenia, čo môže zvyrazňovať postupné poškodenia regeneračných procesov v dospelosti (Merrick et al. 2009). Podľa Merrick et al. (2009), abnormality regeneračného aparátu môžu byť spôsobené práve nedostatkom Pax7.

Medzi E13.5-E17.5 embryonálnym štádiom bolo u *mdx* myši nájdených, v priemere, 3-5 nadmerne skladaných (fold excess) kaveolínov-3. Tento „fold excess“ naznačuje narušenie expresie kaveolínu-3. Toto zistenie je významným skorým ukazovateľom nedostatku dystrofinu (Merrick et al. 2009).

Ďalším patologickým prejavom absencie dystrofinu je nesprávna lokalizácia rýchleho myozínu (FMyHC). U *mdx* embryí to spôsobuje vývojové oneskorenie, percentuálne zvýšenie FMyHC-pozitívnych myotubulov a celkové zvýšenie FMyHC proteínu (Merrick et al. 2009). U WT embryí je FMyHC detekovateľný v sekundárnych myotubuloch od štádia E11.5 a od štádia E15.5 už približne polovica sekundárnych myotubulov obsahuje FMyHC (Merrick et al. 2007). Myozín rýchleho typu je u *mdx* embryí detekovaný v sekundárnych myotubuloch až od štádia E13.5, a to len vo veľmi malom množstve. Pri porovnaní s WT je signifikantný nárast proteínu FMyHC a zastúpenie FMyHC-pozitívnych myotubulov u *mdx* zaznamenaný od štádia E15.5 a E17.5. Tento nárast je pravdepodobne spôsobený tzv. „catch-up“ procesom, teda procesom, ktorý sa snaží dobehnúť oneskorenie zo štádia E13.5 (Merrick et al. 2009).

Výsledky štúdie Merrick et al. (2009) naznačujú zásadnú úlohu dystrofinu pri diferenciácii svalov, ktorá je u *mdx* embryí narušená. Zlyhanie diferenciácie svalov u *mdx* myši vedie k zmenám v štruktúre a funkcii svalstva, ktoré sú charakteristické pre fenotyp DMD.

### 6.1.2 Dáňio pruhované (*Danio rerio*)

Ďalším zvieracím modelovým organizmom použitým pri objasňovaní funkcie dystrofinu bolo dáňio pruhované (*Danio rerio*), ďalej dáňio. Bassett et al. (2003) pri svojich experimentoch dokázali, že dystrofin je nevyhnutný u embryí dáňia pre správnu stabilitu svalových úponov a jeho deficit vedie k postupnej strate celistvosti svalu. Gén *Sap* (*Sapje*) u dáňia pruhovaného bol identifikovaný, ako ortológ ku *DMD* génu. U homozygotného mutovaného „*sapje*“ embrya sú po 48 hodinách od oplodnenia evidentné myotomálne lézie po počiatočnom vývoji svalov, počas ktorého svalové vlákna diferencovali normálne. Pri poškodených vláknach dochádza ku ich oddeleniu od vertikálneho myosepta na hranici somitov v svalovom tkanive rýb. Myoseptum je membrána, ktorá oddeľuje monoméry (jednotlivé oddiely svalov) u nižších stavovcov a embryí vyšších stavovcov. Takto oddelené a stiahnuté vlákna od myosepta mali voľné konce, boli asi o polovicu kratšie ako bola ich pôvodná dĺžka a obsahovali stlačené sarkoméry. Dá sa povedať, že kvôli absencii dystrofinu dochádza ku zlyhaniu špecializovaného prepojenia medzi sarkolémou a bazálnou laminou myosepta, čo súvisí so stratou integrity membrány. Skrátenie vlákien a sarkoméry vedie ku výraznému narušeniu pravidelného sarkoméneho pruhovania, prípadne až k jeho úplnému chýbaniu (Bassett 2003). To, či oddelenie svalových vlákien nastáva ešte pred bunkovou smrťou, odhalili Bassett et al. (2003). Tí pozorovali kondenzované jadrá, čo indikovalo apoptózu jadier u vlákien, ktoré boli oddelené a stiahnuté od membrány. Táto abnormalita bola evidovaná u 74 % mutovaných embryí dáňia. U mutovaných avšak nepostihnutých svalových vlákien alebo u vlákien WT embryí nebola pozorovaná kondenzácia jadier. Výsledky tejto štúdie teda naznačujú, že zlyhanie pripútania svalov predchádza apoptóze a fibróze svalových vlákien (Bassett 2003).

## 6.2 Oplyvnenie myogenézy na transkripčnej úrovni pri absencii proteínu dystrofin

Absencia dystrofinu ovplyvňuje expresiu mnohých génov. Tieto gény napríklad ovplyvňujú aktivitu niektorých kináz. Nesprávna expresia bola zaznamenaná aj u génov pre iónové kanály a génov kódujúcich molekuly, ktoré sú zapojené do metabolizmu svalov. Na základe transkriptomickéj analýzy Ghahramani Seno et al. (2010) bolo demonštrované, že dystrofin je zahrnutý v organizácii a správnom vývoji myofibríl. Výsledkom absencie dystrofinu sú chybné vyvinuté myofibrily, ktoré sú náchylné na fyzický stres a poškodenie (Ghahramani Seno et al. 2010).

V sarkolíme kostrových svalov sú napätím ovládané sodné kanály dôležité pre generovanie a šírenie akčného potenciálu (Mathes et al. 1991). V prípade iónových kanálov, je *Scn1b* v dôsledku nedostatku dystrofinu down-regulovaný (Ghahramani Seno et al. 2010). Gén *Scn1b* kóduje beta-1 podjednotku napätím ovládaných sodných kanálov (Patino et al. 2009). Na možnosť down-regulácie *Scn1b* poukázal už Pescatori et al. (2007) u detí do dvoch rokov, ktoré ešte nevykazovali známky DMD.

Pescatori et al. (2007) a Ghahramani et al. (2010) popísali aj dysreguláciu génov zapojených do svalového metabolizmu pri nedostatku dystrofinu. Kým gény pre svalovú glykogén fosforylázu (*Pygm*), kinázovú fosforylázu gamma 1 (*Phkg1*), svalovú fosfofruktokinázu (*Pfkm*), glycerol-3-fosfát dehydrogenázu 1 (*Gpd1*) boli down-regulované, naopak, up-regulácia kinázových transkriptov bola zaznamenaná u mitogenom aktivovanej proteínkinázy (Map3k7), inhibítora cyklín-dependentnej kinázy 1A (*Cdkn1a*), kalpain 3 (*Capn3*), lipin1 (*Lpin1*) a monoamín oxidázy B (*Maob*) (Ghahramani Seno et al. 2010).

### 6.2.1 Narušenie homeostázy vápnika

Dysregulácia expresie nastáva aj u génov, ktoré sú zahrnuté vo vývoji kostrového svalstva. Gén *Calsequestrin1* (*Casq1*) pre proteín CASQ1, ktorý viaže vápnik v sarkoplazmatickom retikule, je pod vplyvom absencie dystrofinu down-regulovaný (Ghahramani Seno et al. 2010). CASQ1 proteín je zásadný pre správny a normálny vývoj sarkoplazmatického retikula a následné skladovanie a uvoľňovanie vápnika z neho (Paolini et al. 2007). Predpokladá sa, že down-regulácia *Casq1* spôsobená absenciou dystrofinu, by mohla vysvetľovať narušenie homeostázy vápnika v svaloch u DMD pacientov (Ghahramani Seno et al. 2010).

### 6.2.2 Narušenie signalizačnej aktivity kináz

Ďalším down-regulovaným génom v moytubuloch deficientných na dystrofin je *Cmya5* kódujúci Myospryn (Ghahramani Seno et al. 2010). Myospryn v kostrových svaloch je kotviacim proteínom pre proteín kinázu A (PKA). Regulačná podjednotka RIIa proteín kinázy A je lokalizovaná spoločne s Myosprynom v bočnej oblasti kostaméry Z-disku (Reynolds et al. 2007). V svalových vláknach, ktorým chýba dystrofin, dochádza k nesprávnemu umiestneniu Myosprynu a RIIa regulačnej podjednotky PKA. Toto nesprávne umiestnenie má za následok zníženú aktivitu PKA (Reynolds et al. 2008). Správne fungovanie kináz, a teda aj PKA je dôležité, pretože môžu na dlhé vzdialenosti iniciovať signalizáciu aktiváciou transkripčných faktorov. Tieto transkripčné faktory následne aktivujú transkripciu svojich cieľových génov. Zároveň, kinázy môžu svoju aktivitu špecificky zamerať na oblasť, v ktorej sa aktivita kináz vyžaduje (Ghahramani Seno et al. 2010)\*. Takmer dve tretiny (220 z 333) sledovaných génov

bolo down-regulovaných. Toto narušenie expresie vybraných génov môže mať za následok nedostatočnú aktivitu transkripčných faktorov, ktoré sú asociované s myogenezou. Narušená signalizačná aktivita kináz môže teda súvisieť s narušenou myogenezou (Ghahramani Seno et al. 2010).

### **6.2.3 Zmena svalového vlákna vplyvom mutácie *DMD* génu**

Ghahramani Seno et al. (2010) sa venoval analýze expresie génov špecifických pre rýchle a pomalé svalové vlákna v prítomnosti down-regulovaného dystrofínu. Zistil, že nedostatok dystrofínu môže v konečnom dôsledku ovplyvniť typ vznikajúceho svalového vlákna. Kľúčovým krokom pri tvorbe pomalých svalových vlákien je up-regulácia svalovo-špecifického homeoboxu 1 (*Prox1*) (Roy 2001). V práci Ghahramani Seno et al. (2010) vzorky svalových vlákien s nedostatkom dystrofínu vykazovali trojnásobné zvýšenie *Prox1*. Naopak, gény *Mybpc2* a *Actn3* boli down-regulované. *Mybpc2* kóduje rýchly typ Proteínu C viažuci myozín. U dánia dochádza pri zníženej expresii rýchlej skeletálnej izoformy *Mybpc* (*Mybpc2*) ku myopatii, ktorá je charakterizovaná svalovou slabosťou (Li et al. 2016). Alfa-aktinín 3, kódovaný *Actn3*, je lokalizovaný v Z-línii sarkoméry. Vytvára zosieťovanie medzi aktínom a aktinínom. Expresia alfa-aktinínu je obmedzená na rýchle svalové vlákna typu II. Down-regulácia *Actn3* môže byť pravdepodobne spôsobená práve zvýšením *Prox1*, keďže expresia *Actn3* je viazaná na rýchly typ svalového vlákna. Zároveň je *Actn3* schopný sa prispôbiť zmenám v štruktúre kostrových svalov, kedy sa so zvyšujúcim počtom rýchlych svalových vlákien zvyšuje aj expresia *Actn3* (Ogura et al. 2008). To naznačuje, že v svaloch dystrofických pacientov sa môžu tvoriť pomalé svalové vlákna na úkor rýchlych.

### **6.3 Human induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC) model myogenézy u DMD**

Súčasná štúdia Mournetas et al. (2021) sa snaží popísať možné presné načasovanie nástupu DMD ochorenia v bunkách odvodených od hiPSC (human induced pluripotent stem cell – ľudské indukované pluripotentné kmeňové bunky). Analýza mRNA-seq v 25. deň vývoja ukazuje transkripčné dysregulácie. Tieto dysregulácie môžu súvisieť s následným DMD fenotypom. Najvýznamnejšie dysregulované gény súvisia s DAPC, narušením vápnikovej homeostázy, myomiR down-reguláciou, destabilizáciou sarkoméry, mitochondriálnou a metabolickou dysreguláciou a fibrózou (Mournetas et al. 2021).

### 6.3.1 Prejav fibrózy u DMD hiPSC

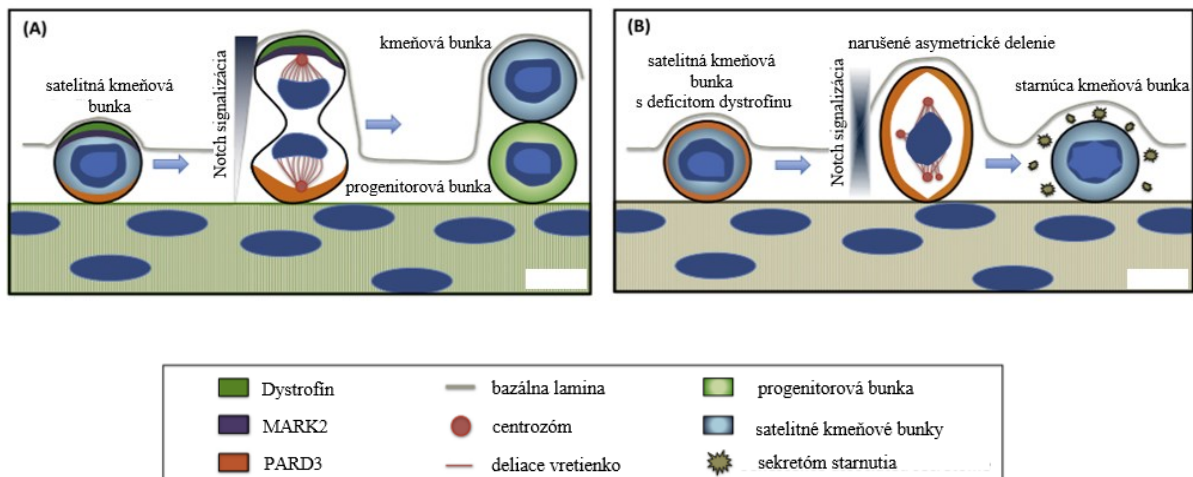
Od 10. dňa sa v bunkách bez mutácie v *DMD* géne exprimujú gény typicky pozorované počas somitogenézy. Jedná sa napríklad o gény *Pax3*, *NR2F2*, *MET*, *H19* a *IGF2*. Od tohto dňa bol zároveň u DMD buniek odvodených od hiPSC zaznamenaný prudký nárast počtu dysregulovaných, prevažne down-regulovaných, génov. Jednalo sa o takmer 10 % transkriptómu. Medzi down-regulovanými génmi boli napríklad *H19*, *IGF2*, *MET* a *SEMA6A*, ktoré patria ku génom charakteristickým pre somity. Naopak, ľahká up-regulácia nastala u génov, ktoré majú vzťah ku chondrocytom, čo potvrdzuje aj proteínová hladina GLI3 (Mournetas et al. 2021). GLI3 je DNA viažuci transkripčný faktor, ktorý funguje ako sprostredkovateľ Sonic hedgehog (Shh) signalizácie (Wang et al. 2007). Up-regulácia génov súvisiacich s chondrocytmi bola sprevádzaná up-reguláciou Sonic hedgehog signalačnej kaskády a génov zahrnutých v syntéze kolagénov. Výrazná up-regulácia je pozorovaná u génov, ktoré stimulujú syntézu kolagénu (*RRBPI*) a génov kódujúce stabilizáciu kolagénov (*PLOD1*, *PLOD2*). Down-regulovaný bol gén pre aktiváciu kolagenáz (*SETD7*). Naopak, dysregulácia P4H kolagénsyntázy pozorovaná nebola. V štádiu myotubulov v DMD bunkách bol významne up-regulovaný súbor génov súvisiacich s fibrózou. To dokazuje nadmerná expresia *ANGPT1*, rastového faktora spojivového tkaniva (*CTGF*), kolagénov (napr. *COL1A2*), matrix metalopeptidáz (*MMP*) a tkanivových inhibítorov metalopeptidáz (*TIMP*) (Mournetas et al. 2021). Down-regulácia nastala u myomiR miR-133, ktorý riadi expresiu *CTGF*, u ktorého je zaznamenaná nadmerná expresia. Rastový faktor spojivového tkaniva (CTGF) je významnou molekulou v procese fibrotizácie. Za normálnych okolností miR-133 významne reguluje produkciu CTGF (Duisters et al. 2009; Mournetas et al. 2021). Gény kaskády transformujúcich rastových faktorov (TGF)-beta nemali narušenú reguláciu. Tento poznatok je zaujímavý, pretože (TGF)-beta kaskáda je známa ako induktor syntézy kolagénov a induktor fibrózy (Vidal et al. 2008; Mournetas et al. 2021). Fibróza je typický jav sprevádzajúci DMD ochorenie, kedy je svalové tkanivo postupne nahradzované fibrotickým (Vidal et al. 2008). Poznatky od Mournetas et al. (2021) ukazujú na význam fibrózy svalových buniek, ako reálnej príčiny DMD, ktorá prevláda nad procesom fibrózy intersticiálnych buniek. Zároveň tieto poznatky naznačujú, že proces svalovej fibrózy by mohol skôr súvisieť s *Shh* signálnou kaskádou spolu s vnútornou up-reguláciou chondrocytov a kolagénov než s (TGF)-beta signalizáciou (Mournetas et al. 2021).

## 6.4 Vplyv mutácie dystrofínu na kmeňové bunky kostrového svalstva

Kmeňové bunky kostrového svalstva ovplyvňuje expresia dystrofínu. Narušená expresia dystrofínu spôsobená mutáciou v *DMD* géne vedie k negatívne ovplyvneniu regulácie polarizácie kmeňových buniek a poškodeniu ich asymetrického delenia. Expresia dystrofínu u WT myši v aktivovaných kmeňových bunkách je polarizovaná, čo znamená, že je situovaná na jednej strane bunky. Dystrofín v aktivovaných kmeňových/satelitných bunkách asociuje so serín-treonín kinázou Mark2 (microtubule affinity-regulating kinase 2), ktorá je tiež známa aj ako Par1b (partitioning-defective 1b). Mark2 je dôležitý regulátor polarizácie kmeňových buniek. Pokiaľ dôjde ku mutácii v *DMD* géne a následnej absencii dystrofínu, nastáva down-regulácia expresie *Mark2*. Táto down-regulácia zároveň spôsobuje neschopnosť lokalizovať regulátor polarizácie buniek *Pard3* na opačný pól bunky ako dystrofín (Dumont et al. 2015). V experimente od Dumont et al. (2015) väčšina satelitných buniek s deficitom dystrofínu vytvárala nízke hladiny *Mark2*. To spôsobilo, že *Pard3* nebol korektne polarizovaný na opačný pól bunky, ale rozložený po celej periférii bunky. Navyše, satelitné bunky, u ktorých bol vykonaný knockdown pre *Mark2* a *Pard3*, vykazovali v porovnaní s kontrolou o 35 % znížený podiel asymetrického delenia buniek. Zároveň, takto ošetrované bunky znížili expresiu *Myog* o 38 % a celkový počet myogénnych buniek (*Pax7+* alebo *Myog+*) poklesol o 50 %. Toto pozorovanie podporuje teda myšlienku, že down-regulácia *Mark2* spôsobená deficitom dystrofínu vedie ku spomínanému fenotypu s narušeným asymetrickým delením (Dumont et al. 2015).

Orientácia mitotického vretienka ku ose polarizácie určuje orientáciu bunkového delenia (Lu a Johnston 2013). K narušeniu orientácie deliaceho vretienka počas mitózy dochádza u satelitných kmeňových buniek *mdx* myši, teda myši s deficitom dystrofínu. Strata polarizácie satelitných buniek spôsobuje práve defekty v orientácii mitotického vretienka a v apikobazálnej orientácii pólov vretienka, čo vedie k poruchám v asymetrickom delení. Za normálnych okolností asymetrickým delením pozdĺž apikobazálnej osi vznikajú kmeňové bunky a myogénne progenitorové bunky. U buniek s deficitom dystrofínu však dochádza k zastaveniu bunkového cyklu (Dumont et al. 2015; Chang et al. 2016). Tieto procesy sú znázornené na obrázku 2A a 2B (Chang et al. 2016). Na určenie požadovanej apikobazálnej mitotickej osi a následnému asymetrickému deleniu buniek je nevyhnutná expresia dystrofínu, tak ako to bolo naznačené v experimente od Dumont et al. (2015).





**Obr. 2:** Proliferácia satelitných kmeňových buniek (Prevzaté z Chang et al. 2016 a upravené podľa potrieb bakalárskej práce). A) Normálne asymetrické delenie kmeňových satelitných buniek za prítomnosti dystrofinu, Mark2 a Pard3 sú správne lokalizované na opačné póly delenej bunky. Asymetrickým delením vzniká jedna kmeňová bunka a jedna progenitorová bunka. B) Narušené asymetrické delenie kmeňových buniek pri deficite dystrofinu. Lokalizácia Pard3 nastáva okolo celej periférie bunky, Mark2 je down-regulovaný, bunka zastavuje bunkový cyklus a vstupuje do starnutia.

Chýbanie dystrofinu v satelitných bunkách teda spôsobuje stratu polaritu satelitných buniek, abnormálne delenie buniek (stratu apikobazálneho asymetrického delenia), vrátane amplifikácie centrosómu, poškodenie orientácie deliaceho vretienka počas mitózy a celkové predĺženie delenia kmeňových buniek. Takýmito poškodeniami a zvýšeným abnormálnym delením sa potom značne znižuje tvorba myogénnych pregenitórnych buniek, ktoré sú potrebné pre správnu regeneráciu svalov (Dumont et al. 2015).

Podľa zistení Dumont et al. (2015) je zrejmé, že dystrofin má esenciálnu úlohu v regulácii polaritu kmeňových buniek a v asymetrickom delení kmeňových buniek. Zároveň tieto zistenia naznačujú, že slabosť a úbytok svalov u DMD pacientov nie je spôsobený len narušením, krehkosťou a vývojovým poškodením myofibril, ale aj zhoršenou regeneráciou svalov dôsledkom dysfunkcie satelitných buniek. Na základe týchto zistení možno povedať, že DMD ochorenie nie je len ochorenie svalov, nervovej sústavy, ale aj ochorenie satelitných buniek (Dumont et al. 2015).

## 7 Záver

Vo svojej bakalárskej práci som zhrnula doterajšie poznatky o proteíne dystrofín a jeho úlohe vo vývoji a správnej funkcii svalového tkaniva. Dystrofín je spolu s ostatnými proteínmi DGC komplexu nenahraditeľný pre správnu kontrakciu a relaxáciu svalového vlákna. Dystrofín sa podieľa aj na udržaní integrity svalového tkaniva. Experimenty na modelových organizmoch ukázali jeho dôležitosť aj v jeho vývoji. Proces vývoja svalového tkaniva je sám o sebe veľmi špecifický a presne načasovaný. Akékoľvek narušenie myogenézy môže viesť ku menej alebo viac závažným patológiám. Staršie, ale aj súčasné práce naznačujú, že DMD sa prejavuje už v prenatalných vývojových štádiách. Štúdie na embryách *mdx* myši s mutovaným *DMD* génom dokazujú, že vývoj svalového tkaniva je značne narušený, zo štrukturálneho aj časového pohľadu.

Nižšia, či chýbajúca tvorba dystrofínu môže ovplyvniť aj typ vznikajúceho svalového vlákna. V práci naznačujem, že chyby v prepise *DMD* génu vedú k vzniku pomalých svalových vlákien na úkor rýchlych.

U DMD pacientov je popísaná nedostatočná regeneračná aktivita svalov postihnutých chlapcov vedúca ku svalovej slabosti zhoršujúcej sa s vekom. V práci som sa snažila poukázať na to, že nedostatočná regeneračná aktivita má pravdepodobnú súvislosť s narušením asymetrického delenia kmeňových buniek svalového tkaniva. Nedostatkom dystrofínu dochádza ku narušeniu signálnej dráhy, ktorá je dôležitá pre správnu orientáciu deliaceho vretienka a následné asymetrické delenie. Jedna zo štúdií aj naznačuje, že DMD nie je len ochorením svalového tkaniva ale aj ochorením satelitných kmeňových buniek. V inej štúdií na *mdx* myšiach sa predpokladalo, že narušenie regeneračnej kapacity je spôsobené vyčerpaním svalových kmeňových buniek.

Najnovšie publikované údaje poukazujú na to, že mutácie v *DMD* géne zároveň výrazne ovplyvňujú expresiu iných génov. Najčastejšie dochádza k ich down-regulácii, menej časté sú up-regulácie. V tejto práci bol ako príklad širšieho vplyvu mutácii v *DMD* géne uvedený proces narušenia PKA signalizácie ako dôsledok zníženej expresie niektorých génov (napr. *Myospryn*). Narušenie PKA signalizácie má pravdepodobne za následok kaskádovitú down-reguláciu ďalších génov.

Ďalším dôsledkom absencie dystrofínu je down-regulácia génu *Scn1b* kódujúceho podjednotku napätím ovládaných kanálov sarkoméry, ktoré sú dôležité pre vznik a šírenie akčného potenciálu.

Pri práci svalov je dôležité udržiavanie vápnikovej homeostázy v svalovom tkanive. V práci som sa pokúsila vysvetliť narušenie tohto procesu pri DMD. Absencia dystrofinu vedie ku zníženej expresii génu *Casq1* kódujúceho proteín sarkoplazmatického retikula, ktorý sa podieľa na udržiavaní vápnikovej homeostázy. Predpokladá sa, že práve táto down-regulácia môže vysvetľovať narušenie vápnikovej homeostázy u pacientov s DMD. Predpokladalo sa, že takéto narušenie homeostázy vápnika vedie napríklad k poškodeniu a fibróze svalového tkaniva. Avšak nová štúdia od Mournetas et al. (2021) poukazuje na to, že fibróza je pravdepodobne už vlastnosťou svalových buniek u jedincov s chybným *DMD* génom. Na vyvodenie jednoznačného záveru je však potrebné vykonať ďalšie ciele štúdie.

Cieľom tejto práce bolo zhrnúť doterajšie poznatky o vplyve nedostatku dystrofinu na správny vývoj svalového tkaniva. Väčšina štúdií sa v minulosti sústreďovala až na fenotypový prejav mutácii v *DMD* géne po narodení. Novšie práce však poukazujú na to, že DMD nastupuje už v skorých vývojových štádiách. Tento proces ešte nie je dokonale popísaný. Už teraz však známe poznatky naznačujú, že úloha dystrofinu presahuje funkciu tlmenia stresu pri svalovej kontrakcii vedúcej k poškodzovaniu svalového tkaniva a celkovej svalovej slabosti. Mutácie v *DMD* géne ovplyvňujú fungovanie signálnych kaskád a reguláciu transkripcie mnohých ďalších génov. Je možné, že v budúcnosti bude potrebné prehodnotiť úlohu dystrofinu počas jednotlivých štádií vývoja svalového tkaniva. Zatiaľ nie je zrejmé, či doterajšie poznatky budú korelovať s nadväzujúcimi štúdiami. Na úplne pochopenie vplyvu nedostatku dystrofinu v procese vývoja svalového tkaniva bude potrebných ešte množstvo experimentov. Umožní to však rozšíriť terapeutické možnosti pre pacientov s Duchennovou svalovou dystrofiou. Keďže fenotypový prejav DMD je možné detegovať už na transkripčnej úrovni, táto skorá diagnostika môže byť v budúcnosti zaujímavá pre skoré ciele liečby DMD pacientov, možno už v prenatalnom štádiu vývoja. Skorá terapeutická intervencia by pravdepodobne mohla priaznivo ovplyvniť kvalitu života aj prognózu chlapcov, ktorí trpia Duchennovou alebo Beckerovou muskulárnou dystrofiou.

## 8 Zoznam literatúry

AARTSMA-RUS, Annemieke, Ieke B. GINJAAR a Kate BUSHBY, 2016. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics* [online]. **53**(3), 145–151. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.1136/jmedgenet-2015-103387

AMANN, Kurt J., Brian A. RENLEY a James M. ERVASTI, 1998. A Cluster of Basic Repeats in the Dystrophin Rod Domain Binds F-actin through an Electrostatic Interaction. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **273**(43), 28419–28423. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.43.28419

ANASTASI, Giuseppe, Giuseppina CUTRONEO, Giuseppe SANTORO, Alba ARCO, Giuseppina RIZZO, Placido BRAMANTI, Carmen RINALDI, Antonina SIDOTI, Aldo AMATO a Angelo FAVALORO, 2008. Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. *Journal of Anatomy* [online]. **213**(3), 284–295. ISSN 00218782. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00921.x

BASSETT, David I., 2003. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* [online]. **130**(23), 5851–5860. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.00799

BIRESSI, Stefano, Mario MOLINARO a Giulio COSSU, 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Developmental Biology* [online]. **308**(2), 281–293. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.006

BLADEN, Catherine L., David SALGADO, Soledad MONGES, Maria E. FONCUBERTA, Kyriaki KEKOU, Konstantina KOSMA, Hugh DAWKINS, Leanne LAMONT, Anna J. ROY, Teodora CHAMOVA, Velina GUERGUELTCHEVA, Sophelia CHAN, Lawrence KORNGUT, Craig CAMPBELL, Yi DAI, Jen WANG, Nina BARIŠIĆ, Petr BRABEC, Jaana LAHDETIE, Maggie C. WALTER, Olivia SCHREIBER-KATZ, Veronika KARCAGI, Marta GARAMI, Venkatarman VISWANATHAN, Farhad BAYAT, Filippo BUCCELLA, En KIMURA, Zaïda KOEKS, Janneke C. VAN DEN BERGEN, Miriam RODRIGUES, Richard ROXBURGH, Anna LUSAKOWSKA, Anna KOSTERA-PRUSZCZYK, Janusz ZIMOWSKI, Rosário SANTOS, Elena NEAGU, Svetlana ARTEMIEVA, Vedrana Milic RASIC, Dina VOJINOVIC, Manuel POSADA, Clemens BLOETZER, Pierre-Yves JEANNET, Franziska JONCOURT, Jordi DÍAZ-MANERA, Eduard GALLARDO, A. Ayşe KARADUMAN, Haluk TOPALOĞLU, Rasha EL SHERIF, Angela STRINGER, Andriy V. SHATILLO, Ann S. MARTIN, Holly L. PEAY, Matthew I. BELLGARD, Jan KIRSCHNER,

Kevin M. FLANIGAN, Volker STRAUB, Kate BUSHBY, Jan VERSCHUUREN, Annemieke AARTSMA-RUS, Christophe BÉROUD a Hanns LOCHMÜLLER, 2015. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation* [online]. **36**(4), 395–402. ISSN 10597794. Dostupné z: doi:10.1002/humu.22758

BLAKE, D, J TINSLEY, K DAVIES, A KNIGHT, S WINDER a J KENDRICKJONES, 1995. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **20**(4), 133–135. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(00)88986-0

BLAKE, Derek J., Andrew WEIR, Sarah E. NEWAY a Kay E. DAVIES, 2002. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiological Reviews* [online]. **82**(2), 291–329. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00028.2001

BODRUG, S., P. RAY, I. GONZALEZ, R. SCHMICKEL, J. SYLVESTER a R. WORTON, 1987. Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy. *Science* [online]. **237**(4822), 1620–1624. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.3629260

BURRIDGE, Keith a Magdalena CHRZANOWSKA-WODNICKA, 1996. FOCAL ADHESIONS, CONTRACTILITY, AND SIGNALING. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **12**(1), 463–519. ISSN 1081-0706. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.463

CALDERWOOD, David A., Roy ZENT, Richard GRANT, D. Jasper G. REES, Richard O. HYNES a Mark H. GINSBERG, 1999. The Talin Head Domain Binds to Integrin  $\beta$  Subunit Cytoplasmic Tails and Regulates Integrin Activation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(40), 28071–28074. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.40.28071

CHAL, Jérôme a Olivier POURQUIÉ, 2017. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* [online]. **144**(12), 2104–2122. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.151035

CHANG, Natasha C, Fabien P CHEVALIER a Michael A RUDNICKI, 2016. Satellite Cells in Muscular Dystrophy – Lost in Polarity. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **22**(6), 479–496. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2016.04.002

CHIESI, M., M. M. HO, G. INESI, A. V SOMLYO a A. P. SOMLYO, 1981. Primary role of

sarcoplasmic reticulum in phasic contractile activation of cardiac myocytes with shunted myolemma. *Journal of Cell Biology* [online]. **91**(3), 728–742. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.91.3.728

CHRIST, Bodo a Charles P. ORDAHL, 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology* [online]. **191**(5), 381–396. ISSN 0340-2061. Dostupné z: doi:10.1007/BF00304424

CLERK, A., P. N. STRONG a C. A. SEWRY, 1992. Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)* [online]. **114**(2), 395–402. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1592000>

COSSU, G., L. DE ANGELIS, U. BORELLO, B. BERARDUCCI, V. BUFFA, C. SONNINO, M. COLETTA, E. VIVARELLI, M BOUCHE, L. LATTANZI, D. TOSONI, S. DI DONNA, L. BERGHELLA, G. SALVATORI, P. MURPHY, M. G. CUSELLA-DE ANGELIS a M. MOLINARO, 2000. Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. *The International journal of developmental biology* [online]. **44**(6), 699–706. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.11061434

DASTON, George, Elise LAMAR, Marc OLIVIER a Martyn GOULDING, 1996. Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development (Cambridge, England)* [online]. **122**(3), 1017–27. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631247>

DECONINCK, Nicolas a Bernard DAN, 2007. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatric Neurology* [online]. **36**(1), 1–7. ISSN 08878994. Dostupné z: doi:10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016

DUISTERS, Rudy F, Anke J TIJSEN, Blanche SCHROEN, Joost J LEENDERS, Viola LENTINK, Ingeborg VAN DER MADE, Veronica HERIAS, Rick E. VAN LEEUWEN, Mark W SCHELLINGS, Paul BARENBRUG, Jos G MAESSEN, Stephane HEYMANS, Yigal M PINTO a Esther E CREEMERS, 2009. miR-133 and miR-30 Regulate Connective Tissue Growth Factor. *Circulation Research* [online]. **104**(2), 170–178. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182535

DUMONT, Nicolas A, Yu Xin WANG, Julia Von MALTZAHN, Alessandra PASUT, C Florian BENTZINGER, Caroline E BRUN a Michael A RUDNICKI, 2015. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nature*

*Medicine* [online]. **21**(12), 1–11. ISSN 1546170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm.3990

DURBEEJ, Madeleine, Ronald D. COHN, Ronald F. HRSTKA, Steven A. MOORE, Valérie ALLAMAND, Beverly L. DAVIDSON, Roger A. WILLIAMSON a Kevin P. CAMPBELL, 2000. Disruption of the  $\beta$ -Sarcoglycan Gene Reveals Pathogenetic Complexity of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2E. *Molecular Cell* [online]. **5**(1), 141–151. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(00)80410-4

EMERY, Alan E. H., 1977. Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* [online]. **266**(5601), 472–473. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/266472a0

FEHER, Joseph, 2017. Contractile Mechanisms in Skeletal Muscle. In: *Quantitative Human Physiology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 305–317. ISBN 9780128008836. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800883-6.00028-8

GAO, Quan Q. a Elizabeth M. MCNALLY, 2015. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. In: *Comprehensive Physiology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. 1223–1239. ISSN 20404603. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c140048

GHAHRAMANI SENO, Mohammad M., Capucine TROLLET, Takis ATHANASOPOULOS, Ian R. GRAHAM, Pingzhao HU a George DICKSON, 2010. Transcriptomic analysis of dystrophin RNAi knockdown reveals a central role for dystrophin in muscle differentiation and contractile apparatus organization. *BMC Genomics* [online]. **11**(1), 345. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-11-345

GROS, Jérôme, Marie MANCEAU, Virginie THOMÉ a Christophe MARCELLE, 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* [online]. **435**(7044), 954–8. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature03572

HNIA, Karim, Dora ZOUITEN, Sonia CANTEL, Delphine CHAZALETTE, Gérald HUGON, Jean-Alain FEHRENTZ, Ahmed MASMOUDI, Ann DIMENT, Janice BRAMHAM, Dominique MORNET a Steve J. WINDER, 2007. ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a  $\beta$ -dystroglycan interaction site. *Biochemical Journal* [online]. **401**(3), 667–677. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20061051

HOFFMAN, Eric P. a Louis M. KUNKEL, 1989. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* [online]. **2**(1), 1019–1029. ISSN 08966273.

Dostupné z: doi:10.1016/0896-6273(89)90226-2

HOUZELSTEIN, D., G. E. LYONS, J. CHAMBERLAIN a M. E. BUCKINGHAM, 1992. Localization of Dystrophin Gene Transcripts during Mouse Embryogenesis. *Journal of Cell Biology* [online]. **119**(4), 811–821. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.119.4.811

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, Oxana, James M. ERVASTI, Cynthia J. LEVEILLE, Clive A. SLAUGHTER, Suzanne W. SERNETT a Kevin P. CAMPBELL, 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* [online]. **355**(6362), 696–702. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/355696a0

JIN, Zi-Bing a Masayo TAKAHASHI, 2012. Generation of retinal cells from pluripotent stem cells. In: *Progress in Brain Research* [online]. 1. vyd. B.m.: Elsevier B.V., s. 171–181. ISBN 9780444595447. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-59544-7.00008-1

KAMEYA, Shuhei, Yuko MIYAGOE, Ikuya NONAKA, Takaaki IKEMOTO, Makoto ENDO, Kazunori HANAOKA, Yo-ichi NABESHIMA a Shin'ichi TAKEDA, 1999.  $\alpha$ 1-Syntrophin Gene Disruption Results in the Absence of Neuronal-type Nitric-oxide Synthase at the Sarcolemma but Does Not Induce Muscle Degeneration. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(4), 2193–2200. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.4.2193

KASSAR-DUCHOSSOY, Lina, 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes & Development* [online]. **19**(12), 1426–1431. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.345505

KOENIG, M. a L. M. KUNKEL, 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **265**(8), 4560–4566. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)39599-7

KOENIG, M., A.P. MONACO a L.M. KUNKEL, 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* [online]. **53**(2), 219–228. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(88)90383-2

LAPIDOS, Karen A., Rahul KAKKAR a Elizabeth M. MCNALLY, 2004. The Dystrophin Glycoprotein Complex. *Circulation Research* [online]. **94**(8), 1023–1031. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.0000126574.61061.25

LE, Shimin, Miao YU, Ladislav HOVAN, Zhihai ZHAO, James ERVASTI a Jie YAN, 2018.



- Dystrophin As a Molecular Shock Absorber. *ACS Nano* [online]. **12**(12), 12140–12148. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.8b05721
- LI, Mei, Monika ANDERSSON-LENDAHL, Thomas SEJERSEN a Anders ARNER, 2016. Knockdown of fast skeletal myosin-binding protein C in zebrafish results in a severe skeletal myopathy. *Journal of General Physiology* [online]. **147**(4), 309–322. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.201511452
- LU, Michelle S a Christopher A JOHNSTON, 2013. Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* [online]. **140**(9), 1843–1856. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.087627
- LYONS, Gary E., Marcia ONTELL, Roger COX, David SASSOON a Margaret BUCKINGHAM, 1990. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *Journal of Cell Biology* [online]. **111**(4), 1465–1476. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.111.4.1465
- MANDEL, J L, 1989. The gene and its product. *Nature* [online]. **339**(6226), 584–586. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/339584a0
- MATHES, C., F. BEZANILLA a R. E. WEISS, 1991. Sodium current and membrane potential in EDL muscle fibers from normal and dystrophic (mdx) mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. **261**(4), C718–C725. ISSN 0363-6143. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.1991.261.4.C718
- MERRICK, Deborah, Lukas Kurt Josef STADLER, Dean LARNER a Janet SMITH, 2009. Muscular dystrophy begins early in embryonic development deriving from stem cell loss and disrupted skeletal muscle formation. *Disease Models & Mechanisms* [online]. **2**(7–8), 374–388. ISSN 1754-8403. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.001008
- MERRICK, Deborah, Tao TING, Lukas STADLER a Janet SMITH, 2007. A role for Insulin-like growth factor 2 in specification of the fast skeletal muscle fibre. *BMC Developmental Biology* [online]. **7**(1), 65. ISSN 1471213X. Dostupné z: doi:10.1186/1471-213X-7-65
- MICHELE, Daniel E. a Kevin P. CAMPBELL, 2003. Dystrophin-Glycoprotein Complex: Post-translational Processing and Dystroglycan Function. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **278**(18), 15457–15460. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R200031200
- MOURNETAS, Virginie, Emmanuelle MASSOURIDÈS, Jean-baptiste DUPONT, Etienne

- KORNOBIS, Margot JARRIGE, Alan R L DORVAL, Maxime R F GOSSELIN a Antigoni MANOUSOPOULOU, 2021. Myogenesis modelled by human pluripotent stem cells : a multi-omic study of Duchenne myopathy early onset [online]. **12**(1), 209–232. Dostupné z: doi:10.1002/jcsm.12665
- MRÁZOVÁ, Lenka, 2016. Duchennova svalová dystrofie – patogeneze, klinický obraz, diagnostika, aktuální možnosti terapie. *Neurobiológia*. 13–15.
- MUNTONI, Francesco, Silvia TORELLI a Alessandra FERLINI, 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology* [online]. **2**(12), 731–740. ISSN 14744422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(03)00585-4
- NORWOOD, Fiona L.M., Andrew J. SUTHERLAND-SMITH, Nicholas H. KEEP a John KENDRICK-JONES, 2000. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* [online]. **8**(5), 481–491. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/S0969-2126(00)00132-5
- OGURA, Yuji, Hisashi NAITO, Ryo KAKIGI, Noriko ICHINOSEKI-SEKINE, Mitsutoshi KUROSAKA a Shizuo KATAMOTO, 2008. Alpha-actinin-3 levels increase concomitantly with fast fibers in rat soleus muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **372**(4), 584–588. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.059
- OTT, M. O., E. BOBER, G. LYONS, H. ARNOLD a M. BUCKINGHAM, 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* [online]. **111**(4), 1097–107. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652425>
- PAOLINI, Cecilia, Marco QUARTA, Alessandra NORI, Simona BONCOMPAGNI, Marta CANATO, Pompeo VOLPE, Paul D. ALLEN, Carlo REGGIANI a Feliciano PROTASI, 2007. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *The Journal of Physiology* [online]. **583**(2), 767–784. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2007.138024
- PATINO, Gustavo A., L. R. F. CLAES, Luis F. LOPEZ-SANTIAGO, Emily A. SLAT, R. S. R. DONDETI, Chunling CHEN, Heather A. O'MALLEY, C. B. B. GRAY, Haruko MIYAZAKI, Nobuyuki NUKINA, Fumitaka OYAMA, Peter DE JONGHE a Lori L. ISOM, 2009. A Functional Null Mutation of SCN1B in a Patient with Dravet Syndrome. *Journal of*

*Neuroscience* [online]. **29**(34), 10764–10778. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2475-09.2009

PESCATORI, Mario, Aldobrando BROCCOLINI, Carlo MINETTI, Enrico BERTINI, Claudio BRUNO, Adele D'AMICO, Camilla BERNARDINI, Massimiliano MIRABELLA, Gabriella SILVESTRI, Vincenzo GIGLIO, Anna MODONI, Marina PEDEMONTE, Giorgio TASCA, Giuliana GALLUZZI, Eugenio MERCURI, Pietro A. TONALI a Enzo RICCI, 2007. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *The FASEB Journal* [online]. **21**(4), 1210–1226. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.06-7285com

PETERS, Matthew F., Marvin E. ADAMS a Stanley C. FROEHNER, 1997. Differential Association of Syntrophin Pairs with the Dystrophin Complex. *Journal of Cell Biology* [online]. **138**(1), 81–93. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.138.1.81

PONTING, Chris P., Derek J. BLAKE, Kay E. DAVIES, John KENDRICK-JONES a Steven J. WINDER, 1996. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **21**(1), 11–13. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(06)80020-4

PORTER, GA, GM DMYTRENKO, JC WINKELMANN a RJ BLOCH, 1992. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* [online]. **117**(5), 997–1005. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.117.5.997

RENTSCHLER, Stacey, Hillary LINN, Katrin DEININGER, M.T. BEDFORD, Xavier ESPANEL a Marius SUDOL, 1999. The WW Domain of Dystrophin Requires EF-Hands Region to Interact with  $\beta$ -Dystroglycan. *Biological Chemistry* [online]. **380**(4), 431–442. ISSN 1431-6730. Dostupné z: doi:10.1515/BC.1999.057

REYNOLDS, Joseph G., Sarah A. MCCALMON, Julie A. DONAGHEY a Francisco J. NAYA, 2008. Deregulated Protein Kinase A Signaling and Myospryn Expression in Muscular Dystrophy. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(13), 8070–8074. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C700221200

REYNOLDS, Joseph G., Sarah A. MCCALMON, Thomas TOMCZYK a Francisco J. NAYA, 2007. Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric

protein myospryn. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1773**(6), 891–902. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2007.04.004

ROY, S., 2001. The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes & Development* [online]. **15**(12), 1563–1576. ISSN 08909369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.195801

RUDNICKI, Michael A., Patrick N.J. SCHNEGELSBURG, Ronald H. STEAD, Thomas BRAUN, Hans-Henning ARNOLD a Rudolf JAENISCH, 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* [online]. **75**(7), 1351–1359. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90621-V

SADOULET-PUCCIO, Hélène M., Michael RAJALA a Louis M. KUNKEL, 1997. Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **94**(23), 12413–12418. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.94.23.12413

SEALE, Patrick, Luc A. SABOURIN, Adele GIRGIS-GABARDO, Ahmed MANSOURI, Peter GRUSS a Michael A. RUDNICKI, 2000. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* [online]. **102**(6), 777–786. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)00066-0

SHER, Roger B., Gregory A. COX a Cheryl ACKERT-BICKNELL, 2012. Development and Disease of Mouse Muscular and Skeletal Systems. In: *The Laboratory Mouse* [online]. B.m.: Elsevier, s. 209–239. ISBN 9780123820082. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382008-2.00010-6

SOTGIA, Federica, Jean Kyung LEE, Kallol DAS, Mark BEDFORD, Tamara C. PETRUCCI, Pompeo MACIOCE, Massimo SARGIACOMO, Franca Dagna BRICARELLI, Carlo MINETTI, Marius SUDOL a Michael P. LISANTI, 2000. Caveolin-3 Directly Interacts with the C-terminal Tail of  $\beta$ -Dystroglycan. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(48), 38048–38058. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M005321200

SQUIRE, John M, 1997. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. **7**(2), 247–257. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-440X(97)80033-4

TAJBAKSHI, Shahragim a Margaret BUCKINGHAM, 1999. 6 The Birth of Muscle Progenitor Cells in the Mouse: Spatiotemporal Considerations. In: *Current Topics in*

*Developmental Biology* [online]. s. 225–268. ISSN 00702153. Dostupné  
z: doi:10.1016/S0070-2153(08)60758-9

TAJBAKHS, Shahragim a Margaret E. BUCKINGHAM, 1994. Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **91**(2), 747–751. ISSN 0027-8424. Dostupné  
z: doi:10.1073/pnas.91.2.747

TOOP, James a Alan E. H. EMERY, 1974. Muscle histology in fetuses at risk for Duchenne muscular dystrophy. *Clinical Genetics* [online]. **5**(3), 230–233. ISSN 00099163. Dostupné  
z: doi:10.1111/j.1399-0004.1974.tb01687.x

VASSILOPOULOS, D. a A. E.H. EMERY, 1977. Muscle nuclear changes in fetuses at risk for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics* [online]. **14**(1), 13–15. ISSN 1468-6244. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.14.1.13

VIDAL, Berta, Antonio L SERRANO, Marc TJWA, Mònica SUELVES, Esther ARDITE, R. DE MORI, B. BAEZA-RAJA, M. MARTINEZ DE LAGRAN, Peggy LAFUSTE, V. RUIZ-BONILLA, M. JARDI, Romain GHERARDI, Christo CHRISTOV, Mara DIERSEN, Peter CARMELIET, Jay L DEGEN, Mieke DEWERCHIN a P. MUNOZ-CANOVES, 2008. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGF  $\beta$ /alternative macrophage activation pathway. *Genes & Development* [online]. **22**(13), 1747–1752. ISSN 0890-9369. Dostupné  
z: doi:10.1101/gad.465908

WANG, Chengbing, Ulrich RÜTHER a Baolin WANG, 2007. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Developmental Biology* [online]. **305**(2), 460–469. ISSN 00121606. Dostupné  
z: doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.029

YIN, Hang, Feodor PRICE a Michael A. RUDNICKI, 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews* [online]. **93**(1), 23–67. ISSN 00319333. Dostupné  
z: doi:10.1152/physrev.00043.2011