

MARIA JĘDRZEJOWSKA

**DOSIEBNY DZIECIĘCY I MŁODZIEŃCZY
RDZENIOWY ZANIK MIĘŚNI –
PODŁOŻE MOLEKULARNE A FENOTYP CHOROBY**



LS 243 (dublet)

Praca na stopień doktora nauk medycznych wykonana
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. J. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

Prof. dr hab. med. Irena Hausmanowa-Petrusewicz

Warszawa 2003

*Pani Profesor Irenie Hausmanowej-Petrusewicz,
promotorowi pracy, dziękuję za wszechstronną pomoc,
okazaną życzliwość i wyrozumiałość.*

*Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy,
a szczególnie kolegom z Zakładu Genetyki Instytutu Matki i Dziecka
za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.*

*Dziękuję dr Wojciechowi Wiszniewskiemu
za wtajemniczenie w arkana technik molekularnych.*

SPIS TREŚCI

	Str.
Skróty używane w tekście	5
1. Wstęp	6
1.1. Przeszło sto lat historii lub kto miał rację...	6
1.2. Jedna choroba - wiele postaci	11
1.3. SMA 1, 2 i 3 jako choroba alleliczna	17
1.4. Mutacje genu <i>SMN1</i> - podstawowe w patogenezie SMA	19
1.5. Korelacje fenotypowo-genotypowe	20
1.6. Białko SMN zaangażowane w procesie metabolizmu RNA	22
1.7. Badania genetyczne we współczesnej diagnostyce SMA	24
2. Cele pracy	26
2.1. Aspekty praktyczne	26
2.2. Cele poznawcze	26
3. Materiał i metody	27
3.1. Badana grupa	27
3.2. Metody	28
3.2.1. Identyfikacja delecji w genie <i>SMN1</i> i <i>NAIP</i>	28
3.2.1.1. Izolacja DNA z krwi pełnej	28
3.2.1.2. Badanie przesiewowe w kierunku delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i>	28
3.2.1.3. Badanie w kierunku delecji eksonu 8 genu <i>SMN1</i>	29
3.2.1.4. Badanie w kierunku delecji eksonu 5 genu <i>NAIP</i>	30
3.2.2. Poszukiwanie mutacji punktowych w genie <i>SMN1</i>	32
3.2.2.1. Powielanie DNA metodą PCR	32
3.2.2.2. Sekwencjonowanie produktów PCR	33
3.2.3. Ilościowa ocena liczby kopii genów <i>SMN1</i> i <i>SMN2</i> z zastosowaniem techniki „real-time PCR”	33
3.2.3.1. Powielanie DNA metodą „real-time PCR”	33
3.2.3.2. Interpretacja wyników	34
3.2.4. Analiza statystyczna	35

	str.
4. Wyniki	36
4.1. Częstość występowania obualelicznej delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i> w polskiej populacji chorych na SMA	36
4.2. Schemat diagnostyki molekularnej SMA	37
4.3. Fenotyp polskiej populacji chorych na SMA, z uwzględnieniem zmienności wewnątrzrodzinnej i przypadków atypowych	39
4.4. Genotyp polskiej populacji chorych na SMA – wielkość delecji w regionie SMA	48
4.5. Korelacje fenotypowo-genotypowe	49
4.6. Mutacje punktowe w grupie chorych nie wykazujących homozygotycznej delecji w genie <i>SMN1</i> . Analiza przypadków.	53
4.7. Nosicielstwo zmutowanego genu <i>SMN1</i>	65
5. Dyskusja	69
6. Podsumowanie	84
7. Piśmiennictwo	86
8. Streszczenie pracy	98
9. Summary (in English)	101
10. Spis tabel, rycin i fotografii	104
11. Kryteria diagnostyczne SMA według Międzynarodowego Konsorcjum SMA	106

SKRÓTY UŻYWANE W TEKŚCIE

bp	ang. base pair, para zasad
CK	ang. creatine kinase, kinaza kreatyny
kb	ang. kilobase, tysiąc par zasad
kD	kilodalton
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminooctowego
EMG	badanie elektromiograficzne
GAR1	ang. glycine- and arginine –rich, białko GAR1
<i>H4F5</i>	ang. spinal muscular atrophy – related gene <i>H4F5</i> , gen <i>H4F5</i>
Mb	ang. megabase, milion par zasad
MND	ang. motor neuron disease, choroba motoneuronu
<i>NAIP</i>	ang. neuronal apoptosis inhibitory protein, gen białka hamującego apoptozę motoneuronów
<i>p44</i>	ang. <i>p44</i> subunit of general transcription factor IIIH (TFIIH), podjednostka <i>p44</i> podstawowego czynnika transkrypcyjnego IIIH
PCR	ang. polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy
RT-PCR	ang. reverse transcription polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy
SIP1	ang. SMN interacting protein 1, białko współdziałujące z SMN
SMA	ang. spinal muscular atrophy, rdzeniowy zanik mięśni
SMN	ang. survival of motor neuron, warunkujący przeżycie motoneuronów; skrót ten używany jest w odniesieniu do genu i białka SMN
<i>SMN^{tel}</i>	kopia telomerowa genu <i>SMN</i> , skrót używany zamiennie z <i>SMN1</i>
<i>SMN1</i>	kopia telomerowa genu <i>SMN</i>
<i>SMN^{cen}</i>	kopia centromerowa genu <i>SMN</i> , skrót używany zamiennie z <i>SMN2</i>
<i>SMN2</i>	kopia centromerowa genu <i>SMN</i>
snRNP	ang. small nuclear rybonucleoprotein, niskocząsteczkowe jądrowe rybonukleoproteiny
snoRNP	ang. small nucleolar rybonucleoprotein, niskocząsteczkowe jąderkowe rybonukleoproteiny
TRIS	tris(hydroksymetylo)-aminometan
UNG	uracyl N-glukozyłaza

1. WSTĘP

Rdzeniowy zanik mięśni (ang. spinal muscular atrophy, SMA) jest heterogenną grupą chorób nerwowo-mięśniowych, w której dochodzi do utraty motoneuronów rdzenia kręgowego. Utrata motoneuronów prowadzi w konsekwencji do postępującego niedowładu i zaniku mięśni.

Najczęstszą chorobą w tej grupie schorzeń jest dosiebny dziecięcy i młodzieńczy rdzeniowy zanik mięśni. Choroba dziedziczona jest jako cecha autosomalna recesywna. Częstość jej występowania szacuje się na 1 na 7-10 tysięcy urodzeń, co odpowiada częstości nosicielstwa zmutowanego genu od 1 na 42 do 1 na 50 osób. Po mukowiscydozie stanowi najczęstszą przyczynę zgonów dzieci z powodu chorób genetycznych uwarunkowanych autosomalnie recesywnie.

Niniejsza praca poświęcona jest klinicznym i genetycznym aspektom tej właśnie choroby.

1.1 Przeszło sto lat historii lub kto miał rację...

Pierwsze znane i udokumentowane opisy rdzeniowego zaniku mięśni zawdzięczamy Werdnigowi, austriackiemu lekarzowi z Instytutu Patologii Uniwersytetu w Grazu (113, 114) oraz Hoffmannowi z Kliniki Erba w Heidelbergu (61-63). W 1891 roku Werdnig opisał dwóch braci z postępującym osłabieniem siły mięśniowej zaobserwowanym około 10 miesiąca życia, początkowo dotyczącym głównie mięśni kończyn dolnych, a następnie obejmującym mięśnie osiowe i mięśnie dosiebne kończyn górnych. U pierwszego z braci dodatkowo występowało wodogłowie. Dziecko zmarło z powodu krztuśca w 3 roku życia. Badanie autopsyjne rdzenia kręgowego ujawniło zanik komórek rogów przednich i korzeni przednich, zwłaszcza w odcinku zgrubienia szyjnego i lędźwiowego. Natomiast badany mięsień (m. brzuchaty łydki) wykazywał, zdaniem Werdniga, cechy zaniku prostego. Drugi z chłopców zmarł w 6 roku życia. W badaniu anatomopatologicznym, podobnie jak w pierwszym przypadku, Werdnig stwierdził zanik komórek rogów przednich oraz zmiany zwyrodnieniowe korzeni

przednich. W mięśniach obserwował głównie zanik prosty, ale także przerost niektórych włókien, co jego zdaniem sugerowało proces mieszany.

Hoffmann opisał 7 dzieci z 4 rodzin. Również i w tych przypadkach pierwsze symptomy choroby w postaci osłabienia siły mięśniowej (głównie kończyn dolnych) i zahamowania rozwoju ruchowego dziecka obserwowane były w wieku kilku miesięcy, a dzieci przeżywały od 14 miesięcy do 5 lat. Badania autopsyjne wykazały zmiany zwyrodnieniowe komórek rogów przednich rdzenia kręgowego oraz znaczny zanik włókien mięśniowych.

Chociaż Werdnig i Hoffmann opisali przypadki o przebiegu raczej przewlekłym, odpowiadające we współczesnej klasyfikacji formie pośredniej SMA, to nazwą choroby Werdniga-Hoffmanna określa się zwykle postać ostrą – SMA1. Prawdziwie ostrą formę, z objawami w okresie okołoporodowym, prawdopodobnie jako pierwszy opisał francuski neurolog Sevestre w 1899 roku (105). Przedstawił on przypadek 2,5-miesięcznego niemowlęcia, z wiotkim porażeniem czterokończynowym, bez zajęcia mięśni twarzy i przepony. U 2 z 6 pozostałego rodzeństwa występowały podobne objawy. Podobieństwo obrazu klinicznego i rodzinne występowanie choroby sugerują rdzeniowy zanik mięśni. Jednak brak badań anatomopatologicznych nie pozwala na postawienie pełnego rozpoznania. Pierwszy udokumentowany przypadek formy wrodzonej przedstawił Beevor w 1902 roku (8). Opisał on przypadek niemowlęcia z wiotkim porażeniem czterokończynowym, które zmarło w wieku 2 miesięcy. Badanie autopsyjne wykazało znaczny zanik komórek rogów przednich rdzenia kręgowego. U 3 z pozostałego 7 rodzeństwa występowały podobne objawy.

Prawdziwy przełom przyniosło wprowadzenie do praktyki neurologicznej badania elektrofizjologicznego. Dzięki zastosowaniu elektromiografii Kugelberg i Welander wyodrębnili z grupy dystrofii łagodną formę rdzeniowego zaniku mięśni, nazywaną obecnie SMA3 lub chorobą Kugelberga-Welander (70, 71). W 1956 roku opisali oni grupę 12 chorych - 8 mężczyzn i 4 kobiet (co wydaje się być znamienne w świetle późniejszych obserwacji przewagi płci męskiej w formie łagodnej). Wiek zachorowania w ich materiale sięgał od 2 do 17 roku życia. Rozwój ruchowy w pierwszym roku życia nie odbiegał od normy. Pierwszymi objawami były trudności z wchodzeniem po schodach, z wstawaniem z podłogi. Klinicznie dominował zanik i osłabienie mięśni obręczy biodrowej. Przebieg był powoli

postępujący. Chorzy przez wiele lat zachowywali zdolność samodzielnego chodzenia (7 w okresie 20-letniej obserwacji, jeden z pacjentów przez ponad czterdzieści lat). W kilku przypadkach zwracała uwagę bardzo powolna progresja objawów mimo dość wczesnego początku. Jedna z pacjentek, która zachorowała około 3 roku życia, w wieku 23 lat wciąż dojeżdżała do pracy rowerem około 30-40 km dziennie, pracując przy tym na pełnym etacie. Jest to jeszcze jeden dowód, że wiek wystąpienia pierwszych objawów nie zawsze koreluje z nasileniem objawów klinicznych.

Ta niezwykle istotna z punktu widzenia historii SMA praca była kolejną przyczyną polemik dotyczących jednorodności nozologicznej rdzeniowego zaniku mięśni. Jedna choroba - wiele fenotypów czy wiele chorób o podobnym obrazie klinicznym? To klasyczne pytanie podzieliło świat medyczny na dwa obozy, wdzięcznie określone przez Dubowitza jako „lumpers and splitters” (37).

Teoria genetycznej etiologii choroby miała licznych zwolenników już w najwcześniejszym okresie badań nad SMA. Na rodzinne występowanie choroby zwracano uwagę od pierwszych jej opisów. W tytule swej pierwszej publikacji Werdnig użył określenia „dziedziczny zanik mięśni” (hereditäre...Muskelatrophie). W zestawieniu 13 przypadków z 1911 roku, weryfikowanych anatomopatologicznie, rodzinne występowanie choroby stwierdzono aż u 6 chorych (4). Jednak nawet ustalenie sposobu dziedziczenia stwarzało pewne trudności. Analiza niektórych rodowodów sugerowała dziedziczenie autosomalne dominujące z niepełną penetracją. Za tą teorią przemawiał fakt występowania objawów nie tylko u rodzeństwa, ale także u dalszych krewnych (wujowie, ciotki). Dysponując współczesną wiedzą nietrudno wytłumaczyć początkowe wątpliwości. Możliwość spotkania się w jednej rodzinie więcej niż 2 nosicieli wydaje się prawdopodobna, zwłaszcza biorąc pod uwagę stosunkowo wysoką częstość nosicielstwa SMA w populacji. To prawdopodobieństwo wielokrotnie wzrasta w małżeństwach spokrewnionych. W obszernej analizie 112 przypadków duńskich Brandt jednoznacznie sugerował dziedziczenie autosomalne recesywne choroby (11). Jako jeden z argumentów wysuwał wysoki procent małżeństw spokrewnionych, 5-8 krotnie wyższy w porównaniu z przeciętnym dla populacji. Nie analizował on postaci łagodnej, wówczas jeszcze nie opisaną.

Szczególne wątpliwości, co do jednorodności nozologicznej i tym bardziej genetycznej rdzeniowego zaniku mięśni, rodziła duża zmienność fenotypowa choroby (od najcięższej postaci wrodzonej do łagodnych postaci późnomłodzieńczych). Sprawę komplikowała niejasna klasyfikacja, wynikająca z trudności w określeniu klarownej granicy w obrazie klinicznym poszczególnych form. W 1961 roku Byers w niezwykle wnikliwej i ciekawej analizie 52 przypadków, obejmujących według współczesnej klasyfikacji SMA1 i SMA2, mówi chyba jako pierwszy o pewnym „continuum” wieku zachorowania i nasilenia objawów klinicznych (23). Prezentuje on nawet omawiane przypadki według wieku zachorowania - początek w okresie płodowym, od urodzenia, 2 tygodnie, 6 tygodni, aż do 2 lat po urodzeniu. Podobnie Dubowitz, w pracach z 1964 roku, zwraca uwagę na niemożność dokonania wyraźnego podziału na poszczególne formy SMA (35, 36). Postać młodzieńcza nie jest jednak w tych pracach uwzględniana. Autorzy traktują ją jako oddzielną jednostkę chorobową.

Za pełną jednorodnością nozologiczną wszystkich trzech postaci opowiada się już Hausmanowa-Petrusewicz w pracy z 1966 (53). Analizuje ona grupę 83 pacjentów, w tym także przypadki z klasyczną (wg współczesnej klasyfikacji) postacią 3b. Jednorodność wyników badań biochemicznych, elektrofizjologicznych i histopatologicznych przemawia jej zdaniem za homogennością grupy. Podejmuje także kwestię homogenności genetycznej. Wysuwając argument zmienności wewnątrzrodzinnej oraz obrazu klinicznego jako pewnej ciągłej, bez wyraźnej linii podziału na poszczególne formy, dość jednoznacznie opowiada się po stronie „lumpersów”. W pracy Zaremby z 1983 roku, dokonującej pełnej analizy genetycznej 247 przypadków przewlekłej formy SMA (obecne 1b, 2 i 3), autor wnioskuje, że wszystkie te postaci uwarunkowane są jednym i tym samym genem (121).

Do zwolenników teorii genetycznej heterogenności choroby należy zaliczyć takich autorów jak Becker, Emery, Zellweger (6, 7, 40, 120). Także Pearn, na podstawie analizy genetycznej 124 przypadków twierdził, że SMA1 reprezentuje oddzielną genetycznie grupę (92).

Tak więc zagadka dotycząca mono- czy też poligenowego dziedziczenia rdzeniowego zaniku mięśni pozostawała nierozwiązana przez ponad trzy

dziesięciolecia od momentu opisu formy łagodnej, będąc wdzięcznym tematem kolejnych analiz i niekończących się polemik.

Prawdziwy przełom nastąpił w momencie zmapowania wszystkich trzech postaci do długiego ramienia chromosomu piątego (5q11.2-13.3). Dokonały tego w 1990 roku niemal równocześnie dwa niezależne zespoły - amerykański i francuski (12, 82). Okazało się, że SMA to jedna choroba o zróżnicowanym fenotypie. Wstępnie triumfowali „lumpersi”.

Wkrótce jednak powróciło nurtujące zarówno genetyków jak i klinicystów pytanie o pochodzenie zmienności fenotypowej.

W 1995 roku zidentyfikowano gen *SMN1* (ang. survival of motor neuron 1) (73), którego mutacje odpowiedzialne są za wystąpienie objawów klinicznych rdzeniowego zaniku mięśni. Okazało się, że ma on swego sobowtóra - niemal identyczny gen *SMN2*, którego mutacje pozostają bezobjawowe. Ten różniący się zaledwie pięcioma nukleotydami duplikat w wyniku alternatywnego składania traci niemal całkowicie ekson 7, niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania białka (74).

Upadła jedna z wcześniejszych koncepcji, że za zmienność fenotypową odpowiedzialne są różne mutacje genu podstawowego. Okazało się, że około 98% stanowią delecje eksonu 7 lub 7 i 8 genu *SMN1* (50, 73, 97). Tak homogenne podłoże genetyczne, przy tak zróżnicowanym fenotypie, musiało sugerować wpływ innych genów.

Kolejne badania przynosiły nowe informacje. Skomplikowana układanka zaczęła tworzyć całość. Region, w którym leży gen *SMN1* (tzw. „region SMA”), jest niestabilny genetycznie. Może w nim występować szereg rearanzacji. Między innymi część kopii genu *SMN1* może zostać zastąpiona genem *SMN2*, może występować nie jedna, a kilka kopii genu *SMN2*. Rok 2002 przyniósł wyniki badań 375-osobowej grupy chorych, które dowodzą bezpośredniej zależności między liczbą kopii *SMN2* a nasileniem objawów (42). Im więcej kopii genu zastępczego, tym łagodniejsza postać choroby.

Tak więc zmienność fenotypowa okazała się efektem współgry dwóch genów - podstawowego *SMN1* i towarzyszącego *SMN2*, kombinacji ich liczby (0-5 kopii *SMN2*) i struktury (geny hybrydowe, mutacje punktowe). A - patrząc z punktu widzenia rachunku prawdopodobieństwa - kombinacji tych jest wiele.

1.2 Jedna choroba - wiele postaci

Obraz kliniczny rdzeniowego zaniku mięśni charakteryzuje się bardzo zróżnicowanym wiekiem wystąpienia choroby i szerokim spektrum nasilenia objawów. Choroba może rozpocząć się zarówno w okresie płodowym jak i w wieku młodzieńczym czy nawet dojrzałym. Tak duża zmienność fenotypowa narzuciła konieczność wprowadzenia prostej i praktycznej klasyfikacji, która jednocześnie miałaby pewną wartość rokowniczą. Międzynarodowe Konsorcjum SMA przyjęło podział na trzy podstawowe formy kliniczne, przedstawione w tabeli I (86). W klasyfikacji tej podstawowym kryterium różnicującym jest wiek wystąpienia pierwszych objawów i stopień rozwoju ruchowego dziecka. Z praktyki wiadomo, że taki podział jest nieprecyzyjny. W każdej z form wyróżnić można przypadki ostre, łagodniejsze i takie, które trudno definitywnie zaliczyć do którejkolwiek grupy. Dubowitz proponował na przykład wyróżnienie 10 podtypów w obrębie każdej z grup (1.1-1.9; 2.1-2.9, 3.1-3.9), co pozwoliłoby na precyzyjne określenie stanu dziecka i rokowania (37). Teoretycznie przyjmuje się bowiem, że im wcześniejszy początek, tym cięższy przebieg i gorsze rokowanie. Jak uczy jednak doświadczenie, długość przeżycia i postęp choroby nie są prostą funkcją wieku zachorowania, zależą od wielu czynników zewnętrznych i innych nieznanych jeszcze mechanizmów.

Z drugiej jednak strony pewne objawy występują we wszystkich formach SMA, niezależnie od wieku zachorowania i stopnia zaawansowania zmian. Do objawów tych należy:

- postępujące, symetryczne osłabienie mięśni, bardziej nasilone dosiebnie; kończyny dolne są bardziej dotknięte niż kończyny górne
- wiotkie napięcie
- osłabienie lub brak odruchów głębokich
- drżenie palców
- brak zajęcia mięśni przepony oraz mięśni zewnętrznych gałki ocznej
- prawidłowy rozwój psychiczny

Typ SMA	Początek	Rozwój ruchowy dziecka	Okres przeżycia
SMA1	0-6 mż	Nigdy nie siada samodzielnie	2-4 lata, w około 10% kilkunastoletni
SMA2	<18 mż	Siada samodzielnie, nie chodzi	zależny od powikłań, często wieloletni
SMA3	>18 mż	Chodzi bez pomocy	zależny od powikłań, często przeciętny jak w populacji

Tabela I Rdzeniowy zanik mięśni - klasyfikacja kliniczna

W praktyce klinicznej często bywa stosowany podział SMA 3 na dwie podgrupy (klasyfikacja wg Zeress'a):

- SMA3a, zachorowanie 18 mż – 3 rż, unieruchomienie zwykle po kilku latach trwania choroby
- SMA3b, zachorowanie powyżej 3 rż, zdolność chodzenia zachowana na ogół przez wiele lat

Pełne kryteria diagnostyczne rdzeniowego zaniku mięśni wg Międzynarodowego Konsorcjum SMA przedstawiono w rozdziale 10.

Charakterystyka poszczególnych form SMA

SMA1 (choroba Werdniga-Hoffmanna)

W najcięższej postaci SMA objawy kliniczne występują już w okresie życia płodowego (osłabienie ruchów płodu). Po urodzeniu noworodki otrzymują zwykle niską punktację w skali Apgar, często wykazują cechy ciężkiej niewydolności oddechowej. W badaniu stwierdza się hipotonię, obniżoną spontaniczną aktywność, porażenie czterokończynowe, brak odruchów fizjologicznych. Kończyny dolne odwiedzone są w stawach biodrowych, zgięte w stawach kolanowych - leżą w "pozycji żaby", nie stawiają oporu przy prostowaniu. Przy unoszeniu dziecka (ręka pod klatką piersiową) tułów tworzy ostry łuk, kończyny zwisają w pozycji wyprostnej, głowa opada. Ruchy dowolne bywają ograniczone do ruchów dłoni i stóp. Brzuch jest wzdęty, przepona uniesiona wysoko, porażone mięśnie międzyżebrowe są nieefektywne. Dzieci te płaczą cicho, zwykle mają trudności w ssaniu i połykaniu. Zalegająca wydzielina oraz porażenie mięśni międzyżebrowych usposabiają do ciężkich infekcji dolnych dróg oddechowych. Rokowanie w tej grupie chorych jest złe.

W nieco łagodniejszym wariacie tej postaci początek bywa trudny do uchwycenia. Po 2-3 miesiącach pozornego zdrowia, rodziców i otoczenie zaczyna niepokoić brak postępu w rozwoju ruchowym dziecka. Znaczne osłabienie mięśni osiowych powoduje, że niemowlę nie może unieść głowy znad podłoża, nie może przekreślać się z pleców na brzuch i na odwrot, nie siada. Przy podciąganiu za ręce do pozycji siedzącej głowa opada do tyłu. Dziecko posadzone przyjmuje tzw. „pozycję scyzoryka”, położone na plecach - „pozycję żaby”.

Czasem początek choroby jest ostry. Zdarza się, że rozwijające się zupełnie prawidłowo niemowlę z dnia na dzień traci aktywność ruchową, staje się wiotkie. Zwykle ma to związek czasowy z infekcją dróg oddechowych bądź przebytych szczepieniem.

Przykurcze nie są objawem dominującym w SMA1. Często jednak stwierdza się ograniczenie odwodzenia w stawach biodrowych oraz wyprostu w stawach łokciowych i kolanowych. Zanik mięśni w tej formie choroby

maskowany jest zwykle tkanką tłuszczową. Charakterystyczne jest drżenie paluszków. Odruchy głębokie są przeważnie nieobecne.

Mięśnie przepony, twarzy i mięśnie gałkoruchowe są zaoszczędzone. Nie stwierdza się zaburzeń czucia i objawów piramidowych. Rozwój psychiczny jest prawidłowy, często bardzo dobry.

Duża skłonność do nawracających infekcji dróg oddechowych, a zwłaszcza zapaleń płuc powoduje, że dzieci z SMA1 giną z reguły w pierwszych 2-4 latach życia. Dzieci, u których objawy stwierdza się przy urodzeniu, umierają zwykle wcześniej. Część pacjentów (około 10%), u których początek choroby przypada zwykle na 3-6 mż, przeżywa jednak kilka, a nawet kilkanaście lat. Ich sprawność ruchowa nie ulega poprawie, z czasem dochodzi do znacznego zaniku mięśni. Szybko rozwijają się przykurcze stawowe i skrzywienia kręgosłupa, stąd konieczność wczesnego zaopatrzenia ortopedycznego i rehabilitacji. Pacjenci ci tworzą grupę 1b tzw. chroniczną postać choroby Werdniga-Hoffmanna.



Fot.1
SMA 1 (choroba
Werdniga-Hoffmanna)

SMA2 (postać pośrednia)

Rozwój ruchowy dzieci z SMA2 w pierwszym półroczu życia z reguły nie odbiega od normy. Głowę podnoszą o czasie, przekręcają się z pleców na brzuch, siadają. Część z nich zaczyna raczkować. Na tym etapie rozwój zostaje zahamowany. Z czasem okazuje się, że nie mogą samodzielnie stanąć i unieść ciężaru ciała, nie potrafią też chodzić. Część z nich przestaje samodzielnie unosić głowę. W cięższych przypadkach opóźnienie rozwoju ruchowego widoczne jest na

wcześniejszym etapie. Niektóre z tych dzieci zaczynają siadać z bardzo dużym opóźnieniem np. w 18 mż. Podobnie jak w postaci ostrej, osłabienie mięśniowe jest symetryczne, dosiebne i bardziej nasilone w kończynach dolnych. Siła mięśni obręczy barkowej bywa nieco lepsza.

W postaci pośredniej SMA występuje znaczna wiotkość mięśniowa oraz wiotkość stawów. Odruchy głębokie są z reguły zniesione bądź znacznie osłabione. Obserwuje się drżenie palców i fibrylacje na języku. Z upływem czasu zaznacza się zanik mięśni. Wcześnie i szybko rozwijają się przykurcze stawowe: w stawach biodrowych, kolanowych oraz przykurcz ścięgien Achillesa. Najgroźniejszym powikłaniem, niejednokrotnie decydującym o życiu, jest skrzywienie kręgosłupa. Osłabienie mięśni osiowych i unieruchomienie w pozycji siedzącej na wiele godzin doprowadzają do szybko postępującego skrzywienia kręgosłupa i deformacji klatki piersiowej. Powikłania oddechowe, związane z osłabieniem mięśni międzyżebrowych i zaburzeniem stosunków anatomicznych narządów klatki piersiowej, są główną przyczyną zgonów w tej grupie chorych. Wynika stąd konieczność wczesnej rehabilitacji i zaopatrzenia ortopedycznego. Długość przeżycia chorych z SMA 2 wynosi zwykle kilkanaście lat i wydłuża się wraz z rozwojem możliwości zapobiegania i leczenia powikłań.



Fot. 2
SMA 2
(postać pośrednia)

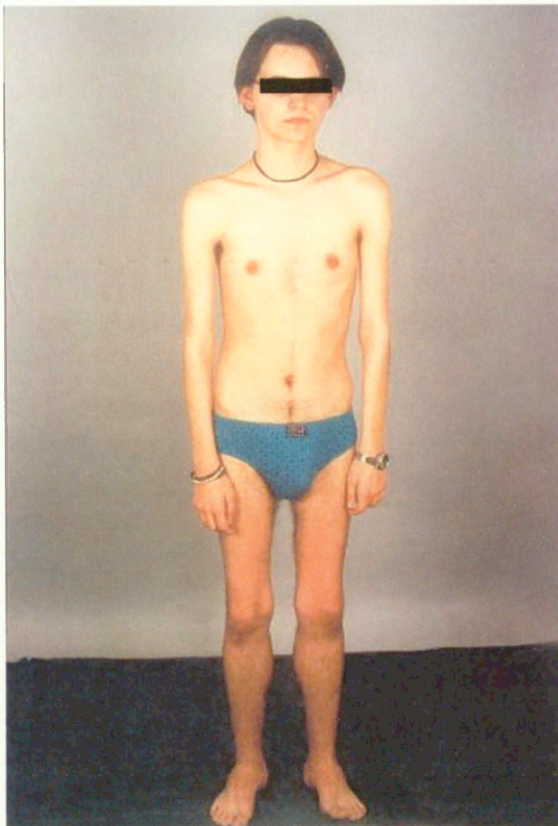
SMA3 (choroba Kugelberga-Welander)

Łagodna postać rdzeniowego zaniku mięśni charakteryzuje się największym zróżnicowaniem początku wystąpienia objawów klinicznych. Do tej grupy zaliczane są dzieci i młodzież, których rozwój ruchowy w pierwszym roku życia nie odbiegał od normy, które o czasie zaczęły siadać i chodzić. Pierwsze objawy pod postacią osłabienia, dotyczącego przede wszystkim mięśni obręczy biodrowej, pojawiają się pomiędzy 18 miesiącem a 20-30 rokiem życia. Pierwsze dostrzegane trudności dotyczą zwykle wchodzenia po schodach, wspinania się na stopień autobusu, wstawania z podłogi czy fotela.

W grupie tej wyróżnia się dwie formy: ostrzejszą 3a i łagodniejszą 3b. W grupie 3a objawy niejednokrotnie można uchwycić bardzo wcześnie. Dzieci te często od początku chodzą źle (chód kaczkowaty), przewracają się, wstają opierając się o przedmioty. Wcześniej w porównaniu z grupą 3b tracą zdolność samodzielnego chodzenia. W grupie 3b pierwsze objawy mogą być bardzo dyskretne i długo nie zauważane przez chorego i otoczenie. Dopiero wyraźne osłabienie przy wykonywaniu czynności dnia codziennego skłania ich do szukania pomocy.

W pierwszym okresie choroby odruchy głębokie mogą być zachowane. Jako pierwszy zanika odruch kolanowy. Obserwuje się drżenie palców, fibrylacje na języku, fasykulacje mięśni. Z czasem pojawia się zanik, dotyczący przede wszystkim mięśni dosiebnych. Ponadto może występować przerost łydek, podobny do przerostu w dystrofii Duchenne'a i Becker'a. Nie stwierdza się zaburzeń czucia, objawów piramidowych ani zaburzeń funkcji zwieraczy.

Przebieg choroby jest powoli postępujący, czasem przez wiele lat stacjonarny. Pogorszenie sprawności zwykle wiąże się z unieruchomieniem (złamanie kończyny) lub infekcją, często dochodzi do niego w okresie dojrzewania, kiedy następuje intensywny wzrost i zmiana masy ciała. W grupie 3a chorzy zwykle przestają chodzić po kilku - kilkunastu latach, w grupie 3b zdolność chodzenia mogą zachować przez wiele lat. Rokowanie co do życia w obu grupach jest dobre. Im wcześniej jednak dochodzi do unieruchomienia, tym większe ryzyko skrzywień kręgosłupa i łączących się z tym powikłań oddechowych.



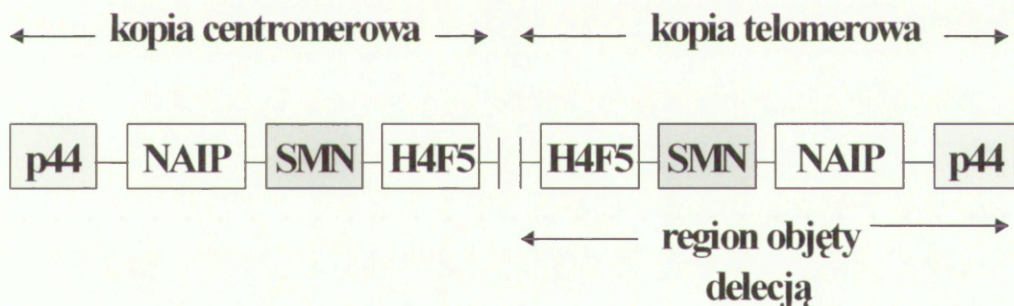
Fot. 3
SMA 3 (choroba
Kugelberga-Welander)

1.3 SMA 1, 2 i 3 jako choroba alleliczna

W 1990 roku wszystkie trzy postaci choroby zmapowano do długiego ramienia chromosomu 5 (5q11.2-13.3) (12, 82). Odkrycie to pozwoliło definitywnie ujednoczyć tę heterogenną klinicznie jednostkę chorobową. Jak wiadomo, w erze rozwoju biologii molekularnej nie zdarza się to często. Przywołajmy choćby jeden przykład - neuropatii uwarunkowanych genetycznie, gdzie niemal każdy miesiąc przynosi odkrycie nowego genu.

Dalsze badania, oparte na mapowaniu fizycznym oraz na analizie wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych umożliwiły zawężenie badanego fragmentu do tzw. regionu SMA o wielkości 1 Mb. Region ten charakteryzuje się występowaniem dwóch odwróconych względem siebie kopii: telomerowej (położonej bliżej telomeru chromosomu) i centromerowej (położonej bliżej centromeru), każda po około 500 kb (ryc.1). W 1995 roku w regionie SMA w obrębie każdego z fragmentów zidentyfikowano 3 geny: *SMN*. (survival of motor neuron, gen warunkujący przeżycie motoneuronów), *NAIP* (neuronal apoptosis

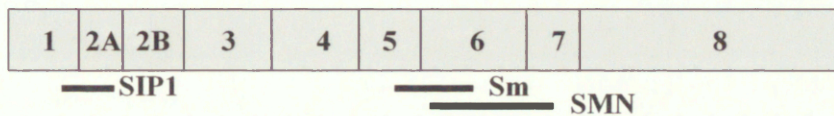
inhibitor protein, gen białka hamującego apoptozę neuronów) i gen *p44* (gen podjednostki p44 podstawowego czynnika transkrypcyjnego TFIIH) (19, 73, 98). W 1998 roku w regionie SMA stwierdzono obecność czwartego genu *H4F5* (102). Wszystkie cztery geny występują w dwóch kopiach: telomerowej i centromerowej. Kopie poszczególnych genów różnią się między sobą pojedynczymi podstawieniami nukleotydowymi. Obie kopie genu *SMN* – *SMN1* (telomerowa) i *SMN2* (centromerowa), o wielkości 20 kb każda, składają się z 9 eksonów (ryc.2) i kodują transkrypt wielkości 1,7 kb. Za powstanie objawów choroby odpowiedzialne są mutacje w obrębie kopii telomerowej genu *SMN* (*SMN1*). Delecje eksonu 7 i 8 (w części przypadków tylko 7) kopii telomerowej genu *SMN1* obecne są u 95-98% pacjentów z SMA. Mutacje kopii centromerowej (*SMN2*) nie są patogene i występują w 5% zdrowej populacji (73).



Ryc. 1 Schemat budowy regionu SMA (5q11.2)

Produkty pozostałych trzech genów: *NAIP*, *p44* i *H4F5* pełnią prawdopodobnie rolę modyfikującą. Szczególnie interesujący wydaje się być z punktu widzenia patogenezy choroby gen *NAIP*. Produkt ekspresji tego genu wykazuje częściową homologię z białkami baculowirusów. Białka te są inhibitorami apoptozy i mają zdolność hamowania tego procesu w komórkach ssaków *in vitro*. Jednak stosunkowo częste występowanie mutacji w obrębie genu *NAIP* w zdrowej populacji sugeruje jedynie jego udział w modulowaniu przebiegu klinicznego choroby. Mutacje genów *NAIP*, *p44* i *H4F5*, bez mutacji w obrębie

geny *SMN1*, nie wywołują samodzielnie objawów rdzeniowego zaniku mięśni. Mutacje obejmujące te geny są znacznie rzadsze. Delecje kopii telomerowej genu *NAIP* występują z różną częstością, w zależności od populacji.



Ryc. 2 Schemat budowy genu *SMN*. W schemacie nie uwzględniono intronów. Cyframi zaznaczono kolejne eksony, liniami - miejsca przyłączenia białka Sm i SIP1 oraz domenę oligomeryzacji białka SMN.

1.4 Mutacje genu *SMN 1* – podstawowe w patogenezie SMA

Jak wspomniano powyżej, istotne z punktu widzenia patogenezy SMA są jedynie mutacje genu *SMN1*. U około 90-98% pacjentów stwierdza się brak eksonu 7 tego genu. Wydaje się, że do utraty eksonu 7 może dochodzić na drodze dwóch różnych mechanizmów: rzeczywistej delecji lub konwersji sekwencji kopii telomerowej i centromerowej genu *SMN*. W drugim przypadku badania z zastosowaniem markera C272 wykazały obecność *locus* kopii *SMN1* przy jednocześnie stwierdzanej homozygotycznej delecji tego genu, co sugerowało częściowe zastąpienie go kopią centromerową. Obecnie uważa się, że ciężka postać - SMA1, warunkowana jest rzeczywistą delecją, natomiast formy łagodniejsze (SMA2 i 3)- konwersją sekwencji kopii telomerowej z centromerową (25).

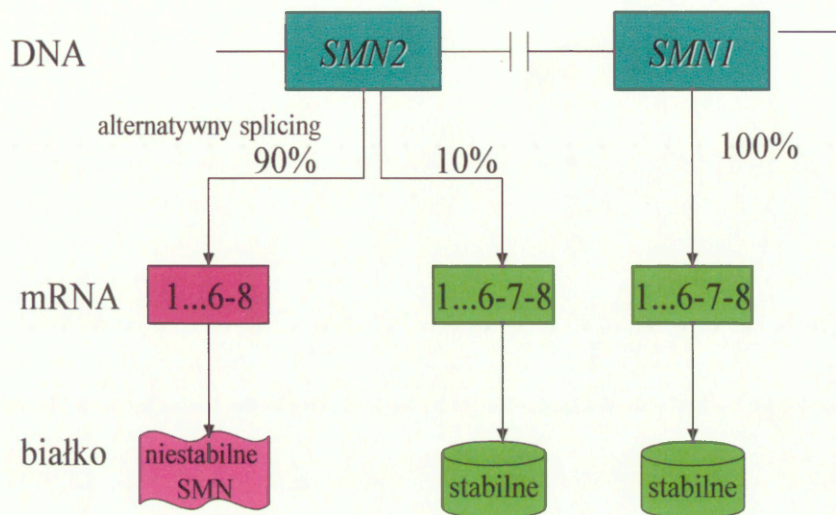
U 2-5% pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni znajdowane są inne mutacje wewnątrzgenowe. Dotychczas opisano w literaturze 27 takich mutacji (22, 51, 73, 80, 88,115, 116). Najczęstsza z nich, zidentyfikowana u 9 pacjentów to Y272I (116). Większość mutacji punktowych mapowało się do eksonu 6 i 7, regionu wysoce konserwowanego ewolucyjnie, a stanowiącego domenę wiązania

białka Sm oraz oligomeryzacji białka SMN, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania produktu genu.

1.5 Korelacje fenotypowo-genotypowe

Jak się wydaje, przebieg kliniczny rdzeniowego zaniku mięśni uwarunkowany jest przede wszystkim poziomem białka SMN w tkankach. Badania ilościowe wykazały niemal zupełny brak białka SMN u chorych z SMA 1 oraz częściowy jego niedobór w formach łagodnych (32, 72).

Białko SMN powstaje w wyniku ekspresji obu genów: *SMN1* i *SMN2* (73). Wskutek alternatywnego składania (ang. alternative splicing) z genów *SMN1* i *SMN2* tworzy się kilka typów mRNA. W przypadku kopii *SMN1* - 90% stanowi transkrypt pełnej długości, 10% - transkrypt pozbawiony eksonu 5. W wyniku składania kopii *SMN2* powstaje transkrypt pozbawiony eksonów 5 i 7 oraz około 10% mRNA pełnej długości, analogicznego do transkryptu kopii *SMN1* (ryc.3). Ekson 7 koduje domenę oligomeryzacji białka SMN, podstawową dla jego funkcjonowania (78). Białko pozbawione tej domeny (a więc 90% produktu kopii *SMN2*) jest nieaktywne. Jednak zwielokrotnienie liczby kopii centromerowych lub powstanie genów hybrydowych (składających się z części *SMN1* i *SMN2* tzw. konwersja) umożliwia częściowe wyrównanie niedoboru pełnowartościowego białka SMN (25, 42).



Ryc. 3 Oba geny *SMN1* i *SMN2* ulegają ekspresji. Wskutek alternatywnego składania eksonów tylko 10% produktu genu *SMN2* stanowi pełnowartościowe białko.

Istnieje wiele dowodów prawidłowości przedstawionego rozumowania.

Badania ilościowe prowadzone u pacjentów z homozygotyczną delecją genu *SMN1* wykazały obecność średnio 2,4 kopii centromerowych (od 0,7 do 3,5) u pacjentów z SMA1, 3,6 (od 2,5 do 4,6) w grupie z SMA2 i 4,1 (od 3,4 do 5,2) u pacjentów z SMA3 (109). Wynika stąd, że w przypadkach z łagodną formą choroby brakujące kopie *SMN1* zostają zastąpione przeciętnie dwoma kopiami *SMN2*. Nigdy nie opisano także przypadku z homozygotyczną delecją zarówno kopii *SMN1* jak i *SMN2*, co sugeruje letalność takiej mutacji.

Kolejnym dowodem wpływu liczby kopii centromerowych na fenotyp choroby jest model zwierzęcy SMA - mysz transgeniczna (64, 84, 85). Myszy posiadają tylko jedną kopię genu *Smn*, której delecja jest letalna w okresie płodowym (103). Linia zwierząt, którym udało się wprowadzić jedną kopię *SMN2* prezentowała objawy ciężkiego rdzeniowego zaniku mięśni z tetraplegią i zaburzeniami oddychania. Zwierzęta te ginęły wkrótce po urodzeniu. Myszy

z kilkoma ludzkimi kopiami *SMN2* rozwijały się natomiast prawidłowo, nie wykazując żadnych objawów chorobowych.

W przypadku konwersji kopia *SMN1* zostaje częściowo zastąpiona kopią *SMN2*, co na poziomie ekspresji zwykle powoduje powstanie transkryptu podobnego do mRNA kopii centromerowej. W rzeczywistości ekspresji ulegają niejako 4 kopie *SMN2*, co skutkuje najczęściej łagodnym fenotypem.

Z dotychczas prowadzonych badań wynika także, że duże delecje obejmujące swym zasięgiem nie tylko gen *SMN1*, ale i *NAIP* (oraz ew. gen *p44*) zdecydowanie częściej występują u pacjentów z SMA1. Dane na ten temat są zróżnicowane w literaturze (20, 97, 111). Część autorów podaje występowanie delecji *NAIP* u czterdziestu kilku procent pacjentów z SMA1 i kilkunastu z SMA3.

1.6 Białko SMN zaangażowane w procesie metabolizmu RNA.

Produktem ekspresji genu *SMN* jest białko SMN o ciężarze 38kDa, składające się z 294 aminokwasów (73). Białko to, wraz z kilkoma innymi, tworzy wielobiałkowy kompleks, obecny zarówno w cytoplazmie w postaci rozproszonej, jak i w jądrze komórkowym, w strukturach jądrowych zwanych "gems" (gemini to coiled bodies) (76). Nazwa tych struktur związana jest z podobieństwem w zakresie kształtu, wielkości (0,1-1µm), a także reakcji na czynniki środowiskowe do opisanych w 1903 roku "coiled bodies" (CBs).

W kompleksie białko SMN współwystępuje z co najmniej sześcioma innymi białkami: Geminą 2 (znaną do niedawna jako SIP1 - SMN interacting protein 1), Geminą 3 (białko dp103, RNA helikaza należąca do rodziny białek DEAD-box), Geminami 4, 5, 6 i 7 (2, 28, 29, 48, 77, 95). Oddziałuje także z wieloma innymi białkami - substratami kompleksu: snRNP (ang. small nuclear ribonucleoproteins), snoRNP (ang. small nucleolar ribonucleoproteins: fibryllaryna, GAR1), coiliną (49, 94, 96). Substraty te charakteryzuje obecność domeny bogatej w argininę i glicynę (ang. RG-rich domain), warunkującej prawdopodobnie oddziaływanie z kompleksem.

Wydaje się, że kompleks SMN w cytoplazmie zaangażowany jest przede wszystkim w tworzenie spliceosomu, podstawowego narzędzia w obróbce

potranskrypcyjnej (43, 44). Spliceosom jest kompleksem odpowiedzialnym za składanie pre-mRNA, czyli wycinanie intronów. Zbudowany jest on z snRNP, tzw. snurps. Każdy spliceosomalny snRNP składa się z jednego lub dwóch snRNA (U1, U2, U5, U4/6), jednego z ośmiu niespecyficznych białek Sm (B, B', D1, D2, D3, E, F i G) oraz polipeptydów specyficznych tylko dla danego snRNP. Za biogenezę snRNP odpowiedzialny jest właśnie kompleks SMN. Umożliwia on wiązanie transkrybowanego w jądrze i przetransportowanego do cytoplazmy spliceosomalnego RNA z białkami Sm, obecnymi tylko w cytoplazmie. Ulegając jeszcze wielu modyfikacjom spliceosom podąża do jądra, gdzie bierze udział w składaniu pre-mRNA.

Jak się wydaje, rola kompleksu SMN nie ogranicza się jedynie do biogenezy snRNPs, zaangażowanych w alternatywne składanie. Wydaje się, że w jądrze białko to jest bezpośrednio zaangażowane w składanie pre-mRNA oraz transkrypcję i metabolizm rybosomalnego RNA. Poprzez oddziaływanie z RNA polimerazą II bierze udział w transkrypcji (96). Współdziałając z GAR1 i fibrillaryną, specyficznymi markerami snoRNP, zaangażowane jest w metabolizm rybosomalnego RNA (67, 94). Wiadomo, że oddziałuje także z białkami związanymi z procesem apoptozy: Bcl-2 i p53 (65, 119). Możliwość udziału białka SMN w regulacji apoptozy potwierdzają także ostatnie prace (112). Nadekspresja białka SMN w liniach komórkowych efektywnie blokuje zainicjowany proces śmierci komórki.

Poznanie coraz to nowych substratów białka SMN wydaje się przemawiać za jego wielofunkcyjnością. Tym bardziej zaskakuje fakt, że tak specyficzny tkankowo fenotyp wywołany jest niedoborem białka tak uniwersalnego i ważnego w życiu każdej komórki.

1.7 Badania genetyczne we współczesnej diagnostyce SMA

Do połowy lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia rozpoznanie rdzeniowego zaniku mięśni stawiano na podstawie obrazu klinicznego oraz wyniku badania elektrofizjologicznego i histopatologicznego mięśnia. Po identyfikacji genu *SMN1* klasyczny schemat diagnostyczny został poszerzony o badanie molekularne. Okazało się bowiem, że wysoki odsetek mutacji stanowi delecja eksonu 7 na obu allelach. Dało to możliwość opracowania szybkiego i wiarygodnego testu genetycznego. Test ten, oparty na technice PCR, wykrywa homozygotyczną delecję eksonu 7 genu *SMN1* (110). Nie daje natomiast możliwości identyfikacji innych niż delecje mutacji oraz określenia stanu nosicielstwa SMA.

Z upływem czasu badanie molekularne ze względu na swoją nieinwazyjność oraz wyższą czułość i specyficzność w porównaniu z klasyczną diagnostyką, zaczęto traktować jako badanie przesiewowe w kierunku SMA. Schemat diagnostyczny, w którym badanie genetyczne stawiane jest na pierwszym miejscu jest dyskusyjny, ale nie bezpodstawny. Musi on jednak uwzględniać fakt, że brak delecji czyli prawidłowy wynik badania genetycznego nie wyklucza rozpoznania. Kilka procent przypadków związanych jest przecież z innymi niż delecje mutacjami genu *SMN1*. W praktyce brak delecji jest najczęściej interpretowany jako podstawa do wykluczenia choroby.

Nadal nie rozwiązany został problem diagnostyki chorych spełniających kryteria diagnostyczne SMA, a nie wykazujących homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. Molekularne potwierdzenie rozpoznania SMA, związanego z mutacją w genie *SMN1*, jest bardzo istotne dla poradnictwa genetycznego. Daje możliwość udzielenia właściwej porady genetycznej oraz oferowania diagnostyki prenatalnej. Poszukiwanie mutacji punktowej w każdym przypadku nie wykazującym delecji jest jednak zbyt kosztowne i pracochłonne. Opracowanie i wdrożenie testu przesiewowego (opartego np. na badaniu ilościowym) niezwykle ułatwiłoby zadanie genetyka, jasno określając wskazania do poszerzonej diagnostyki molekularnej.

Kolejnym wyzwaniem stojącym przed diagnostyką molekularną jest opracowanie rutynowego testu na nosicielstwo. Częstość nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* ocenia się od 1 na 42 do 1 na 50 osób w zdrowej populacji. W przypadku rodzin ryzyka (rodzeństwo, ciotki, wujowie) częstość nosicielstwa jest

znacznie wyższa. Choć ze względu na charakter dziedziczenia ryzyko wystąpienia choroby u krewnych jest niewielkie, to jednak wyższe niż w zdrowej populacji. Istotny jest także czynnik psychologiczny. Rodziny pacjentów stoją wobec trudnej do pokonania bariery własnego strachu przed zachorowaniem lub posiadaniem chorego potomstwa. Wprowadzenie badań nosicielstwa zmutowanego genu ułatwiłoby poradnictwo genetyczne, także w rodzinach, w których dziecko zmarło z podejrzeniem SMA, a nie zabezpieczono materiału do badania genetycznego. Wdrożenie testu na nosicielstwo do rutynowej diagnostyki ograniczyłoby wykonywanie badań prenatalnych z przyczyn psychologicznych, umożliwiłoby także wykrywanie mutacji *de novo* (ok. 2% przypadków SMA)

2. CELE PRACY

Cele pracy:

2.1 Aspekty praktyczne

- 2.1.1. Ocena częstości występowania delecji eksonu 7 genu *SMN1* w polskiej populacji chorych.
- 2.1.2. Opracowanie schematu diagnostyki molekularnej SMA.

2.2 Cele poznawcze

- 2.2.1 Charakterystyka fenotypu i genotypu polskiej populacji chorych na rdzeniowy zanik mięśni, z uwzględnieniem przypadków atypowych.
- 2.2.2 Ocena korelacji fenotypowo-genotypowych.
- 2.2.3 Poszukiwanie mutacji punktowych w grupie chorych spełniających kryteria diagnostyczne Międzynarodowego Konsorcjum SMA, a nie wykazujących homozygotycznej delecji w genie *SMN1*.
- 2.2.4 Opracowanie metody badania nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* w rodzinach ryzyka.

Cele pracy podzieliłam na dwie grupy: aspekty praktyczne i cele poznawcze. W pierwszej części skupiłam się na problemach, których rozwiązanie może przynieść wymierne korzyści w procesie diagnostycznym chorych z klinicznym podejrzeniem SMA oraz w poradnictwie genetycznym. Cele poznawcze obejmują opracowanie badania nosicielstwa zmutowanego genu, poszukiwanie mutacji punktowych w polskiej populacji chorych na SMA oraz analizę fenotypu, genotypu i korelacji fenotypowo-genotypowych pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni. Opracowanie metody badania nosicielstwa SMA traktuję jako cel poznawczy pracy, choć wdrożenie tej metody do rutynowej diagnostyki mogłoby w sposób istotny wpłynąć na poradnictwo genetyczne. Tematykę analizy fenotypowej podejmowano już wielokrotnie. Jednakże poznanie podłoża molekularnego SMA umożliwiło weryfikację dotychczasowych danych oraz poszerzenie analizy o aspekty genetyczne.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 . Badana grupa

Przebadano grupę 442 chorych skierowanych na badanie molekularne z podejrzeniem SMA, w tym grupę 291 pacjentów zarejestrowanych w Zespole Badawczym Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN i Klinice Neurologii Akademii Medycznej w Warszawie oraz 151 chorych kierowanych na w/w badania z klinik i oddziałów neurologii dziecięcej, pediatrii i intensywnej opieki medycznej z całej Polski w latach 1998 - 2001.

Badania finansowane były z grantu KBN N^o 4P05E 001 12 oraz grantu promotorskiego KBN N^o 4P05E 134 21.

W pierwszej grupie pacjentów zebrane informacje kliniczne pochodzą z historii chorób, kart Poradni Chorób Mięśni, konsultacji własnych oraz rodowodów zgromadzonych w Pracowni Neurogenetyki Zespołu Badawczego Chorób Nerwowo-Mięśniowych. Informacje kliniczne dotyczące drugiej grupy pochodzą z ankiet wypełnianych przez lekarzy kierujących na badanie molekularne. Przypadki bez podstawowych informacji klinicznych nie zostały w pracy uwzględnione. Podawane w pracy numery rodzin są tożsame z numerami rodowodów w Pracowni Neurogenetyki.

Materiał:

- Częstość występowania delecji eksonu 7 oceniano na podstawie analizy danych 291 pacjentów zarejestrowanych w Pracowni Neurogenetyki. Przypadki spoza naszego ośrodka wyłączono z oceny ze względu na brak możliwości weryfikacji rozpoznania.
- Ocenę fenotypu polskiej populacji pacjentów z SMA przeprowadzono w grupie 357 pacjentów (wszystkich z potwierdzoną delecją lub mutacją punktową w genie *SMN1*).
- Ocenę genotypu polskiej populacji pacjentów przeprowadzono w grupie 219 chorych z pełną oceną wielkości delecji w regionie SMA (analiza eksonu 7 i 8 genu *SMN1* oraz eksonu 5 genu *NAIP*)

- Poszukiwanie mutacji punktowych wraz z dokładną analizą kliniczną przeprowadzono w grupie 9 chorych, spełniających kryteria diagnostyczne SMA, a nie wykazujących homozygotycznej delecji w genie *SMN1*.
- Ilościową ocenę liczby kopii genu *SMN1* i *SMN2* przeprowadzono w grupie 14 osób (2 osoby zdrowe bez danych na występowanie SMA w rodzinie; 2 nosiciele – rodzice dziecka chorego na SMA1; 1 osoba zdrowa z homozygotyczną delecją kopii centromerowej, 9 osób z podejrzeniem mutacji punktowej, badanych pod kątem oceny heterozygotyczności).

3.2 Metody

W pracy umieściłam metodykę tylko tych badań, które przeprowadzałam samodzielnie*.

3.2.1 Identyfikacja delecji w genie *SMN*, *NAIP*

3.2.1.1 Izolacja DNA z krwi pełnej

Preparaty DNA uzyskiwano z leukocytów krwi obwodowej, pobranej do probówek zawierających EDTA. Preparatykę wykonano z zastosowaniem metody stopniowego wysalania białek nasyconym roztworem NaCl wg Millera i wsp. (83). DNA zawieszano w buforze TE (bufor TE: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8) i przechowywano w temperaturze – 20⁰ C lub +4⁰ C.

3.2.1.2 Badanie przesiewowe w kierunku delecji eksonu 7 genu *SMN1*

Powielanie DNA metodą PCR

Otrzymane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących – eksonu 7 genu *SMN1*. Zastosowano następującą parę starterów:

ekson 7 - (R111) 5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA -3'

(X7-Dra) 5'-CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT - 3'

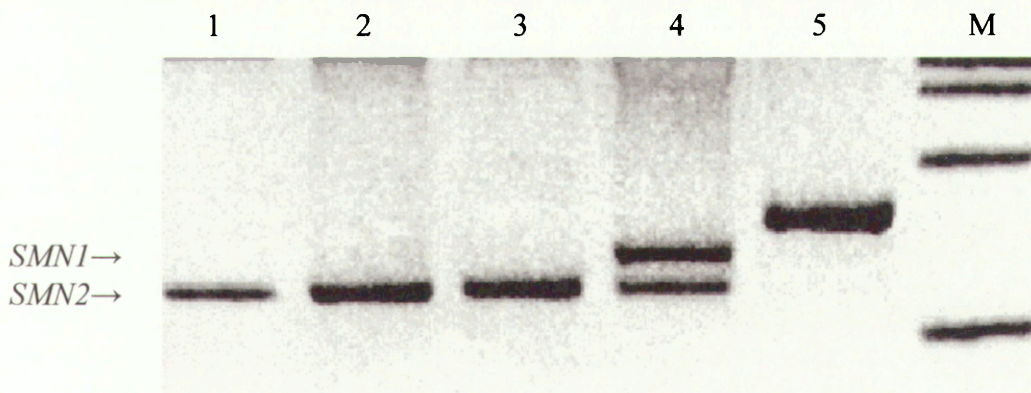
*Przesiewowy test na obecność delecji eksonu 7 genu *SMN1* oraz część badań mających na celu identyfikację delecji eksonu 8 genu *SMN1* i eksonu 5 genu *NAIP* przeprowadzono w Zakładach Genetyki Instytutu Matki i Dziecka oraz Instytutu Psychiatrii i Neurologii. Dziękuję dr Wojciechowi Wiszniewskiemu i dr Januszowi Zimowskiemu za udostępnienie wyników tych badań.

Wszystkie opisane reakcje PCR wykonywano przy użyciu starterów wykonanych przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w amplifikatorze MJ Research PTC 200.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 μ l według schematu:

- Wstępna denaturacja w temp. 95⁰ C przez 5min
- Powielanie (35 cykli)
 - ✓ Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 1 min
 - ✓ Przyłączanie starterów w temp. 55⁰ C przez 1 min
 - ✓ Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
- Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 8 min

Produkty PCR następnie trawiono enzymem restrykcyjnym DraI w temperaturze 37⁰ C przez 2 godziny w celu rozróżnienia kopii telomerowej od centromerowej. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym.



Ryc. 4 Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji eksonu 7 genu *SMN*, trawionych enzymem restrykcyjnym Dra I: 1-3 pacjenci z SMA (widoczny jest jedynie fragment odpowiadający kopii centromerowej genu), 4 - osoba zdrowa (obecne są obie kopie genu), 5 - fragment nietrawiony, M - marker wielkości.

3.2.1.3 Badanie w kierunku delecji eksonu 8 genu *SMN1*

Powielanie DNA metodą PCR

Otrzymane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących – eksonu 8 genu *SMN1*. Zastosowano następującą parę starterów:

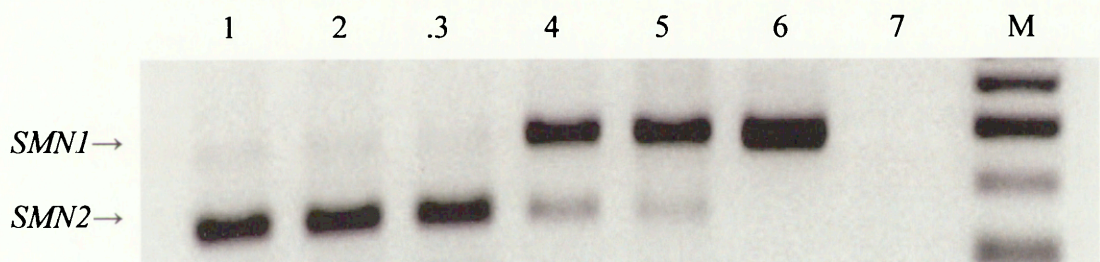
ekson 8 - F 5'-GTAATAACCAAATGCAATGTGAA -3'

R 5'-CTACAACACCCCTTCTCACAG -3'

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 µl według schematu:

- Wstępna denaturacja w temp. 95⁰C przez 5min
- Powielanie (35 cykli)
 - ✓ Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 1 min
 - ✓ Przyłączanie starterów w temp. 55⁰ C przez 1 min
 - ✓ Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
- Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 8 min

Produkty PCR następnie trawiono enzymem restrykcyjnym DdeI w temperaturze 37⁰ C przez 2 godziny w celu rozróżnienia kopii telomerowej od centromerowej. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym.



Ryc. 5 Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji eksonu 8 genu *SMN1*, trawionych enzymem restrykcyjnym DdeI. 1-3 pacjenci z SMA (widoczny jedynie fragment odpowiadający kopii centromerowej genu), 4 - osoba zdrowa (obecne obie kopie genu), 5 - osoba chora z izolowaną utratą eksonu 7, a zachowanym eksonem 8, co może świadczyć o obecności konwersji genu *SMN* (widoczne obie kopie genu), 6 - produkt PCR nietrawiony, 7 - czysta kontrola, M - marker wielkości eksonu 8 *SMN1*

3.2.1.4 Badanie w kierunku delekcji eksonu 5 genu *NAIP*

Powielanie DNA metodą PCR

Otrzymane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących – eksonu 5 i 13 genu *NAIP*. Powielenie eksonu 13 traktowane jest jako kontrola wewnętrzna prawidłowego przeprowadzenia reakcji – sekwencje są identyczne w kopii telomerowej i centromerowej. Ekson 5 obecny jest tylko w kopii telomerowej.

Zastosowano następujące pary starterów:

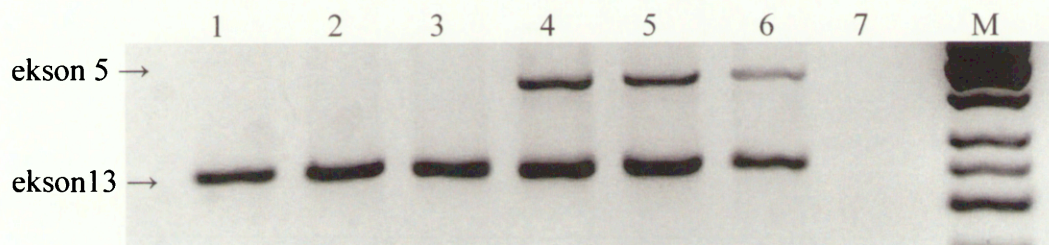
ekson 5 F 5'- AAAGCCTCTGACGAGAGGATC - 3'
 R 5'- CTCTCAGCCTGCTCTTCAGAT - 3'

ekson 13 F 5'- ATGCTTGGATCTCTAGAATGG - 3'
 R 5'- CCAGCTCCTAGAGAAAGAAGGA - 3'

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 µl według schematu:

- Wstępna denaturacja w temp. 95⁰ C przez 5min
- Powielanie (30 cykli)
 - ✓ Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 1 min
 - ✓ Przyłączanie starterów w temp. 58⁰ C przez 1 min
 - ✓ Synteza w temp. 72⁰ C przez 1 min
- Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 8 min

Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym



Ryc. 6 Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji eksonu 5 i 13 genu *NAIP*. Ekson 13, obecny w obu kopiach genu - telomerowej i centromerowej, traktowany jest jako kontrola wewnętrzna reakcji. Brak produktu amplifikacji eksonu 5, obecnego tylko w kopii telomerowej genu, świadczy o delecji. 1-3 - osoby chore na SMA (widoczny tylko prążek odpowiadający eksonowi 13), 4-5 - osoby zdrowe (widoczne oba prążki), 6 - osoba chora, z prawidłowym genem *NAIP* (widoczne oba prążki), 7 - próba kontrolna, M - marker wielkości

3.2.2. Poszukiwanie mutacji punktowych w genie *SMN1*

3.2.2.1. Powielanie DNA metodą PCR

Otrzymane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących – eksonu 1, 2A, 2B, 3, 4, 5, 6 i 7 genu *SMN* przy zastosowaniu następujących par starterów (wg Parsons, 1998):

ekson 1	F 5'-GCCGGAAGTCGTCACTCTT-3' R 5'-GGGTGCTGAGAGCGCTAATA -3'
ekson 2A	F 5'-CTGATTAAACCTATCTGAACATG-3' R 5'-CGTATGTTATCAATTCCTTTCCA-3'
ekson 2B	F 5'-CTGTGCACCACCCTGTAACATG-3' R 5'-AAGGACTAATGAGACATCC-3'
ekson 3	F 5'-CGAGATGATAGTTTGCCCTC-3' R 5'-CTCATCTAGTCTCTGCTTCC-3'
ekson 4	F 5'-CACCTTATAACAAAAACCTGC -3' R 5'-GAGAGGTTAAATGTCCCGA-3'
ekson 5	F 5'-TGAGTCTGTTTGACTTCAGG-3' R 5'-TATCAAATTGTATGTGAAAGCA-3'
ekson 6	F 5'-CTCCCATATGTCCAGATTCTCTT-3' R 5'-AAGAGTAATTTAAGCCTCAGACAG-3' F'5'-GTTTACTGGATATAAACAATATC-3'
ekson 7	F 5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATC-3' R 5'-GTAAGATTCACCTTTCATAATGCTG-3'

Dla eksonu 6 zaprojektowano drugi starter F (F'), ponieważ pierwszy nie obejmował całego regionu kodującego na końcu 5'.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 100 µl według schematu:

- Wstępna denaturacja w temp. 94⁰ C przez 5min
- Powielanie (35 cykli)
 - ✓ Denaturacja w temp. 94⁰ C przez 1 min
 - ✓ Przyłączanie starterów w temp. 55⁰ C przez 1 min
 - ✓ Synteza w temp. 72⁰ C przez 2 min
- Synteza uzupełniająca w temp. 72⁰ C przez 8 min

Produkty powielania oczyszczano z zastosowaniem zestawu QIA Quick Purification Kit (Qiagen).

3.2.2.2 Sekwencjonowanie produktów PCR

Analizę sekwencyjną przeprowadzoną w automatycznym sekwenatorze ABI 310 (Perkin Elmer). Reakcje sekwencjonowania przeprowadzono metodą cykliczną z czterema dideoksynukleotydtrifosforanami wyznakowanymi fluorochromami, przy użyciu zestawu do sekwencjonowania DNA Sequencing Kit (Perkin Elmer) zgodnie z zaleceniami producenta. Jako starterów użyto oligonukleotydów używanych w w/w reakcji PCR

3.2.3 Ilościowa ocena liczby kopii telomerowych i centromerowych przy użyciu techniki „real-time PCR”

3.2.3.1 Powielanie metodą „real-time PCR”

Otrzymane DNA oczyszczano przy użyciu filtrów (Millipore). Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie (spektrofotometr Gene Quant II firmy Pharmacia) przy długości fali 260 nm. Uzyskane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących eksonu 7 genu *SMN1* i *SMN2* z zastosowaniem następujących par starterów oraz sondy TaqMan MGB, zaprojektowanych w programie Primer Express (Applied Biosystem):

SMN1:

F 5'- TTAACATCCATATAAAGCTATCTATATATAGCTATCTAAG -3'

R 5'- CACCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTCTG -3'

SMN2:

F 5'- TTAACATCCATATAAAGCTATCTATATATAGCTATCTAAA-3'

R 5'- CACCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTCTA -3'

Sonda TaqMan MGB wyznakowana 6-FAMTM

5'-TTTAACTTCCTTTTATTTTCCTTACAGGG-3'

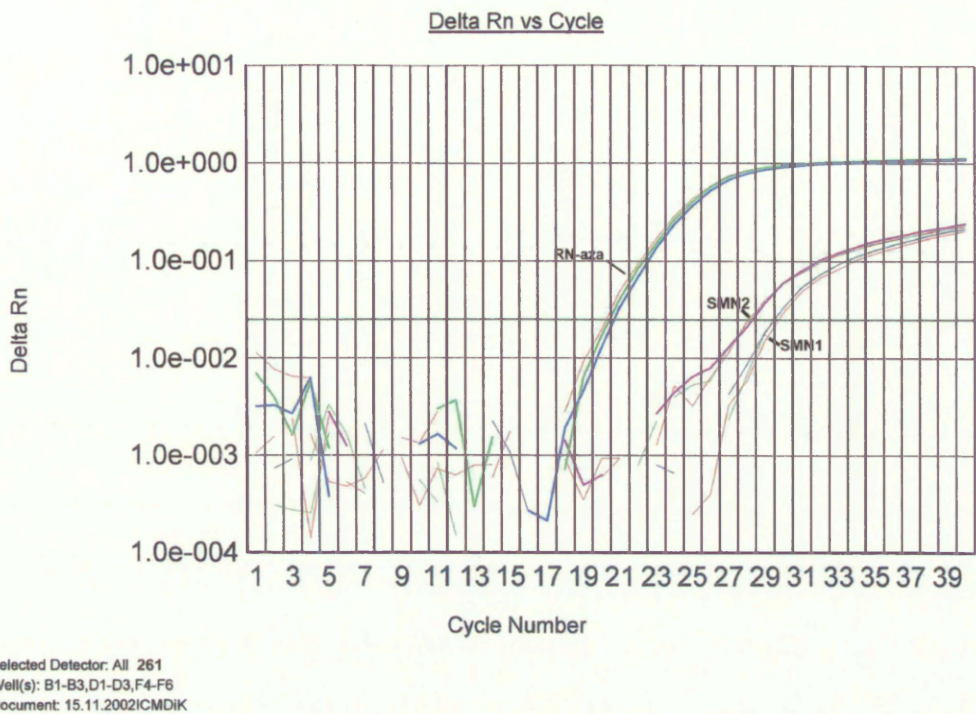
Reakcję RT-PCR prowadzono w objętości 50 μ l (osobno dla *SMN1* i *SMN2*), zawierającej : 25 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (firmy Applied Biosystem), 900 nmol każdego ze starterów, 200 nmol sondy TaqMan, 25 ng DNA. Reakcję PCR wykonywano w aparacie ABI Prism 7000 Sequence Detection System według schematu:

- Aktywacja UNG w temp. 50⁰ C przez 2 min
- Wstępna denaturacja w temp. 95⁰ C przez 10 min
- Powielanie (40 cykli)
 - ✓ Denaturacja w temp. 95⁰ C przez 15 s
 - ✓ Przyłączanie starterów i synteza w temp. 60⁰ C przez 1 min

Jako system zewnętrznej kontroli użyto genu *RN-azy* (jedna kopia genu) (zestaw Taq Man RN-ase P Control Reagents System firmy Applied Biosystem). Reakcję prowadzono wg podanego powyżej schematu w objętości 50 μ l.

3.2.3.2 Interpretacja wyników

Technika „real-time PCR” (ilościowy PCR, PCR w czasie rzeczywistym) pozwala na ilościową ocenę produktu reakcji PCR. Tym samym technika staje się niezwykle przydatna w ocenie dawki genu. Podstawowym parametrem ocenianym w tej metodzie jest wartość C_T (ang. treshold cycle, cykl progowy) - cykl, w którym reakcja zachodzi w sposób liniowy, a tym samym liczba powstałych w tym okresie cząsteczek jest wprost proporcjonalna do wyjściowej liczby cząsteczek (zgodnie z wzorem $N = N_0 (1+E)^n$, gdzie N - badana liczba cząsteczek, N_0 - wyjściowa liczba cząsteczek, E - wydajność reakcji - stała w okresie liniowego przyrostu, n - liczba cykli). Porównując zależność C_T badanego genu (*SMN1* lub *SMN2*) i *RN-azy* do zależności C_T genu wzorcowego i *RN-azy* możemy ocenić dawkę badanego genu (1, 2, 3 lub więcej kopii).



Ryc. 7 Wynik amplifikacji metodą „real-time PCR”, wykonanej na aparacie ABI Prism 7000*, z użyciem sondy TaqMan dla genów *SMN1*, *SMN2* i *RN-azy*. Trzy krzywe (każda w trzech powtórzeniach) odpowiadają kolejno wynikom amplifikacji genów: *RN-azy*, *SMN2* i *SMN1*. Zwraca uwagę różnica C_T dla genów *SMN1* i *SMN2*, świadcząca o różnej wydajności reakcji (stosowano identyczne stężenia DNA). Stąd konieczność zastosowania kontroli zewnętrznej (w tym przypadku zastosowano gen *RN-azy*).

3.2.4 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną korelacji pomiędzy wielkością delecji a nasileniem objawów klinicznych SMA w grupie 219 chorych przeprowadzono przy użyciu systemu SAS z wykorzystaniem dokładnego testu Fishera.

*Bardzo dziękuję firmie Applied Biosystem za udostępnienie sprzętu, instruktaż i życzliwość

4. WYNIKI

4.1 Częstość występowania obuallelicznej delecji eksonu 7 genu *SMN1* w polskiej populacji chorych na SMA

Do chwili obecnej zgromadziłam dane 442 pacjentów z podejrzeniem dosiebnego rdzeniowego zaniku mięśni, u których przeprowadzono weryfikację molekularną rozpoznania. Delecję eksonu 7 w obu allelach genu *SMN1* zidentyfikowano u 356 pacjentów czyli u 80% (80,54%) badanych. Prezentowana grupa obejmowała wszystkich pacjentów skierowanych na badanie genetyczne w kierunku SMA. Badanie to wykonywano zatem nie tylko u chorych spełniających kryteria diagnostyczne wg Międzynarodowego SMA Konsorcjum, ale również w ramach diagnostyki dziecka wiotkiego, zespołu dwuobrczowego czy w wielu innych przypadkach wątpliwych i trudnych diagnostycznie.

Jak wspomniano w rozdziale 3.1, badaną grupę zawężono do 291 pacjentów. Po ponownej analizie danych klinicznych, elektrofizjologicznych i/lub histopatologicznych, diagnozę dosiebnego rdzeniowego zaniku mięśni podtrzymano u 269 chorych. W tej grupie delecję eksonu 7 genu *SMN1* wykazano w 260 przypadkach, co stanowi około 96,5% (96,65%) badanych.

W pozostałych 9 przypadkach istniało wysokie prawdopodobieństwo, że za objawy kliniczne odpowiedzialne są mutacje punktowe. Mutacje te występujące w układzie heterozygotycznym z delecją nie są identyfikowane w rutynowym teście molekularnym. W związku z tym grupa ta została zakwalifikowana do dalszych badań molekularnych, których celem ostatecznym była genetyczna weryfikacja rozpoznania klinicznego SMA (identyfikacja mutacji punktowych). Analizę danych klinicznych oraz wyniki rozszerzonej diagnostyki molekularnej przedstawiono w podrozdziale 4.6.

Po powtórnej analizie danych 291 przypadków w dwudziestu dwóch zmieniono rozpoznanie. W grupie tej dominowało SMA odsiebne (9 przypadków, w tym 2 z artrogrypozą), a ponadto objawy uszkodzenia OUN (5 przypadków), dystrofie mięśniowe (3 przypadki), neuropatie wrodzone (2 przypadki), zanik pojedynczych mięśni (2 przypadki), MND (1 przypadek).

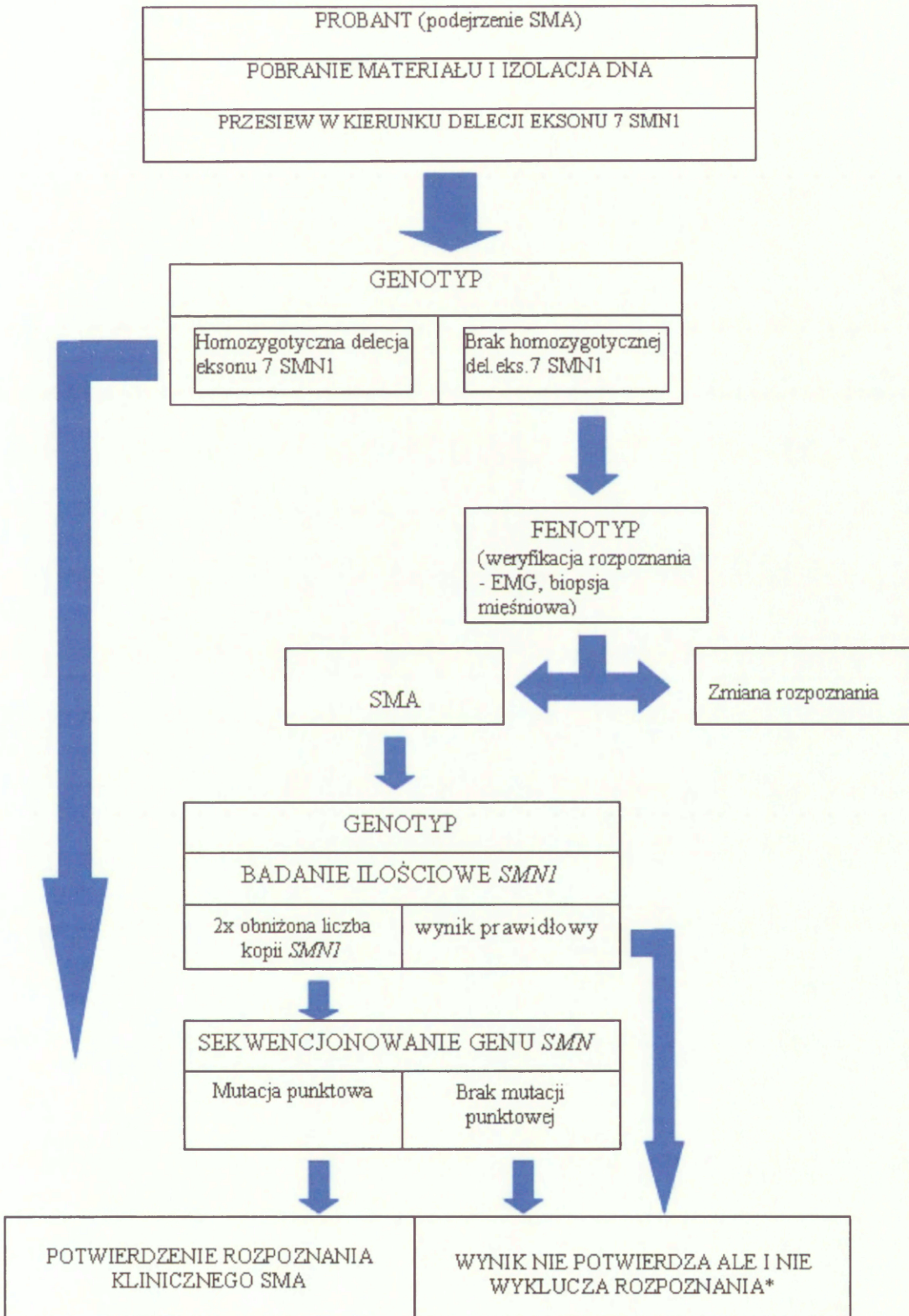
Nie stwierdzono delecji w genie *SMN1* w 143 osobowej grupie kontrolnej (rodzice, zdrowe rodzeństwo), poza jednym przypadkiem (informacja od J. Zimowskiego). Homozygotyczną delecję eksonu 7 wykryto u młodszej siostry dziecka z SMA 3a. Dziewczynka w chwili badania nie wykazywała żadnych objawów klinicznych choroby. Badano ją jednak jako kilkumiesięczne niemowlę.

4.2 Schemat diagnostyki molekularnej SMA

Poniżej przedstawiono proponowany schemat diagnostyki molekularnej chorych z podejrzeniem SMA.

Wysoki odsetek delecji w polskiej populacji chorych na SMA pozwala traktować badanie oparte na metodzie PCR jako bardzo czuły test przesiewowy. Niewielki odsetek przypadków wywołany jest mutacjami punktowymi, występującymi w układzie heterozygotycznym z delecją. W celu ich wykrycia jako kolejny etap rozszerzonej diagnostyki molekularnej proponujemy badanie ilościowe liczby kopii genu *SMN1*. Chorzy z dwukrotnie obniżoną liczbą kopii telomerowych w porównaniu z kontrolą są potencjalnymi heterozygotami i u nich wskazane jest sekwencjonowanie genu. Identyfikacja mutacji punktowej ostatecznie potwierdza rozpoznanie rdzeniowego zaniku mięśni.

Prawidłowy wynik badania ilościowego oraz brak identyfikacji mutacji punktowej nie wykluczają jednak choroby (sytuacja zaznaczona w schemacie gwiazdką). Szerszy komentarz na ten temat zamieszczono w dyskusji.



4.3 Fenotyp polskiej populacji chorych na SMA, z uwzględnieniem zmienności wewnątrzrodzinnej i przypadków atypowych

Rozkład zachorowań w poszczególnych grupach z uwzględnieniem płci

W badanym materiale najczęstszą postacią okazała się forma łagodna – SMA3, stanowiąc blisko 43% (152/357) ogółu przypadków (Tabela II).

Pozostałe postacie choroby występowały odpowiednio z częstością: SMA1 - 36,7% (131 pacjentów) oraz SMA2 - 20,7% (74 pacjentów).

W analizowanym materiale zwracała również uwagę przewaga płci męskiej, dotycząca wszystkich grup (poza SMA3a). W grupie 3b dwukrotnie rzadziej chorowały kobiety. Zjawisko to obserwowano od dość dawna. Interesujące wydaje się spostrzeżenie, że podobna zależność dotyczy również postaci ostrej (M:K = 5:4) i pośredniej (M:K = 3:2), choć przewaga płci męskiej nie jest w tych grupach tak zdecydowana.

Tabela II

Rozkład zachorowań w poszczególnych grupach z uwzględnieniem płci

	SMA1	SMA2	SMA3a	SMA3b	RAZEM
KOBIETY	58	29	44	23	154
MĘŻCZYŹNI	73	45	42	43	203
RAZEM	131	74	86	66	357

Wiek zachorowania

Rdzeniowy zanik mięśni charakteryzuje duża rozpiętość wieku zachorowania. W najcięższych przypadkach pierwsze objawy choroby stwierdza się w okresie życia płodowego (osłabienie ruchów płodu), w najłagodniejszych - w wieku młodzieńczym lub nawet dorosłym. W badanym materiale jedynie u kilkorga chorych (3%) objawy stwierdzane były w momencie urodzenia. Dzieci te rodziły się w ciężkim stanie ogólnym, z niewydolnością oddechową. U ponad 25% chorych objawy stwierdzano w pierwszym lub drugim miesiącu życia. Była to przede wszystkim wiotkość, niedowład kończyn dolnych oraz niewydolność oddechowa w przebiegu zapalenia dolnych dróg oddechowych. Kolejny szczyt

zachorowań, dotyczący około 10% pacjentów, to szósty - siódmy miesiąc życia. Brak postępu w rozwoju ruchowym dziecka skłaniał rodziców lub lekarzy pierwszego kontaktu do zasięgnięcia opinii neurologów. Wydaje się, że ów szczyt odzwierciedla raczej zwiększenie częstości stawianych w tym wieku rozpoznań, aniżeli rzeczywisty wzrost zachorowań. W tej grupie w kilku przypadkach wiązano początek choroby z infekcją, w dwóch ze szczepieniem przeciwko polio. W formie pośredniej jako wiek zachorowania podawano najczęściej siódmy (6% wszystkich zachorowań) i 11-12 miesiąc życia (5%). W formie łagodnej pierwsze objawy stwierdzano najczęściej w 12-13 miesiącu życia (około 6%) oraz po ukończeniu 2 roku życia (około 7%). Powyżej 3 roku życia wiek zachorowania rozkładał się w latach równomiernie, aż do 15-16 roku. Powyżej tego wieku nowe przypadki zachorowań stwierdzono bardzo rzadko, szczególnie wśród dziewcząt. Najstarsza badana osoba zachorowała w wieku 34 lat (przypadek rodzinny).

Zmienność wewnątrzrodzinna

Istotnym elementem oceny fenotypu jest analiza chorych rodzeństw. W badanym materiale obserwowano 68 rodzeństw (145 pacjentów). W dwudziestu jeden przypadkach (30,88%) stwierdzono występowanie zmienności wewnątrzrodzinnej tzn. przebiegu choroby różnego pod względem początku i nasilenia objawów. Dominowało współistnienie u rodzeństw SMA typu 2 i 3a (7 par) lub 3a i 3b (7par), a więc postaci niezbyt odmiennych fenotypowo (fot. 4). W kilku rodzeństwach obserwowano występowanie postaci pośredniej i łagodnej z zachorowaniem powyżej trzeciego roku życia (4 rodzeństwa). Tu rozbieżność fenotypowa była rzeczywiście duża. W rodzinie nr 531 (ryc.8) jedno z chorych dzieci zachorowało w 10 miesiącu życia, drugie w 9 roku życia. W rodzinie 529 (ryc.9) u chłopca chorobę rozpoznano w 12 roku życia, podczas gdy dwoje młodszego rodzeństwa było unieruchomione od urodzenia. W rodzinie 351 (ryc.10) jedna z dziewczynek zachorowała w 15 miesiącu życia, u drugiej, przez wiele lat traktowanej jako osoba zdrowa, pierwsze symptomy wystąpiły w 16 roku życia.



Fot. 4
Zmienność
wewnątrzrodzinna. Bracia
chorzy na SMA. U starszego
pierwsze objawy choroby
wystąpiły w 6-ym roku życia,
u młodszego - w wieku 12
miesiący

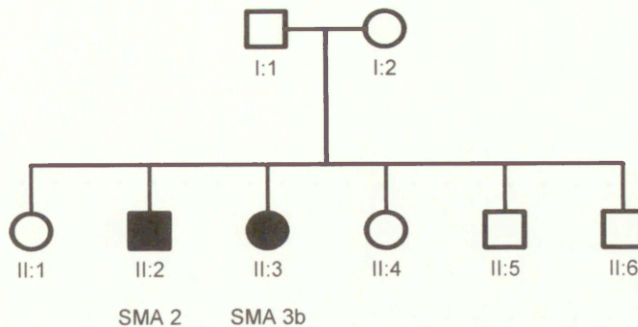
W rodzeństwach chorujących na różne typy SMA nie obserwowano wpływu płci na przebieg choroby. Na 21 rodzeństw 9 było mieszanych (brat i siostra). W 4 rodzeństwach łagodniej chorowali chłopcy, w 5 - łagodniejszy przebieg obserwowano u dziewczynek.

Różne formy SMA, obserwowane w rodzeństwach, przedstawiono w tabeli III.

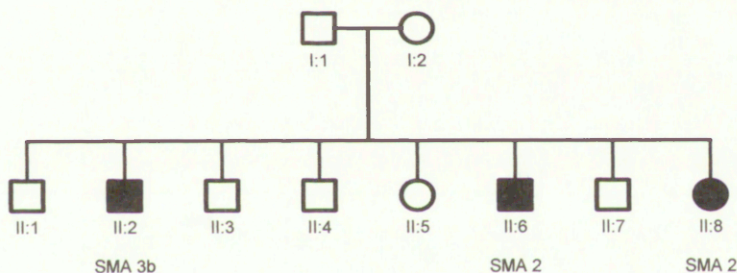
Nr rod.	Mężczyzna	Kobieta
51	3a, 3b	
52		2,3a
55	2, 3a	
236	3a, 3b, 3b	
279	2, 3a	3a
287	3a	3b
319	3a	3b
340	2, 3b	
341	2, 3a	
351		3a, 3b
450	3a, 3b	
466	1a, 1b	
510	2, 3a	
528	3a, 3b	
529	2, 3b	2
531	2	3b
562	3b	2
719	3a	2, 2
769	2	3a
771	1, 2	
793	2	1b

Tabela III

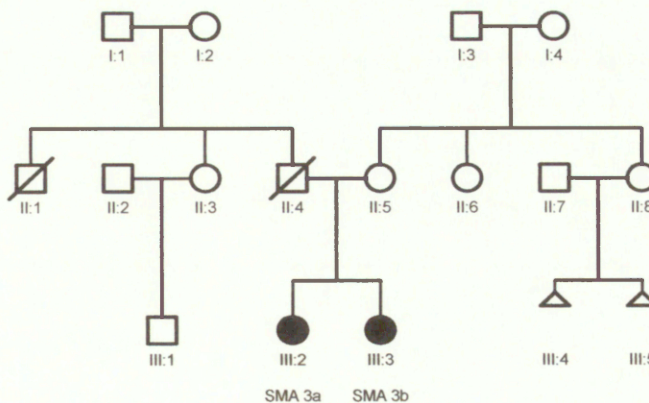
Współwystępowanie różnych postaci choroby w rodzeństwach chorych na SMA. W tabeli uwzględniono płeć chorych.



Ryc. 8 Rodzina 531. Współwystępowanie SMA 2 i 3b w jednym rodzeństwie



Ryc. 9 Rodzina 529. U chłopca chorobę rozpoznano w wieku 12 lat (SMA 3b). Dwoje młodszego rodzeństwa nigdy samodzielnie nie chodziło



Ryc. 10 Rodzina 351. Starsza siostra zachorowała w wieku 15 miesięcy - od początku chodziła źle. U młodszej siostry pierwsze symptomy choroby wystąpiły w 16 roku życia.

Objawy kliniczne

Analiza obrazu klinicznego wykazała bardzo wysoką homogenność rodzaju objawów klinicznych (rozkład osłabienia i zaniku mięśni), uwidaczniającą się zwłaszcza na tle dużego zróżnicowania wieku wystąpienia choroby i stopnia nasilenia objawów. U wszystkich pacjentów obserwowano osłabienie siły mięśniowej, bardziej nasilone dosiebnie. Zajęte były przede wszystkim mięśnie obręczy biodrowej, mięśnie osiowe i mięśnie obręczy barkowej. Osłabienie najwcześniej i najsilniej wyrażone było w mięśniach kończyn dolnych, zawsze symetryczne. U żadnego z badanych przeze mnie pacjentów nie stwierdzałam zajęcia mięśni twarzy. Występowanie nietypowego rozkładu osłabienia i zaników oraz asymetria objawów dotyczyły wyłącznie przypadków bez potwierdzenia genetycznego. Z drugiej strony u sześciu chorych, z potwierdzonym molekularnie rozpoznaniem, występowały objawy nietypowe dla SMA. Rozkład osłabienia i zaniku był u nich jednak typowy dla dosiebnego SMA. Dokładną analizę przypadków z objawami atypowymi przedstawiono poniżej.

Analiza przypadków atypowych z mutacją w genie *SMN1*

W analizowanych materiale 357 przypadków z klinicznymi objawami SMA, zweryfikowanych molekularnie, u 6 chorych stwierdzono objawy atypowe (Tabela IV), spełniające kryteria wykluczenia wg Międzynarodowego Konsorcjum SMA. W 2 przypadkach była to oligofrenia, w 3 artrogrypoza (w jednym przypadku z towarzyszącą wadą serca), w 1 cechy uszkodzenia OUN. W każdym z tych przypadków występował ponadto typowy dla dosiebnego SMA rozkład osłabienia i zaników

Tabela IV.
Analiza przypadków SMA z objawami atypowymi

Pacjent	Rod	SMA	R/S	Rok.ur	Objawy atypowe	Objawy typowe dla SMA
1	648	2	S	1990	Oligofrenia, oczopląs	Tak
2	-	2	S	1994	Oligofrenia	Tak
3	662	1	S	1998	Artrogrypoza	Tak
4	775	1	R	1998	Artrogrypoza	Tak
5	-	1	S	1998	Artrogrypoza, wada serca	Tak
6	736	3b	S	1983	Objawy uszkodzenia OUN (wygórowane odruchy głębokie, stopotrząs)	Tak

Legenda: rod.- rodowód

R/S- przypadek rodzinny/sporadyczny

Szczegółowe dane kliniczne dotyczące analizowanych przypadków przedstawiono poniżej.

Pacjent 1

ur. 1990; rodowód 648 (fot. 5)

Chłopiec urodzony z ciąży drugiej, prawidłowej. Poród odbył się siłami natury, bez powikłań. Przy urodzeniu chłopiec ważył 3500g, został oceniony na 10 pkt w skali Apgar. Z pierwszej ciąży urodził się zdrowy brat. Wywiad w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych w rodzinie był negatywny. Do 7-8 miesiąca życia chłopiec rozwijał się prawidłowo. Głowę dźwigał o czasie, siadał w 7 miesiącu życia, raczkował. Od około 8 miesiąca życia nastąpiło zahamowanie rozwoju ruchowego. W 15 miesiącu życia chłopiec próbował chodzić przy ścianie, nigdy jednak nie osiągnął zdolności samodzielnego chodzenia. Już w tym wieku zwracał uwagę opóźniony rozwój psychiczny. Początkowo rozpoznawano mózgowie porażenie dziecięce. W 8 roku życia chłopiec był hospitalizowany. Wówczas w badaniu neurologicznym stwierdzono z odchyłań: dużą kyfoskoliozę, oczopląs, wiotkość, niedowład czterokończynowy, brak odruchów głębokich. Chłopiec nie chodził, siadał z dużym trudem, słabo dźwigał głowę. W badaniach dodatkowych: zwracało uwagę prawidłowe stężenie CK (34IU), zapis neurogeny w

EMG, zmiany neurogenne w biopsji mięśniowej, obniżenie ilorazu inteligencji (IQ - 60). Badanie molekularne wykazało delecję eksonu 7 genu *SMN1*



Fot. 5
SMA 2 z objawami
atypowymi
(oligofrenia, oczopląs)

Pacjent 2

ur. 1994

Chłopiec urodzony z ciąży czwartej. Przebieg ciąży był prawidłowy, matka dobrze czuła ruchy płodu. Przy urodzeniu chłopiec ważył 3400 g. W pierwszym półroczu życia rozwój ruchowy nie odbiegał od normy. Wiotkość zauważono w 6 miesiącu życia. Chłopiec siedał w wieku 6 miesięcy, nigdy nie chodził samodzielnie. Od początku obserwowano opóźniony rozwój umysłowy.

W badaniu molekularnym stwierdzono homozygotyczną delecję eksonów 7 i 8 genu *SMN1*, przy prawidłowym genie *NAIP*.

Pacjent 3

ur. 1998, rodowód 662

Dziewczynka urodzona z ciąży drugiej prawidłowej. Poród odbył się siłami natury, o czasie. Przy urodzeniu dziecko oceniono na 10 pkt w skali Apgar. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. Dziewczynka była badana w wieku 5 miesięcy. W badaniu przedmiotowym zwracała uwagę zniekształcona klatka piersiowa oraz przykurcze w stawach nadgarstka.

W badaniu molekularnym stwierdzono homozygotyczną delecję eksonu 7 genu *SMN1*.

Pacjent 4

ur. 1998, rodowód 775

Chłopiec urodzony z ciąży drugiej, prawidłowej. Matka dobrze czuła ruchy płodu. Siostra chłopca zmarła w wieku czterech miesięcy z rozpoznaniem choroby Werdniga-Hoffmanna. Chłopiec urodził się siłami natury, o czasie, z masą ciała 3110 g. W badaniu przedmiotowym stwierdzono uogólnioną wiotkość, przykurcze w stawach nadgarstka łokciowych, i kolanowych, brak odruchów głębokich. Badanie molekularne wykazało delecję eksonu 7 i 8 genu *SMN1*.

Pacjent 5

ur. 1998

Chłopiec urodzony z ciąży trzeciej, porodu pierwszego, w 38 tygodniu ciąży. Dwie poprzednie ciąży matki zakończyły się niepowodzeniami - poronieniami samoistnymi. Ze względu na brak postępu porodu, przy obciążonym wywiadzie położniczym, ciążę zakończono cięciem cesarskim. Dziecko urodziło się w złym stanie ogólnym (4-5-5-5 pkt w skali Apgar), z masą ciała 2350 g. Ze względu na niewydolność oddechową i hipoksemię zostało zaintubowane w 3 minucie życia. W badaniu przedmiotowym stwierdzono uogólnioną wiotkość, brak odruchów głębokich, przykurcze w stawach kolanowych i łokciowych oraz wyraźny szmer skurczowy nad sercem. W badaniach dodatkowych nie stwierdzono nieprawidłowości w USG przeciemiążzkowym, natomiast w USG serca zwracał uwagę duży ubytek przegrody międzyprzedsionkowej (hemodynamicznie wspólny przedsionek) oraz szeroka tętnica płucna z cechami nadciśnienia płucnego.

Badanie molekularne wykazało delecję eksonów 7 i 8 genu *SMN1* oraz eksonów 5 i 6 genu *NAIP*

Pacjent 6

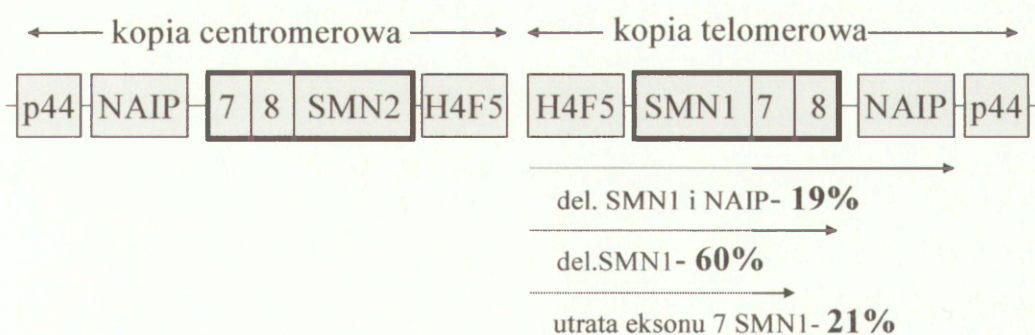
ur. 1983, rodowód 736

Chłopiec urodzony z ciąży drugiej. Z wywiadu wynika, że w pierwszym roku życia dziecko rozwijało się prawidłowo. Ze względu na wzmożone napięcie i przykurcze stawowe u chłopca rozpoznano mózgowie porażenie dziecięce, z powodu którego był rehabilitowany. Od około siedemnastego roku życia chłopiec zaczął odczuwać kurcze mięśni oraz mrowienia w obrębie kończyn dolnych,

po dłuższym wypoczynku. Miał kłopoty z wchodzeniem po schodach. W badaniu przedmiotowym stwierdzono prawidłowy chód, zarówno na palcach jak i na piętach, podnoszenie z siadu na podłodze bez podparcia. Na języku widoczne były fibrylacje. W obrębie kończyn górnych stwierdzono bardzo dobrą siłę mięśniową, przy żywych odruchach głębokich. Obserwowano fascykulacje i drzenie palców. W obrębie kończyn dolnych zwracał uwagę zanik mięśni, dotyczący głównie części dosiebnych kończyn, osłabienie zginaczy stawu biodrowego, przy dobrej sile w pozostałych grupach mięśni. Ponadto stwierdzono wygórowane odruchy głębokie, obustronny stopotrząs, brak odruchów podeszwowch. W badaniach dodatkowych zwracał uwagę neurogeny zapis w EMG. Badanie molekularne wykazało delecję eksonu 7 genu *SMN1*.

4.4 Genotyp polskiej populacji chorych na SMA - wielkość delecji w regionie SMA

Najczęstszą mutacją, występującą u 60% analizowanej populacji, była delecja eksonu 7 i 8 kopii telomerowej genu *SMN1*. U 19 % chorych występowały duże delecje, obejmujące swym zasięgiem gen *SMN* i *NAIP*. Aż 21% chorych wykazywało delecje dotyczące tylko eksonu 7 genu *SMN1* (ryc. 11).



Ryc. 11 Wielkość delecji w regionie SMA w polskiej populacji chorych na SMA. W schemacie genu SMN zaznaczono eksyony 7 i 8.

4.5 Korelacje fenotypowo-genotypowe

Duże delecje w regionie SMA związane z ciężkim fenotypem

W analizowanym materiale stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy wielkością delecji w regionie SMA a nasileniem objawów klinicznych ($p < 0,001$). Duże delecje, obejmujące swym zasięgiem geny *SMN1* i *NAIP*, występowały u ponad 35% (35,71%) chorych z formą ostrą choroby i zaledwie u 5% (5,21%) z postacią łagodną. Z drugiej strony izolowana utrata eksonu 7 stanowiła aż 50% mutacji w SMA3b i tylko 9% (9,18%) w SMA1 (tabela V).

Analizując te same dane w kontekście wielkości delecji w poszczególnych postaciach SMA ustalono, że aż 85% dużych delecji dotyczyło chorych z SMA1, a tylko 9% (9,76%) chorych z SMA2 i 5% (4,88%) chorych z SMA3. Natomiast 55% (55,56%) małych delecji łączyło się z formą łagodną, a odpowiednio 20% i 24% z postacią ostrą i pośrednią choroby (tabela V).

Podobne zależności stwierdzono analizując wielkość delecji w regionie SMA w grupie chorych płci męskiej i żeńskiej, z wyjątkiem postaci 3b. Izolowana utrata eksonu 7 genu *SMN1* występowała znacznie częściej u kobiet z formą 3b (66,67%), niż u mężczyzn (40%) (tabela VI i VII).

Interpretacja zamieszczonych danych w tabelach V,VI i VII:

Pierwszy rząd każdej z rubryk zawiera bezwzględną liczbę przypadków SMA, umiejscowioną w danej rubryce zależnie od postaci choroby i wielkości delecji. Drugi rząd cyfr to procent, jaki stanowi dana liczba przypadków w stosunku do całości. Trzeci rząd to odsetek, jaki stanowi określona liczba przypadków w danym wierszu, czwarty- odsetek w danej kolumnie.

Np.

Typ	Del.NAIP i SMNI
SMA1	35 - liczba przypadków SMA1 z delecją obejmującą gen SMNI i NAIP <i>15,98 - %, jaki stanowi 35 przypadków w całej grupie badanej (35/219)</i> 35,71 - %, jaki stanowi 35 przypadków w grupie chorych z SMA1(35/98) <i>85,37 - %, jaki stanowi 35 przypadków w grupie z delecją obejmującą gen SMNI i NAIP (35/41)</i>

Tabela V.

Zależność między wielkością delecji w regionie SMA a fenotypem

Typ		Del.NAIP i SMNI	Del 7 i 8 SMNI	Del.7 SMNI	Razem
SMA1		35	54	9	98
		<i>15,98</i>	<i>24,66</i>	<i>4,11</i>	<i>44,75</i>
		35,71	55,10	9,18	
		<i>85,37</i>	<i>40,60</i>	<i>20,00</i>	
SMA2		4	26	11	41
		<i>1,83</i>	<i>11,87</i>	<i>5,02</i>	<i>18,72</i>
		9,76	63,41	26,83	
		<i>9,76</i>	<i>19,55</i>	<i>24,44</i>	
SMA3	3a	1	38	9	48
		<i>0,46</i>	<i>17,35</i>	<i>4,11</i>	<i>21,92</i>
		2,08	79,17	18,75	
		<i>2,44</i>	<i>28,57</i>	<i>20,00</i>	
	3b	1	15	16	32
		<i>0,46</i>	<i>6,85</i>	<i>7,31</i>	<i>14,61</i>
		3,13	46,88	50,00	
		<i>2,44</i>	<i>11,28</i>	<i>35,56</i>	
Razem		41	133	45	219
		<i>18,72</i>	<i>60,73</i>	<i>20,55</i>	<i>100,00</i>

Tabela VI.

Zależność między wielkością delecji w regionie SMA a fenotypem u chorych płci męskiej.

Typ		Del.NAIP i SMNI	Del 7 i 8 SMNI	Del.7 SMNI	Razem
SMA1		19	32	7	58
		<i>15,08</i>	<i>25,40</i>	<i>5,56</i>	<i>46,03</i>
		32,76	55,17	12,07	
		90,48	41,03	25,93	
SMA2		1	16	8	25
		<i>0,79</i>	<i>12,7</i>	<i>6,35</i>	<i>19,84</i>
		4,00	64,0	32,0	
		4,76	20,51	29,63	
SMA3	3a	0	19	4	23
		<i>0,0</i>	<i>15,8</i>	<i>3,17</i>	<i>18,25</i>
		0,0	82,61	17,39	
		0,0	24,36	14,81	
	3b	1	11	8	20
		<i>0,79</i>	<i>8,73</i>	<i>6,35</i>	<i>15,87</i>
		5,00	55,0	40,00	
		4,7	14,10	29,63	
Razem		21	78	27	126
		<i>16,67</i>	<i>61,90</i>	<i>21,43</i>	<i>100,00</i>

Tabela VII.

Zależność między wielkością delecji w regionie SMA a fenotypem u chorych płci żeńskiej

Typ		Del.NAIP SMNI	i Del 7 i 8 SMNI	Del.7 SMNI	Razem
SMA1		16 <i>17,2</i> 40,0 <i>80,00</i>	22 <i>23,66</i> 55,0 <i>40,0</i>	2 <i>2,15</i> 5,0 <i>11,11</i>	40 <i>43,01</i>
SMA2		3 <i>3,23</i> 18,75 <i>15,0</i>	10 <i>10,75</i> 62,5 <i>18,18</i>	3 <i>3,23</i> 18,75 <i>16,67</i>	16 <i>17,2</i>
SMA3	3a	1 <i>1,08</i> 4,0 <i>5,0</i>	19 <i>20,43</i> 76,0 <i>34,55</i>	5 <i>5,38</i> 20,0 <i>27,78</i>	25 <i>26,88</i>
	3b	0 <i>0,0</i> 0,0 <i>0,0</i>	4 <i>4,3</i> 33,33 <i>7,27</i>	8 <i>8,6</i> 66,67 <i>44,44</i>	12 <i>12,9</i>
Razem		20 <i>21,51</i>	55 <i>59,14</i>	18 <i>19,35</i>	93 <i>100,00</i>

4.6 Mutacje punktowe u chorych nie wykazujących homozygotycznej delekcji w genie *SMN1*. Analiza przypadków.

Zgodnie z przedstawionymi wcześniej założeniami, w przypadkach spełniających kryteria diagnostyczne wg Międzynarodowego Konsorcjum SMA, a nie wykazujących homozygotycznej delekcji eksonu 7 genu *SMN1*, poszerzono diagnostykę molekularną celem identyfikacji małych mutacji wewnątrzgenowych. Jako metodę przesiewową wprowadzono ilościową ocenę liczby kopii genu *SMN1* (przy użyciu techniki „real-time PCR”). Test ten opierał się na założeniu, że mutacje punktowe występują w układzie heterozygotycznym z delekcją na drugim allelu. Zatem chorzy, u których podejrzewano mutacje punktowe, powinni mieć tylko jedną kopię genu *SMN1*. Wstępne badania ilościowe wykazały u 4 z 9 badanych chorych dwukrotnie zmniejszoną liczbę kopii telomerowych w porównaniu z kontrolą (osobą zdrową, która nie jest nosicielem). U tych chorych kontynuowano diagnostykę, poddając analizie sekwencyjnej regiony kodujące genu *SMN1*. Jedynie u jednego z nich zidentyfikowano mutację punktową.

Tabela VIII przedstawia zbiorcze dane analizy ilościowej genu *SMN1*. Jako kontrolę zewnętrzną zastosowano gen *RN-azy*.

Tabela VIII.

Analiza ilościowa genu *SMNI* u pacjentów podejrzewanych o mutacje punktowe. Różnica jednego cyklu pomiędzy pacjentami (1, 2, 3, 4) i zdrową kontrolą (10) wskazuje na dwukrotnie mniejszą ilość produktu reakcji (czyli dwukrotnie mniejszą liczbę kopii *SMNI*), a tym samym wysoce prawdopodobny układ heterozygotyczny z delecją na jednym allelu i potencjalną mutacją punktową na drugim. Podobne wyniki z dwukrotnym zmniejszeniem ilości produktu reakcji w porównaniu ze zdrową kontrolą uzyskano u nosicieli SMA.

Pacjent	C _T dla <i>SMNI</i>	C _T dla <i>RN-azy</i>	ΔC _T	Interpretacja
1	31,95	23,28	8,67	podejrzenie mutacji punktowej - w wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano mutację T274I
	31,67	23,22	8,45	
2	31,75	23,07	8,68	podejrzenie mutacji punktowej, metodą bezpośredniego sekwencjonowania nie zidentyfikowano mutacji punktowej
	31,51	23,21	8,3	
3	31,41	23,09	8,32	podejrzenie mutacji punktowej, metodą bezpośredniego sekwencjonowania nie zidentyfikowano mutacji punktowej
	31,45	?	?	
4 i 5	34,33	25,92	8,41	badano DNA zmarłej dziewczynki; podejrzenie mutacji punktowej, metodą bezpośredniego sekwencjonowania nie zidentyfikowano mutacji punktowej
	34,29	25,74	8,55	
6	31,91	24,91	7	wynik zbliżony do uzyskanego od zdrowej kontroli, objawy raczej nie związane z mutacją <i>SMNI</i>
	31,79	24,79	7	
7	30,26	22,63	7,63	wynik zbliżony do uzyskanego od zdrowej kontroli, objawy raczej nie związane z mutacją <i>SMNI</i>
	30,07	22,55	7,52	
8	31,85	24,66	7,19	wynik zbliżony do uzyskanego od zdrowej kontroli, objawy raczej nie związane z mutacją <i>SMNI</i>
	31,73	24,48	7,25	
9	30,78	23,48	7,3	wynik zbliżony do uzyskanego od zdrowej kontroli, objawy raczej nie związane z mutacją <i>SMNI</i>
	30,83	23,49	7,34	
10	32,17	24,94	7,23	kontrola, osoba zdrowa (nie nosiciel)
	32,28	24,82	7,46	

Mutację punktową zmiany sensu (T274I) zidentyfikowano u pacjenta 1.

Pacjenci 2, 3, 4 i 5 (pacjenci 4 i 5 jako rodzeństwo rozpatrywani są razem) posiadali dwukrotnie zmniejszoną liczbę kopii genu *SMN1*, jednak analiza sekwencyjna nie wykazała u nich obecności mutacji punktowej.

Pacjenci 6, 7, 8 i 9 mają prawidłową liczbę kopii genu *SMN1*, w związku z czym mało prawdopodobny jest związek występujących u nich objawów z mutacjami genu *SMN1*. Dla upewnienia się, również i u nich przeprowadzono sekwencjonowanie 8 eksonów kodujących genu, nie identyfikując jednak żadnej mutacji patogenicznej.

Poniżej przedstawiono analizę omawianych przypadków.

SMA związane z współistnieniem delecji z mutacją punktową T274I

Pacjent 1

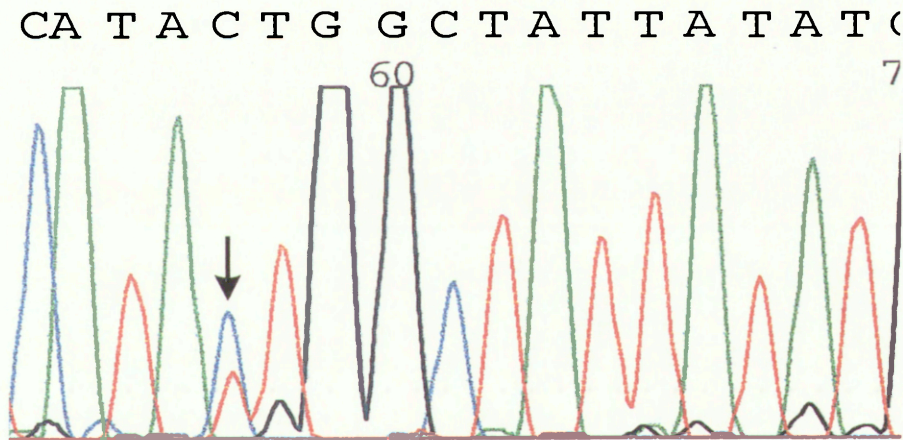
ur. 1986 (rodowód 546)

Dziewczynka urodzona z ciąży trzeciej, porodu pierwszego prawidłowego, o czasie, z masą urodzeniową 2540 g. Po urodzeniu dziecko w stanie ogólnym średnim, ocenione na 6 pkt w skali Apgar. Dwie poprzednie ciąży matki dziecka zakończyły się poronieniami samoistnymi w pierwszym trymestrze ciąży. Rodzice dziewczynki byli zdrowi, niespokrewnieni. Wywiad rodzinny nie był obciążony występowaniem chorób nerwowo-mięśniowych. Przebieg ciąży był prawidłowy. Ruchy płodu matka czuła dobrze. W pierwszym roku życia dziewczynka rozwijała się prawidłowo. Dziecko siedziało w 6 miesiącu życia, zaczęło samodzielnie chodzić przed 12 miesiącem życia. Około 2 roku życia dziewczynka zaczęła potykać się, upadać. Pojawiły się trudności z wchodzeniem po schodach, wstawaniem z podłogi. Z powodu narastających objawów dziewczynka hospitalizowana w 5 roku życia. Wówczas z odchyień w badaniu neurologicznym stwierdzono: drżenie języka, znaczną wiotkość, drżenie palców, osłabienie zginaczy stawu biodrowego i prostowników kolan, brak odruchów kolanowych. Zwraçała uwagę znaczna hiperlordoza, koślawość kolan i płaskostopie. Chód był kaczkowy. Dziewczynka nie potrafiła chodzić na piętach, słabo chodziła na palcach. Wstawiała z bardzo dużym trudem wspinając się po sobie, siadała przewracając się na bok.

W badaniach dodatkowych nie stwierdzono odchyień w podstawowych badaniach biochemicznych, dotyczących także CK i aldolazy. Zapis EMG

wskazywał na uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Obraz histopatologiczny wycinka mięśniowego (m. czworogłowy uda) odpowiadał zanikowi neurogenemu z wzorem obserwowanym w chorobie Werdniga-Hoffmanna. W EEG stwierdzono zapis w granicach normy dla wieku. W badaniu psychologicznym dziewczynka wykazywała przeciętny poziom rozwoju umysłowego (IQ 97).

Na podstawie obrazu klinicznego oraz wyników badań dodatkowych rozpoznano dosiebny rdzeniowy zanik mięśni typu 3a. Badanie molekularne nie wykazało obecności delecji eksonu 7 genu *SMN1*. W związku z powyższym rozszerzono diagnostykę molekularną o sekwencjonowanie genu *SMN1*, co umożliwiło identyfikację mutacji punktowej T274I (C854T) w eksonie 6 (ryc.12).



Ryc. 12 Mutacja zmiany sensu T274I. Miejsce mutacji zaznaczono strzałką. Zamiana cytozyny w tyminę w pozycji 854 w eksonie 6 genu *SMN1* powoduje na poziomie aminokwasowym zmianę treoniny w izoleucynę. Mutacja ta zlokalizowana jest w regionie tworzącym ważną funkcjonalnie domenę oligomeryzacji i wiązania z substratami białka SMN.

Pacjenci 2, 3, 4 i 5.

SMA związane z mutacjami w obrębie sekwencji promotorowych lub intronowych genu *SMN1*?

Pacjent 2

ur. 1985 (rodowód 569)

Dziewczynka urodzona z ciąży drugiej, prawidłowej, w stanie dobrym, z masą urodzeniową 2800 g. Poród odbył się przez cięcie cesarskie. Dziecko siedało w 7-8 miesiącu życia, stawało w 9 miesiącu życia, chodzić zaczęło z niewielkim

opóźnieniem około 17-18 miesiąca życia, od początku niepewnie i kołysząco. Dziewczynka zawsze biegła mniej sprawnie, wchodziła po schodach z trudem. Rodzice dziecka byli zdrowi, młodzi, niespokrewnieni. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. Choroba miała przebieg stacjonarny. Dziecko hospitalizowano w 10 roku życia. Wtedy w badaniu neurologicznym z odchyłań stwierdzono obniżenie napięcia mięśniowego, osłabienie zginaczy stawu biodrowego, słabe odruchy kolanowe. Dziewczynka siadała dość dobrze, wstawała z niewielkim trudem, gorzej chodziła na piętach.

W badaniach dodatkowych stwierdzono nieznacznie podwyższone wartości kinazy kreatynowej i aldolazy (CK 43,27 IU; norma 0-34; aldolaza 19,0 IU; norma 0-8). Zapis EMG wskazywał na uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego, dotyczące jedynie odcinka lędźwiowego. Obraz kręgosłupa w badaniu radiologicznym był prawidłowy. Obraz histopatologiczny wycinka mięśniowego (m. czworogłowy uda) odpowiadał zanikowi neurogennemu. W EEG stwierdzono zapis w granicach normy dla wieku. W badaniu psychologicznym dziecko wykazywało przeciętny poziom rozwoju umysłowego (IQ 96).

Całość obrazu klinicznego sugerowała rozpoznanie rdzeniowego zaniku mięśni, postaci łagodnej – SMA3a. Zwracał uwagę stacjonarny przebieg choroby przy stosunkowo wczesnym początku oraz ograniczenie procesu (w badaniu elektrofizjologicznym) do kończyn dolnych.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. W związku z tym rozszerzono diagnostykę molekularną poszukując mutacji punktowych. Analiza ilościowa wykazała obniżoną liczbę kopii genu *SMN1*, co może wskazywać na układ heterozygotyczny mutacji punktowej z delecją na jednym z alleli. Pełna analiza sekwencji 8 kodujących eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjent 3

ur. 1992 (rodowód 644)

Dziewczynka urodzona z ciąży pierwszej, prawidłowej, porodu powikłanego zakażeniem wewnątrzmacicznym (zielone wody płodowe), z masą ciała 3100 g. Przy porodzie dziecko ocenione na 8 pkt w skali Apgar. Rodzice byli zdrowi,

niespokrewnieni. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. W 2 miesiącu życia rozpoznano zwichnięcie lewego stawu biodrowego, leczone poduszką Frejki. Dziewczynka siadała w 9 miesiącu życia, chodziła w 20 miesiącu życia. Łatwo się przewracała. Dziecko hospitalizowano w 6 roku życia. W badaniu neurologicznym stwierdzono z odchyień: wiotkie napięcie w zakresie kończyn górnych i dolnych, słabsze przywodziciele ramienia, zginacze i odwodziciele stawu biodrowego, zginacze kolan i zginacze grzbietowe stopy. Ponadto zwracała uwagę pogłębiona lordoza lędźwiowa oraz nieco kaczkowy chód, niemożliwy na piętach. Dziewczynka nie potrafiła biegać, miała duże trudności z wchodzeniem po schodach.

W badaniach dodatkowych nie stwierdzono odchyień w podstawowych badaniach biochemicznych, w tym CK i aldolazy. Zapis EMG wskazywał na uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Badanie histopatologiczne mięśnia nie było miarodajne. W badanym wycinku stwierdzono obecność tkanki łącznej i tłuszczowej, bez włókien mięśniowych.

Rozpoznanie rdzeniowego zaniku mięśni typ 3a postawiono na podstawie obrazu klinicznego i wyniku badania elektrofizjologicznego. Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. W związku z tym rozszerzono diagnostykę molekularną poszukując mutacji punktowych. Analiza ilościowa wykazała obniżoną liczbę kopii genu *SMN1*, co mogło wskazywać na układ heterozygotyczny z delecją na jednym z alleli. Pełna analiza sekwencji 8 kodujących eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjenci 4 i 5

(rodowód 664)

Dziewczynka (ur. 1998, zm. 2000), urodzona z ciąży drugiej, prawidłowej, z masą ciała 3910 g. Ciężę zakończono cięciem cesarskim ze względu na krótkowzroczność matki. Przy porodzie dziewczynkę oceniono na 9 pkt w skali Apgar. Matka dobrze czuła ruchy płodu. Rodzice nie byli spokrewnieni. Wywiad w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych w rodzinie był negatywny. Dziewczynka nigdy nie dźwigała głowy, nigdy nie siadała. Często zapadała na infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych. W 4 miesiącu życia u dziecka rozpoznano dysplazję

stawów biodrowych, leczoną poduszką Frejki. Dziewczynkę badano neurologicznie w 12 miesiącu życia. Stwierdzono wówczas dużą wiotkość, opadanie głowy, tetraparezę - przy czym kończyny dolne były niemal całkowicie porażone, brak odruchów głębokich. Mięśnie twarzy nie były objęte procesem chorobowym. Rozwój psychiczny był prawidłowy. Dziecko zmarło w wieku 21 miesięcy z powodu zapalenia płuc.

U chorej nigdy nie wykonano badania elektrofizjologicznego. Badanie autopsyjne mięśnia czworogłowego uda wykazało obraz odpowiadający zmianom obserwowanym w SMA1.

Badanie genetyczne nie wykazało obecności homozygotycznej delekcji eksonu 7 genu *SMN1*.

Chłopiec (ur. 2001), urodzony z ciąży trzeciej, prawidłowej, z masą urodzeniową 3480 g. Przy porodzie dziecko ocenione na 9 pkt w skali Apgar. Do 3 miesiąca życia, zdaniem matki, chłopiec rozwijał się prawidłowo, dźwigał głowę. Potem nastąpiło zahamowanie rozwoju ruchowego. Dziecko badano neurologicznie w piątym miesiącu życia. Stwierdzono wówczas uogólnioną wiotkość, brak odruchów głębokich, dziecko w pozycji na brzuchu nie unosiło głowy. Konsultowane ponownie w wieku 18 miesięcy. W tym okresie chłopiec był bardzo wiotki, nie siedział i nie chodził samodzielnie, głowa często mu opadała. Do 22 miesiąca życia nie występowały infekcje dróg oddechowych, nie wymagał antybiotykoterapii. W 22 miesiącu życia rozwinęło się zapalenie płuc, wymagające oddechu wspomaganego, powikłane sepsą i ostrym zapaleniem otrzewnej. Po krótkim okresie poprawy miała miejsce kolejna infekcja dolnych dróg oddechowych. Chłopca ponownie badano w wieku 2 lat. Dziecko było wówczas przytomne, wyniszczone, wymagające oddechu zastępczego, bardzo wiotkie, z masywnym niedowładem czterokończynowym.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delekcji w genie *SMN1*. W związku z tym rozszerzono diagnostykę molekularną poszukując mutacji punktowych. Analiza ilościowa wykazała obniżoną liczbę kopii genu *SMN1*, co wskazywało na układ heterozygotyczny z delecją na jednym z alleli. Pełna analiza sekwencji kodujących 8 eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej. Założono hodowlę fibroblastów celem kontynuacji diagnostyki molekularnej w ośrodku zagranicznym.



Fot. 6
2-letni chłopiec z SMA1. Badanie genetyczne nie wykazało obuallelelicznej delekcji w genie *SMN1*.

Jedynie w 1 z przedstawionych powyżej 5 przypadków, z wysoce prawdopodobnym udziałem małej mutacji w patogenezie choroby (zmniejszona liczba kopii *SMN1*), zidentyfikowano mutację punktową. Wydaje się, że w pozostałych przypadkach za objawy choroby odpowiedzialne są mutacje położone w obrębie sekwencji promotorowych bądź intronowych genu. Drugą przyczyną niepowodzenia może być zawodność stosowanej metody bezpośredniego sekwencjonowania. W metodzie tej analizowane są obie kopie genu *SMN*, co przy skomplikowanej budowie regionu SMA może dawać wynik fałszywie ujemny.

Pacjenci 6, 7, 8, 9

SMA nie związane z mutacjami genu *SMN1*

Pacjent 6

ur. 1994 (rodowód 739)

Dziewczynka urodzona z ciąży pierwszej, o czasie, z urodzeniową masą ciała 2030 g. Z przyczyn społecznych przebywała w domu dziecka od 2 roku życia. Dziecko zaczęło chodzić z dużym opóźnieniem, około 4 roku życia, początkowo z balkonikiem, potem samodzielnie. Chód od początku był kaczkowy. Hospitalizowana w 6 roku życia. W badaniu neurologicznym stwierdzono z odchylen wiotkie napięcie, osłabienie mięśni obręczy biodrowej, brak odruchów

kolanowych. Kończyny dolne były szczupłe, z przeprostami w kolanach, stopy końsko-szpotaawe. Chód był kaczkowaty, na szerokiej podstawie, utrudniony na palcach i na piętach. Dziewczynka wstawiała z pozycji kucznej wspinając się po sobie. Zwracała uwagę pogłębiona lordoza lędźwiowa i kyfoza krzyżowa.

W badaniach dodatkowych nie stwierdzono odchyień w podstawowych badaniach biochemicznych, w tym CK i aldolazy. Zapis EMG wskazywał na uogólnione uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Rtg odcinka lędźwiowego wykazał tarń dwudzielną. Wynik badania rezonansu magnetycznego odcinka lędźwiowego i piersiowego był prawidłowy. Obraz histopatologiczny wycinka mięśniowego (m. czworogłowy uda) odpowiadał zanikowi neurogenemu.

Na podstawie obrazu klinicznego oraz wyników badań dodatkowych rozpoznano dosiebny rdzeniowy zanik mięśni typu 3a. W wywiadzie zwraca uwagę znacznego stopnia opóźnienie rozwoju ruchowego oraz współwystępowanie wad rozwojowych.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. Pomimo prawidłowego wyniku analizy ilościowej rozszerzono diagnostykę molekularną poszukując mutacji punktowych. Pełna analiza sekwencji kodujących 8 eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjent 7

ur. 1968 (rodowód 706)

Dziewczynka urodzona z ciąży siódmej prawidłowej. Poród odbył się siłami natury. Matka dobrze czuła ruchy płodu. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. Rodzice zdrowi, niespokrewnieni. Rozwój ruchowy dziecka był nieco opóźniony. Dziewczynka siadała samodzielnie w 8 miesiącu życia, chodziła w 20 miesiącu życia. Od początku chodziła źle, kaczkowato. Często się przewracała, nie mogła samodzielnie wstać. Przestała chodzić w 5 roku życia. Od 7 roku życia porusza się tylko na wózku. Badana w 22 roku życia. Wówczas nie siadała samodzielnie, nie chodziła, głowa często opadała, ręce pozostawały nadal dość sprawne. Ponadto zwracało uwagę duże skrzywienie kręgosłupa. Rozwój umysłowy był prawidłowy.

W badaniach dodatkowych nie stwierdzono odchyłeń w podstawowych badaniach biochemicznych. Poziom CK i aldolazy był prawidłowy. Zapis EMG wskazywał na uogólnione uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Obraz histopatologiczny wycinka mięśniowego (m.czworogłowy uda) odpowiadał zanikowi neurogennemu.

Na podstawie obrazu klinicznego oraz wyników badań dodatkowych rozpoznano dosiebny rdzeniowy zanik mięśni typu 3a.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. Pomimo prawidłowego wyniku analizy ilościowej rozszerzono diagnostykę molekularną, poszukując mutacji punktowych. Pełna analiza sekwencji kodujących 8 eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjent 8

ur. 1964 (rodowód 692)

Pacjentka urodzona z ciąży drugiej prawidłowej, z masą ciała 3500 g. Rozwój ruchowy w pierwszym roku życia przebiegał bez odchyłeń. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. W 20 roku życia, po porodzie, wystąpiły pierwsze trudności z wchodzeniem po schodach. W późniejszym okresie objawy stopniowo nasilały się.

W badaniach dodatkowych nie stwierdzono odchyłeń w podstawowych badaniach biochemicznych (CK i aldolaza w normie). Zapis EMG wskazywał na uogólnione uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Nie wykonywano badania histopatologicznego wycinka mięśniowego.

Na podstawie obrazu klinicznego oraz badania elektrofizjologicznego rozpoznano SMA3b. W wywiadzie zwraca uwagę późny początek choroby.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. Pomimo prawidłowego wyniku analizy ilościowej rozszerzono diagnostykę molekularną, poszukując mutacji punktowych. Pełna analiza sekwencji kodujących 8 eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjent 9

ur. 1964 (rodowód 660)

Pacjent urodzony z ciąży czwartej. Brak danych o rozwoju ruchowym w pierwszym roku życia. Około 6 roku życia wystąpiły kurcze łydek oraz postępujące osłabienie siły mięśniowej, początkowo obejmujące mięśnie obręczy biodrowej (trudności z wchodzeniem po schodach, wstawaniem, bieganiem), a następnie mięśnie obręczy barkowej. Wywiad rodzinny w kierunku chorób nerwowo-mięśniowych był negatywny. Rodzice pacjenta nie byli spokrewnieni. Chory hospitalizowany w 33 roku życia. W badaniu neurologicznym stwierdzono z odchylen pogłębienie kyfozy piersiowej i lordozy lędźwiowej, drżenie palców, osłabienie i zanik mięśni o rozkładzie dwuobrczowym (kończyny dolne bardziej zajęte niż kończyny górne), osłabienie odruchów głębokich w kończynach górnych, zniesione odruchy kolanowe i skokowe, przerost mięśni podudzi. Pacjent chodził z pomocą laski, nie stawał na piętach i palcach.

W badaniach dodatkowych zwracały uwagę podwyższone wartości CK i aldolazy (CK 336 IU, aldolaza 38,5 IU). Dwukrotnie przeprowadzane badanie elektrofizjologiczne (1998, 1999) wskazywało na znacznego stopnia uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Pacjent nie wyraził zgody na biopsję mięśniową.

Na podstawie obrazu klinicznego oraz badania elektrofizjologicznego rozpoznano dosiebny SMA3b.

Badanie genetyczne nie wykazało homozygotycznej delecji w genie *SMN1*. Pomimo prawidłowego wyniku analizy ilościowej rozszerzono diagnostykę molekularną, poszukując mutacji punktowych. Pełna analiza sekwencji kodujących 8 eksonów genu *SMN* nie wykazała jednak obecności mutacji punktowej.

Pacjent	Rod.	Płeć	Rok ur.	Typ SMA	EMG	Biopsja	Cechy nietypowe	Analiza ilościowa <i>SMN1</i>	Mutacje punktowe
1	546	K	1988	3a	neur	neur	-	½N	T274I
2	569	K	1985	3a	neur	neur	stacjonarny przebieg przy dość wczesnym początku	½N	-
3	644	K	1992	3a	neur	nie do oceny	-	½N	-
4	664	K	1998	1		neur	-	½N	-
5	664	M	2001	1		-	-	-	-
6	739	K	1994	3a	neur	neur	bardzo opóźniony rozwój ruchowy, wady rozwojowe (tarń dwudzielna, stopy końsko-szpotałe)	N	-
7	706	K	1968	3a	neur	neur	-	N	-
8	692	K	1964	3b	neur	-	późny początek, około 20 roku życia	N	-
9	660	M	1964	3b	neur.	-	podwyższone wartości CK	N	-

Tabela IX
Analiza przypadków SMA nie wykazujących obualelicznej delecji w genie *SMN1*

Legenda: M- płeć męska
 K- płeć żeńska
 neur- zapis/obraz neurogenny
 N-norma

4.6 Nosicielstwo

Opracowanie wiarygodnego testu na nosicielstwo zmutowanego genu *SMN1* utrudnia złożoność budowy regionu SMA. Nowe możliwości badania nosicielstwa pojawiły się w momencie opracowania techniki ilościowej – „real - time PCR”. W stosowanej metodzie celem badania jest ilościowa ocena produktu reakcji PCR osoby badanej i osoby zdrowej (nie nosiciela). Dwukrotne zmniejszenie ilości kopii genu *SMN1* osoby badanej w porównaniu z osobą zdrową jest równoznaczne ze stwierdzeniem układu heterozygotycznego z delecją na jednym z alleli, a więc ze stanem nosicielstwa.

Podstawowym elementem umożliwiającym prowadzenie dalszych badań było zaprojektowanie starterów (ryc.13), rozróżniających kopię telomerową od centromerowej genu *SMN*. Zaprojektowane startery charakteryzują się wysoką swoistością. W żadnym z kilku analizowanych przypadków z homozygotyczną delecją kopii telomerowej nie uzyskano produktu dla *SMN1*, z kolei u osoby zdrowej, ale wykazującej homozygotyczną delecję kopii centromerowej, nie uzyskano produktu dla *SMN2*.

Gen *SMN1*

TTTTAACAT CCATATAAAG CTATCTATAT ATAGCTATCT ATGTCATAT AGCTATTTT TTTAACTTCC
AAAAATTGTAGGTATATTTT GATAGATATA TATCGATAGA TACAGATATA TCGATAAAAA AAATTGAAGG

TTTTATTTTC CTTACAGGGT TTTAGACAAA ATCAAAAAGA AGGAAGGTGC TCACATTTCT
AAAATAAAAGGAATGACCCA AAGTCTTGTTTAGITTTTCT TCCTCCACG AGTGTAAGGA

Gen *SMN2*

TTTTAACAT CCATATAAAG CTATCTATAT ATAGCTATCT ATATCTATAT AGCTATTTT TTTAACTTCC
AAAAATTGTAGGTATATTTT GATAGATATA TATCGATAGA TACAGATATA TCGATAAAAA AAATTGAAGG

TTTTATTTTC CTTACAGGGT TTTAGACAAA ATCAAAAAGA AGGAAGGTGC TCACATTTCT
AAAATAAAAGGAATGACCCA AAATCTTGTTTAGITTTTCT TCCTCCACG AGTGTAAGGA

Ryc.13 Startery zaprojektowano na granicy intronu 6 i eksonu 7. Kreską / zaznaczono granicę między intronem a eksonem, kolorem czerwonym zaznaczono starter 5', niebieskim - 3', na zielono zaznaczono sekwencję sondy TaqMan

Jak się okazało, istotny wpływ na wydajność reakcji ma czystość i jakość stosowanego DNA. By zminimalizować ilość zanieczyszczeń użyto filtrów do oczyszczania DNA. Zastosowano także niskie stężenia DNA (10-25 ng na reakcję). Dzięki tym działaniom uzyskana wydajność reakcji stała się proporcjonalna do ilości użytego DNA (zastosowanie kolejnych rozcieńczeń daje wprost proporcjonalne obniżenie ilości uzyskiwanego produktu) (ryc.14). Bardzo wysoka jest również powtarzalność wyniku - badanie każdego analizowanego DNA przeprowadzano w trzykrotnych powtórzeniach.

Niewielka, ale zauważalna zmienność wydajności reakcji w zależności od stosowanego DNA wymogła zastosowanie systemu zewnętrznej kontroli. Jako gen wzorcowy zastosowano gen *RN-azy*, występujący w pojedynczej kopii. W analizie wyników nie porównuje się bezpośrednio C_T genu badanego i wzorcowego *SMN1*, ale różnicę C_T dla *SMN1* i *RN-azy* badanego DNA do różnicy C_T dla *SMN1* i *RN-azy* wzorcowego DNA.

Wynik graficzny badania ilościowego osoby zdrowej, nie będącej nosicielem i nosiciela delecji w genie *SMN1* przedstawiają ryciny 15 i 16. Różnica jednego cyklu między ΔC_T nosiciela i osoby zdrowej oznacza dwukrotnie mniejszą ilość produktu reakcji. Taki wynik jest równoważny z wyjściową dwukrotnie mniejszą liczbą kopii genu *SMN1* u badanego nosiciela w porównaniu z osobą zdrową, nie będącą nosicielem.

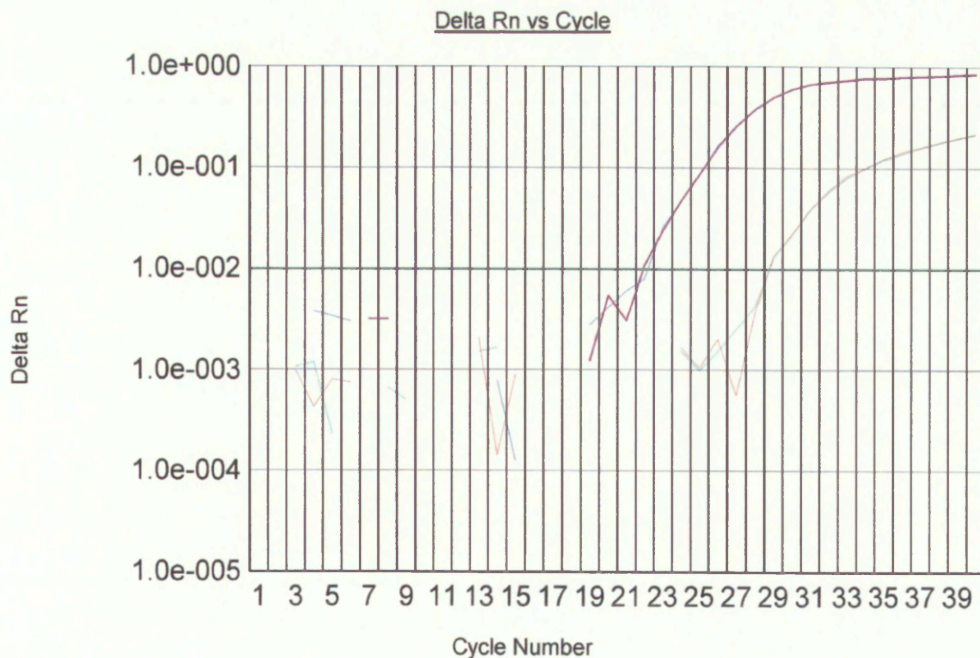
Do chwili obecnej badaniami metodą „real-time PCR” objęto niewielką grupę pilotażową, obejmującą w sumie 14 osób, z czego u 9 chorych podejrzewano mutacje punktowe. W badanej grupie dwukrotne obniżenie liczby kopii genu *SMN1* stwierdzono w 7 przypadkach - u 5 chorych z objawami SMA i 2 rodziców chorego dziecka (potencjalnych nosicieli zmutowanego genu). Wyniki badań pacjentów, u których podejrzewano wystąpienie mutacji punktowych przedstawiono w podrozdziale 4.6.

Uzyskane wyniki są wynikami wstępnymi i wymagają prowadzenia dalszych prac, przede wszystkim nad standaryzacją.



Selected Detector: RNase P; Start: 6; End: 18; Threshold: 0.05411700
Well(s): C1-C12
Document: 04.12.2002 CMDIK

Ryc. 14 Stosując DNA w ilości: 12,5 ng, 25 ng i 50 ng uzyskano trzy krzywe. Różnica jednego cyklu dla kolejnych stężeń świadczy o uzyskaniu ilości produktu wprost proporcjonalnej do wyjściowego stężenia DNA



Selected Detector: All
Well(s): B3-B4,D3-D4
Document: 05.12.2002 CMDIK

Ryc. 15 Wynik badania ilościowego genu *SMNI* i *RN-azy* osoby zdrowej - nie nosiciela. Różnica C_T 6,9.



Selected Detector: All
Well(s): B7-B8,D7-D8
Document: 05.12.2002 CMDiK

Ryc. 16 Wynik badania ilościowego genu *SMN1* i *RN-azy* nosiciela delecji w jednym allelu genu *SMN1*. Różnica C^i 8,1

5. DYSKUSJA

Obserwowany w ostatnich latach rozwój technik biologii molekularnej przyczynił się w bardzo istotny sposób do poszerzenia wiedzy o rdzeniowym zaniku mięśni. Jeszcze 13 lat temu nie było wiadomo, czy SMA to jedna choroba heterogenna klinicznie, czy też kilka chorób o podobnej symptomatologii. Zaledwie przed 7 laty zidentyfikowano gen *SMN1*, którego mutacje są odpowiedzialne za wystąpienie objawów rdzeniowego zaniku mięśni. Od tego czasu nasza wiedza wzrasta w błyskawicznym tempie. Poznaliśmy czynniki modyfikujące fenotyp. Coraz lepiej znane są składowe i funkcje kompleksu białka SMN. Stworzono model zwierzęcy choroby. A wreszcie - podejmowane są próby terapeutyczne, mające na celu nasilenie ekspresji genu *SMN2* i tym samym zwiększenie poziomu deficytowego białka SMN w tkankach.

Jakie implikacje praktyczne daje zdobyta wiedza? Jak dotąd – umożliwia przede wszystkim udoskonalanie diagnostyki. Wysoka homogenność podłoża molekularnego rdzeniowego zaniku mięśni pozwoliła na opracowanie szybkiego i wiarygodnego testu genetycznego. Test ten stał się podstawą weryfikacji podejrzenia rdzeniowego zaniku mięśni, a jego negatywny wynik w praktyce zaczął być utożsamiany z wyłączeniem choroby.

Warto zadać sobie zatem pytanie o częstość występowania obuallelicznej delecji w polskiej populacji chorych na SMA. Czy jest ona równie wysoka jak w innych populacjach? Jakie ryzyko błędu ponosimy wykluczając SMA po uzyskaniu negatywnego wyniku badania genetycznego?

Na podstawie przeprowadzonej analizy oszacowano częstość występowania homozygotycznej delecji eksonu 7 genu *SMN1* w polskiej populacji chorych na SMA na około 96,6 %. Częstość występowania tej mutacji w populacjach europejskich jest bardzo zróżnicowana - od 77% w Chorwacji (104) do 98,6% we Francji (73) (dane dla poszczególnych populacji podano w tabeli IX). Trudno ocenić, na ile zróżnicowanie to wynika z rzeczywistych różnic populacyjnych, a na ile z doboru badanej grupy. Na przykład w populacji tureckiej częstość występowania homozygotycznej delecji oszacowano w jednym ośrodku na 85%, w drugim na 93% (41, 101). W najbliższej spokrewnionych z populacją polską - słowackiej i rosyjskiej, odsetek delecji oszacowano odpowiednio na 88,4% i 96%

(46, 122). Z kolei w populacji chińskiej mutacja ta występowała z częstością 86,7% (117). Inne wyniki uzyskano badając chorych na SMA rasy czarnej w RPA (107). Szacunkowy odsetek delecji wyniósł tam 61%. Autorzy zwracali jednak uwagę na występujące u wielu chorych osłabienie mięśni twarzy, nietypowe dla omawianej postaci choroby. Być może otrzymany wynik związany był zatem z niewłaściwym doborem grupy. Analizie poddano prawdopodobnie również chorych z odmienną fenotypowo i genotypowo formą SMA.

Tabela IX.

Częstość występowania delecji eksonu 7 genu *SMN1* u chorych na SMA w różnych krajach

Kraj	Częstość występowania delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i> w populacji SMA	Piśmiennictwo
Francja	98,6%	73
Wielka Brytania	97,8%	80
Polska	96,6%	obecna praca
Rosja	96%	46
Holandia	93%	110
Turcja	93%, 85%	41,101
Hiszpania	91%	111
Niemcy	90%	50
Słowacja	88,4%	122
Chiny	86,7%	117
Bułgaria	85%	68
Chorwacja	77%	77
RPA	61%	107

Biorąc pod uwagę bardzo wysoki procent SMA3 w polskiej grupie, oszacowany odsetek delecji może być nawet zaniżony. Wirth w 2000 roku podsumowała dane z kilku krajów europejskich, obejmujące w sumie grupę 1122 pacjentów (116). Średni odsetek delecji dla wszystkich trzech postaci wynosił 91%, podczas gdy w postaci łagodnej mutacja ta stanowiła tylko 74% (93). Wydaje się,

że SMA3 związana jest z homozygotycznymi delecjami eksonu 7 genu *SMN1* rzadziej niż SMA1, zatem wysoki udział postaci łagodnej w badanej grupie mógł wpłynąć na obniżenie uzyskanej częstości delecji.

Czy uzyskany w Polsce wynik 96,6% może wpłynąć na schemat diagnostyki rdzeniowego zaniku mięśni?

Wobec braku polskich badań epidemiologicznych przyjmijmy, że częstość występowania SMA w polskiej populacji jest podobna do częstości opisywanej w literaturze anglosaskiej i wynosi około 1 na 7-10 tysięcy urodzeń. Zakładając, że w Polsce rodzi się rocznie około 400 tysięcy dzieci, można założyć, że 40-55 z nich zachoruje na SMA. U jednego lub dwojga z tej grupy wynik badania genetycznego okaże się nieinformatywny. Analiza molekularna nie wykaże homozygotycznej delecji eksonu 7 genu *SMN1*. Czy zatem wykluczając SMA na podstawie negatywnego wyniku badania genetycznego ponosimy wysokie ryzyko błędu? Rozpatrując zagadnienie w aspekcie populacyjnym należy stwierdzić, że raczej nie. Jednak, jak wykazuje nasze doświadczenie kliniczne, np. rodzeństwa z SMA1 lub dziewczynki z potwierdzoną mutacją punktową, warto pamiętać, że negatywny wynik testu molekularnego w kierunku SMA nie wyłącza rozpoznania.

Wykonanie przesiewowego testu genetycznego na obecność delecji w genie *SMN1*, pozwala na rozpoznanie choroby w 96,6% przypadków. Wysoki odsetek delecji w polskiej populacji mógłby uzasadniać wprowadzenie schematu diagnostycznego, w którym w wybranych przypadkach klinicznych zespołu dziecka wiotkiego, diagnostykę rozpoczynano by od wykonania przesiewowego testu genetycznego na obecność delecji w regionie SMA. Propozycja ta, zakładająca odwrócenie obowiązującego schematu, może wydawać się kontrowersyjna, przemawiają za nią jednak silne argumenty natury praktycznej. Szacuje się, że w około 75% przypadków przyczyną zespołu wiotkiego dziecka są encefalopatie (lub wady wrodzone OUN), zespoły dysgenetyczne oraz SMA. Klasyczna diagnostyka chorób nerwowo-mięśniowych, oparta na metodach inwazyjnych (EMG, biopsja mięśniowa), wykonywana jest głównie w ośrodkach wysokospecjalistycznych, co w naturalny sposób ogranicza jej dostępność. Zastosowanie badań molekularnych mogłoby w sposób znaczący uprościć proces diagnostyczny i w wielu przypadkach umożliwić postawienie rozpoznania.

Kwalifikacja do wykonania przesiewowego testu na obecność delecji eksonu 7 genu *SMN1* powinna opierać się na całokształcie wywiadu i obrazu klinicznego. Wśród zasadniczych elementów przemawiających za możliwością SMA u dziecka wiotkiego, a co za tym idzie wskazujących na potrzebę przeprowadzenia diagnostyki molekularnej w kierunku SMA, wymienić należy: symetryczne osłabienie siły mięśniowej i brak odruchów głębokich u dziecka nie wykazującego cech dysmorfii oraz dodatni wywiad rodzinny. Równoległe z badaniem genetycznym należy przeprowadzić diagnostykę OUN oraz badanie kariotypu.

O ile wykonanie testu genetycznego w początkowym etapie diagnostyki zespołu dziecka wiotkiego może być uzasadnione, to w przypadku zespołu dwuobrczowego badaniem wstępnym powinno być oznaczenie stężenia kinazy kreatynowej (z reguły prawidłowego w SMA, znacznie podwyższonego w dystrofiach mięśniowych) oraz wykonanie badania elektrofizjologicznego. Odróżnienie procesu miogenego od neurogenego w EMG jednoznacznie ukierunkowuje proces diagnostyczny. Sens rozpoczynania diagnostyki od testu genetycznego dodatkowo podważa wyższe ryzyko uzyskania wyniku nieinformatywnego. W formie łagodnej homozygotyczna delecja eksonu 7 genu *SMN1* stanowi niższy odsetek mutacji niż w SMA1.

Jak wspomniano w podrozdziale 4.1, grupę kontrolną stanowiło 143 członków rodzin chorych (rodzice, rodzeństwo). Homozygotyczną delecję eksonu 7 genu *SMN1* stwierdzono jedynie u kilkumiesięcznej, bezobjawowej w chwili badania siostry dziecka z SMA3. Wydaje się, że brak symptomów choroby u dziewczynki związany jest raczej z wczesnym wiekiem badania. Z doświadczenia wynika, że dzieci z formą łagodną choroby często nie wykazują żadnych odchyłeń w badaniu neurologicznym w pierwszym roku życia. W świetle opisanych w literaturze przypadków zdrowego rodzeństwa z delecją uzyskane wyniki mogą stanowić przedmiot dyskusji. Biorąc pod uwagę tak szerokie spektrum wieku zachorowania oraz występowanie zjawiska zmienności wewnątrzrodzinnej ryzyko zachorowania osoby z delecją w genie *SMN1* jest bardzo wysokie i wykluczenie choroby wymagałoby wieloletniej obserwacji. Z drugiej strony, analizując złożoność budowy regionu SMA, nie można wykluczyć sytuacji, w której kilkakrotnie zwiększona liczba kopii genu *SMN2* niweluje obecność delecji *SMN1*.

W pracy przedstawiono propozycję schematu diagnostyki molekularnej w kierunku SMA. Wysoki odsetek homozygotycznej delekcji eksonu 7 genu *SMN1* w polskiej populacji dowodzi, że stosowany test dobrze spełnia funkcję testu przesiewowego, weryfikując ponad 96% przypadków SMA. Gdyby diagnostykę molekularną rozszerzyć o badanie ilościowe kopii genu *SMN1*, czułość weryfikacji molekularnej wzrosłaby o kolejne 2-3%. Niestety ze względu na wysoki koszt analizy w chwili obecnej nierealne wydaje się być wprowadzenie badania ilościowego w diagnostyce wszystkich przypadków skierowanych na test genetyczny w kierunku SMA. Wydaje się jednak, że rozszerzenie diagnostyki molekularnej w wybranych przypadkach jest uzasadnione. Prawidłowy wynik analizy ilościowej nie wyklucza jednak choroby. Teoretycznie możliwe jest wystąpienie mutacji punktowych na obu allelach. W takim przypadku analiza ilościowa wykazałaby prawidłową liczbę kopii genu *SMN1*. Niezidentyfikowanie mutacji punktowej, przy zastosowaniu metody bezpośredniego sekwencjonowania, także nie wyłącza SMA. Za objawy mogą być odpowiedzialne mutacje leżące w sekwencjach promotorowych lub intronowych genu. Ponadto w stosowanej metodzie analizowane są obie kopie genu - telomerowa i centromerowa, co dodatkowo utrudnia interpretację.

Ciekawe rezultaty przyniosła analiza fenotypowa polskiej populacji chorych. Wysoki odsetek (43%) w badanej grupie stanowili chorzy z postacią łagodną. Rozważać można kilka interpretacji tego zjawiska. Wysoki odsetek SMA3 może być związany:

- Z rzeczywistą odmiennością polskiej populacji w porównaniu z innymi populacjami kaukaskimi. Tezę tę potwierdzałby wysoki odsetek izolowanego braku eksonu 7 genu *SMN1*, świadczący również o odrębności genotypowej
- Specyfiką ośrodka badawczego (Kliniki Neurologicznej i Zespołu Badawczego Chorób Nerwowo-Mięśniowych). Diagnostyka w trybie hospitalizacji obejmuje pacjentów powyżej 3-ego roku życia. Dzieci młodsze trafiają jedynie na konsultacje. Tym samym przypadki ostre są rzadziej diagnozowane.
- Z niskim odsetkiem pacjentów kierowanych na badanie molekularne w kierunku SMA z regionalnych oddziałów pediatrycznych i oddziałów

intensywnej opieki medycznej. Wydaje się, że część dzieci wiotkich umiera z powodu niewydolności oddechowej bez dalszej diagnostyki.

Dwa ostatnie punkty uważamy za rzeczywistą przyczynę obserwowanej struktury populacji SMA. Brak co prawda w literaturze badań epidemiologicznych, dotyczących częstości i rozkładu zachorowań wśród chorych ze zweryfikowanym molekularnie rozpoznaniem SMA. Można jednak przeanalizować strukturę grup objętych diagnostyką molekularną. I tak w populacji francuskiej postać ostra stanowiła 45%, łagodna tylko 15% badanych przypadków (73). W niemieckiej - częstość SMA1 szacowano na około 55%, SMA3 - na 20% (50,115, 116). W angielskiej grupie chorych SMA1 stanowiło 38%, SMA3-17% (97). Ale już w pracy prezentującej wyniki badań w populacji chińskiej częstość postaci ostrej oceniono na 18%, postaci łagodnej i dorosłej z potwierdzoną delecją aż na 41% (26). Powyższe dane mogą sugerować modyfikujący wpływ opieki zdrowotnej na strukturę grupy objętej badaniem. W Polsce brak jest jednoznacznych danych dotyczących zapadalności na SMA. W ciągu roku weryfikowanych jest pozytywnie około 30 chorych skierowanych z podejrzeniem rdzeniowego zaniku mięśni. Z pewnością część przypadków (dotyczy to prawdopodobnie kilkunastu osób) pozostaje nie rozpoznanych. W większości są to chorzy z ciężkim przebiegiem choroby, leczeni w regionalnych oddziałach szpitalnych. Może o tym świadczyć wysoki odsetek (64%) SMA1 w 90-osobowej grupie dzieci, z potwierdzonym molekularnie rozpoznaniem SMA, a kierowanych spoza naszego ośrodka.

Za wysoki odsetek SMA3 w badanym materiale odpowiadać może przede wszystkim specyfika naszego ośrodka oraz niedostateczna rozpoznawalność SMA1 w okresie niemowlęcym. Nie można jednak zupełnie odrzucić hipotezy o odmienności fenotypowej naszej populacji. Bunday sugerowała częstsze występowanie formy łagodnej w krajach Europy Środkowo-Wschodniej (14). Badanie Spieglera na populacji Polski Centralnej tezy tej jednak nie potwierdziły (106).

Bardziej miarodajne wyniki może dać analiza przeprowadzona za kilka lat, po większym rozpowszechnieniu testu genetycznego.

Istotnym elementem dyskusji nad fenotypem SMA w polskiej populacji jest występowanie zjawiska zmienności wewnątrzrodzinnej. W analizowanym materiale współwystępowanie różnych form SMA u jednego rodzeństwa dotyczyło 30%

badanych molekularnie rodzeństw. Odsetek ten jest porównywalny ze stwierdzanym w poprzednich badaniach (59). Zjawisko zmienności wewnątrzrodzinnej dotyczy jednak przede wszystkim form przewlekłych. Niewystarczająca ilość informacji o podłożu molekularnym zmienności wewnątrzrodzinnej nie pozwala na szerszą dyskusję tego tematu. W niektórych rodzeństwach weryfikacji genetycznej dokonano tylko u jednego z dzieci. Uniemożliwia to ocenę potencjalnych czynników modyfikujących przebieg kliniczny choroby, takich jak rozległość delecji, liczba kopii centromerowych, czy wreszcie poziom białka SMN. Badania te należałoby przeprowadzić przede wszystkim w rodzinach, w których współlistnieją odległe fenotypowo formy. W przypadku badanej grupy chodzi o rodzeństwa ze współlistnieniem typu 2 i 3b. O ile w pozostałych przypadkach istotne znaczenie mógł mieć wpływ czynników zewnętrznych (jak chociażby szybki przyrost masy ciała w okresie wzrostu lub unieruchomienie z powodu innej choroby), o tyle w przypadku fenotypów 2 i 3b nie powinien on odgrywać decydującej roli. Problem zmienności wewnątrzrodzinnej we współczesnej literaturze w zasadzie jest pomijany. Nie znalazłam prac, w których na poziomie molekularnym usiłowanoby wyjaśnić tę różnorodność.

Biorąc pod uwagę złożoność budowy regionu SMA, za wystąpienie zmienności wewnątrzrodzinnej odpowiadać może szereg czynników, takich jak chociażby rearanżacje zachodzące w okresie gametogenezy czy mozaikowość. Wyjaśnienie tego fascynującego zagadnienia wymaga z pewnością dalszych, szeroko zakrojonych badań.

W badanym materiale obserwowano zmniejszony procent zachorowań płci żeńskiej na wszystkie typy SMA, najbardziej widoczny w grupie 3b. Zjawisko to, niezwykle ciekawe biorąc pod uwagę autosomalny recesywny sposób dziedziczenia, obserwowano od wielu lat. Już w pracach Kugelberga i Welander, opisujących postać łagodną, choroba dotyczyła kobiet dwukrotnie rzadziej (71). Podobne zależności obserwowano również w polskiej populacji chorych na SMA3b (56, 58). Zjawisko to wiązano z ochronnym wpływem poziomu estrogenów i FSH. Znaczący spadek zachorowań na SMA wśród dziewcząt powyżej 8 roku życia i zupełny brak nowych zachorowań po ukończeniu 13 roku życia wydawał się korelować ze wzrostem stężenia żeńskich hormonów płciowych w okresie dojrzewania.

Jak dotychczas brak w piśmiennictwie publikacji dotyczących molekularnego podłoża obserwowanych zależności. Przeprowadzona przez nas analiza pozawala jedynie na ocenę wielkości delecji u chorych z SMA3b, w zależności od płci. W grupie kobiet z SMA3b obserwowano wyższy odsetek (66%) izolowanej utraty eksonu 7 w porównaniu z grupą mężczyzn (40%). Izolowana utrata eksonu 7 („łagodniejszy genotyp”) częściej wiązała się z łagodniejszym fenotypem. Ze względu na stosunkowo niską liczebność badanej grupy trudno jednoznacznie ocenić, czy obserwowana przez nas różnica może mieć związek z niższą zachorowalnością kobiet na SMA3b. Z pewnością istotne znaczenie dla wyjaśnienia zależności pomiędzy podłożem molekularnym a zróżnicowaniem zachorowalności u obu płci miałyby badanie poziomu ekspresji genu *SMN*, jak również lepsze poznanie funkcji białka SMN.

Kolejnym istotnym elementem charakterystyki fenotypowej badanej płci, obok zmienności wewnątrzrodzinnej i zróżnicowania płci, jest występowanie objawów atypowych. Objawy te, stanowiące wg Międzynarodowego Konsorcjum SMA kryteria wykluczenia (upośledzenie umysłowe, artrogrypoza, cechy uszkodzenia OUN), stwierdzono u 6 chorych, z potwierdzonym molekularnie rozpoznaniem SMA. W każdym z tych przypadków mogą się rodzić wątpliwości co do etiologii tych objawów (współistnienie innych schorzeń czy nietypowy przebieg choroby podstawowej).

Opisani w podrozdziale 4.3 chorzy z niepełnosprawnością intelektualną prezentowali klinicznie obraz dosiebnego rdzeniowego zaniku mięśni typu 2. Wydaje się, że oligofrenia jest u nich objawem współwystępującym. Częstość występowania upośledzenia umysłowego w populacji szacuje się na 1%. Wystąpienie dwóch przypadków w populacji 357 chorych mieści się w granicach ryzyka populacyjnego.

Dane kliniczne na temat pacjentów z artrogrypozą (podrozdział 4.3) pochodziły z ankiet, stąd trudno ocenić faktyczny stan kliniczny. We wszystkich trzech przypadkach łączyły się jednak z formą ostrą, wrodzoną. W takich przypadkach można traktować artrogrypozę jako powikłanie ucisku powłok matczynych na wiotki, słaby płód. U jednego z pacjentów stwierdzono ponadto wadę serca. Badanie molekularne wykazało obecność dużej delecji, obejmującej także gen *NAIP*.

W literaturze opisanych jest kilka przypadków artrogrypozy z obualeliczną delecją w regionie SMA (9, 17). We wszystkich tych przypadkach artrogrypoza była jedynie objawem towarzyszącym ciężkiej wrodzonej formie SMA, określanej przez Dubowitza mianem SMA0 (38). Dzieci te od urodzenia wykazywały cechy niewydolności oddechowej, wiotkość i masywny niedowład czterokończynowy, u jednego dziecka współwystępowała wada serca. W kilku przypadkach matki odczuwały wyraźne osłabienie ruchów płodu. U wszystkich dzieci obserwowano typowy elektromiograficzny i/lub histopatologiczny obraz SMA. Nie można wykluczyć, że fenotypowym efektem skrajnego obniżenia poziomu białka SMN jest postać SMA0, w której artrogrypoza i wada serca stanowią część obrazu klinicznego. W świetle powyższych artrogrypozę występującą u naszych pacjentów należałoby uznać za objaw choroby podstawowej.

W ostatnim z prezentowanych atypowych przypadków objawy uszkodzenia górnego motoneuronu wystąpiły na wiele lat przed symptomami łagodnej postaci SMA. Tak długi okres dzielący początek objawów uszkodzenia górnego i dolnego motoneuronu przemawia raczej za współwystępowaniem dwóch odrębnych jednostek chorobowych, aniżeli za atypowym przebiegiem rdzeniowego zaniku mięśni. Analizę 14, potwierdzonych w badaniu molekularnym, przypadków atypowych (w tym 7 ze współistniejącymi objawami uszkodzenia OUN) przedstawiła Rudnik-Schöneborn (99). Siedmiu pacjentów z tej grupy prezentowało objawy uszkodzenia OUN. Autorka wiąże występujące u nich symptomy przede wszystkim z niedotlenieniem okołoporodowym.

Wydaje się, że zarówno niepełnosprawność intelektualną, jak i objawy uszkodzenia OUN, występujące u naszych pacjentów, należy traktować nie jako przejaw choroby podstawowej, lecz schorzenia współistniejącego. Z kolei artrogrypozę, o ile występuje u dzieci z formą wrodzoną, można traktować jako następstwo wczesnego rozpoczęcia się procesu chorobowego, już w okresie płodowym. Na obecnym etapie wiedzy o roli białka SMN nie jesteśmy jeszcze w stanie określić, czy jego skrajny niedobór wywołuje zaburzenia czynności innych, oprócz rdzenia, narządów. Dokładne poznanie roli białka SMN z pewnością ułatwi w przyszłości klasyfikację nietypowych objawów.

Interesującym aspektem charakterystyki genetycznej badanej grupy pacjentów jest rozkład wielkości delecji w regionie SMA, odbiegający od

przeciętnego dla populacji kaukaskiej. W analizowanym materiale rzadziej obserwowano duże delecje obejmujące gen *NAIP*. Z drugiej strony wyższy odsetek stanowiła izolowana utrata eksonu 7. Do takich rezultatów przyczyniła się na pewno struktura badanej grupy, z wysokim odsetkiem SMA3 i niskim SMA1. Myślę jednak, że nie można wykluczyć odrębności genetycznej polskiej populacji. Przeciętny odsetek izolowanej utraty ekonu 7 dla populacji kaukaskiej wynosi około 5% (46, 75, 108). Występujący u nas bardzo wysoki odsetek tej mutacji (21%) zdecydowanie wyróżnia polską populację chorych na SMA. Analiza haplotypu polskich rodzin z SMA przeprowadzona w 1995 roku wykazała identyczny haplotyp sprzężony z chorobą w 25% badanych chromosomów (13). Wynik ten sugeruje występowanie efektu założyciela. Efekt ten mógłby również tłumaczyć dane uzyskane w naszej analizie.

Odrębności genetyczne, dotyczące wielkości delecji w regionie SMA, obserwowane są również w wielu innych populacjach. W populacji arabskiej, w której zdecydowanie dominuje postać ostra SMA, duże delecje z zajęciem genu *NAIP* stanowią 75-100% mutacji u chorych na SMA1 (1, 100). W Turcji delecje te zidentyfikowano u 75% chorych na SMA1 i 33% na SMA2 (101). W populacji chińskiej izolowana utrata eksonu 7 stanowiła 7,9%, a duże delecje zidentyfikowano w zaledwie kilku przypadkach (26).

Zależność nasilenia objawów klinicznych od wielkości delecji była wielokrotnie analizowana od czasu identyfikacji genów w regionie SMA. Nigdy nie znaleziono bezpośredniej korelacji między typem choroby a wielkością delecji. Okazało się zresztą, że izolowana utrata eksonu 7 często odpowiada nie rzeczywistej delecji, lecz konwersji genu. Istotny wpływ na przebieg kliniczny choroby ma również liczba kopii centromerowych. W uzyskanych przez nas wynikach istnieje jednak wyraźna tendencja współistnienia dużych delecji z postacią ostrą (85% dużych delecji występowało u chorych z SMA1), a małych z łagodną (50% utraty eksonu 7 wystąpiło w formie 3b).

Jednym z celów pracy była identyfikacja małych mutacji wewnątrzgenowych genu *SMN* oraz ich wpływ na fenotyp choroby. Analizowano dziewięcioosobową grupę pacjentów nie wykazujących homozygotycznej delecji w genie *SMN1*, a spełniających kryteria diagnostyczne SMA. We wszystkich przypadkach

na podstawie obrazu klinicznego oraz badań dodatkowych (EMG i/lub biopsja mięśniowa) rozpoznano dosiebny rdzeniowy zanik mięśni.

W przedstawionej grupie, zgodnie z wcześniejszymi założeniami, rozszerzono diagnostykę molekularną celem poszukiwania mutacji punktowych (czy innych małych mutacji wewnątrzgenowych). Spodziewając się, że mutacje punktowe będą występowały w układzie heterozygotycznym z delecją na drugim allelu, wprowadzono metodę ilościowej oceny kopii genu *SMN1*. Dzięki temu stwierdzono u 5 pacjentów (w tym jedno rodzeństwo) dwukrotnie zmniejszoną liczbę kopii genu. Kolejnym krokiem było zastosowanie analizy sekwencyjnej eksonów kodujących genu *SMN*. Sekwencjonowaniu poddano także DNA chorych z prawidłową liczbą kopii genu. Istniało bowiem minimalne ryzyko, że mutacje punktowe występują na obu allelach lub w układzie heterozygotycznym mutacji punktowej na jednym allelu z dwoma kopiami genu *SMN1* na drugim .

Ostatecznie zidentyfikowano jedną mutację punktową zmiany sensu T274I. Mutacja ta została po raz pierwszy opisana w 1997 roku (51) . Do chwili obecnej opisano ją u 5 chorych (51,88,115). We wszystkich przypadkach dotyczyła pacjentów z fenotypem pośrednim lub łagodnym choroby (SMA 2 lub 3).

Mutacja T274I jest zlokalizowana w regionie konserwowanym ewolucyjnie (między 258 a 277 podstawnikiem), który tworzy ważną funkcjonalnie domenę białka *SMN* odpowiedzialną za jego oligomeryzację i wiązanie z substratami kompleksu *SMN*. Zamiana hydrofilowej treoniny na hydrofobową izoleucynę w takim regionie zaburza strukturę i funkcjonowanie białka. Większość z 27 (22, 51, 73, 88, 115,116) opisanych do tej pory mutacji punktowych i małych delecji dotyczy w/w regionu. Stwierdzenie mutacji punktowej T274I, występującej w układzie heterozygotycznym z delecją na drugim allelu, nie pozwala na jednoznaczna ocenę jej wpływu na fenotyp pacjentki. Istotnym elementem modyfikującym początek i nasilenie objawów jest liczba kopii *SMN2*. W pracy opisującej trzy przypadki z mutacjami T274I jeden z pacjentów, prezentujący formę pośrednią, miał jedną kopię genu *SMN2*, dwóch pozostałych z łagodnym fenotypem SMA 3 – dwie kopie genu *SMN2*. Prawdopodobne jest, że również u omawianej dziewczynki, poza mutacją punktową T274I w jednym allelu i delecją genu *SMN1* w drugim, występuje jedna lub dwie kopie *SMN2*.

Osobnego komentarza wymagają wyniki negatywne. U części pacjentów, u których nie zidentyfikowano mutacji punktowych, możemy dostrzec pewną atypowość obrazu klinicznego lub niedociągnięcia diagnostyczne. Rozpoznanie SMA u rodzeństwa z SMA1 (pacjenci 4 i 5, podrozdział 4.6), mimo klasycznego obrazu klinicznego i histopatologicznego mięśnia, może być dyskusyjne ze względu na brak diagnostyki elektrofizjologicznej. W przypadku 6 przebieg choroby był modyfikowany współistnieniem wady rozwojowej. Trudno też ocenić, na ile istotny wpływ na przebieg rozwoju dziecka mogły mieć zaniedbania opiekuńcze. Chociaż w części przypadków rdzeniowego zaniku mięśni obserwuje się opóźnienie rozwoju ruchowego, to jednak osiągnięcie zdolności samodzielnego chodzenia w wieku czterech lat nie jest typowe dla klasycznego SMA. W przypadku 8 zwraca uwagę późny początek choroby, po 20 roku życia. Zmniejsza to prawdopodobieństwo związku choroby z mutacją w genie *SMN1*, jednak go nie wyklucza. Pierwsze symptomy choroby u najstarszego opisanego w literaturze pacjenta wystąpiły w 47 roku życia (30). W analizowanej grupie najstarsza pacjentka zachorowała w wieku 34 lat. Częstość obualelicznej delecji w grupie chorych z późnym początkiem jest jednak dużo niższa w porównaniu z całą populacją chorych na SMA (10, 30, 122). W przypadku pacjenta 9 wątpliwości mogą budzić wysokie wartości CK (nie przekraczające jednak dziesięciokrotnego poziomu normy, co stanowi kryterium wykluczenia SMA). Z obserwacji wynika jednak, że podwyższony poziom CK bywa stwierdzany w grupie z postacią łagodną, pseudodystroficzną (59).

W przypadkach, w których stwierdzono obniżoną dawkę genu, rozważyć możemy kilka przyczyn nie wykrycia mutacji punktowej. Po pierwsze nasi pacjenci mogą cierpieć na inną chorobę nerwowo-mięśniową i dodatkowo być nosicielami delecji w genie *SMN1*. Po drugie, co wydaje się być bardziej prawdopodobne, brak identyfikacji mutacji punktowej mógł być spowodowany niedoskonałością stosowanej metody - bezpośredniego sekwencjonowania. Używając tej techniki w rzeczywistości sekwencjonujemy bowiem obie kopie genu- *SMN1* i *SMN2*. Nie ma technicznej możliwości ich odróżnienia. Uzyskany sygnał pochodzi zatem z dwóch genów. Klasyczna interpretacja takiego wyniku, przez porównanie sekwencji i wysokości pików, może okazać się zawodna. Uniemożliwia ona identyfikację chociażby delecji obejmującej jedynie ekson 5 i 6, ze względu na obecność identycznego sygnału z drugiej kopii genu. Źródłem kolejnych nieścisłości

jest także ograniczenie sekwencjonowania do sekwencji kodujących genu. Uniemożliwia to identyfikację mutacji w obrębie sekwencji intronowych, zaburzających składanie pre-mRNA. Na uniknięcie ograniczeń związanych z metodą bezpośredniego sekwencjonowania pozwala amplifikacja cDNA genu *SMN1* metodą RT-PCR. Metoda ta wymaga jednak żywych linii komórkowych badanego pacjenta.

Objawy kliniczne u chorych z prawidłowym wynikiem molekularnego badania ilościowego wynikają najprawdopodobniej z mutacji innych genów niż *SMN1*. Teoretycznie możliwe jest również występowanie dwóch kopii genu *SMN1* na jednym allelu i mutacji punktowej na drugim lub mutacji punktowych na obu allelach. Prawdopodobieństwo takiego zdarzenia jest jednak minimalne. W badaniach niemieckich osiemnastoosobowej grupy pacjentów, z prawidłową dawką genu *SMN1*, u żadnego z badanych nie wykazano mutacji punktowej (115). Wydaje się zatem, że patogenezę choroby u tych chorych (stanowiących w populacji polskiej około 1,5%) nie wiąże się z genem *SMN1*. Niewykluczone, że za powstanie fenotypu SMA odpowiedzialne są mutacje innych genów kompleksu białka SMN.

Brak metody badania nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* stanowi istotny problem, z którym styka się każdy genetyk kliniczny. W przypadku rodziców posiadających chore dziecko, ze zweryfikowanym molekularnie rozpoznaniem, porada genetyczna nie następuje trudności. W związku ze znikomym, dwuprocentowym odsetkiem nowych mutacji, rodzice są niemal pewnymi nosicielami. Ryzyko posiadania chorego dziecka wynosi 25%. Możliwe jest wykonanie badania prenatalnego. Problem komplikuje się, gdy po poradę genetyczną zwraca się rodzina chorego na SMA - rodzeństwo, rodzeństwo rodziców, czasem rodzic z nowym partnerem lub sam chory, planujący założenie rodziny. Ze względu na typ dziedziczenia i częstość nosicielstwa w populacji, ryzyko wystąpienia choroby u ich potomstwa jest stosunkowo niewielkie. Stwierdzenie to często nie likwiduje obaw zgłaszających się osób, poddanych dużej presji psychicznej. Niepokój bywa czasem tak silny, że zmusza do przeprowadzenia badań prenatalnych, wciąż obciążonych pewnym ryzykiem powikłań. Ograniczeniem stosowania tej metody są również względy ekonomiczne. Innym problemem, nierzadko spotykanym w praktyce klinicznej, jest udzielenie porady genetycznej rodzicom dziecka z podejrzeniem SMA, które zmarło bez diagnostyki

molekularnej i od którego nie zabezpieczono materiału do badania. Oferowanie diagnostyki prenatalnej w takim przypadku jest niezwykle dyskusyjne. Wykazanie nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* u obojga rodziców bardzo uprościłoby poradnictwo genetyczne.

W kontekście powyższych rozważań szczególnej wagi nabiera kwestia opracowania wiarygodnej i powtarzalnej metody badania nosicielstwa, którą można by wykorzystać w rutynowej diagnostyce. W pracy użyto nowej metody ilościowej oceny dawki genu „real-time PCR” z użyciem sondy TaqMan. Metoda badania nosicielstwa SMA z wykorzystaniem „real-time PCR”, przeprowadzona jednak na innym aparacie, z zastosowaniem innych sond i starterów, została opisana po raz pierwszy w ubiegłym roku (42). Podstawową zaletą metody jest szybkość przeprowadzenia badania. Poza czaso- i pracochłonną wstępną fazą przygotowania DNA (izolacja, oczyszczenie, pomiar stężenia, rozcieńczenie) wynik możemy interpretować tuż po zakończonej amplifikacji, bez konieczności dodatkowych procedur np. rozdziału elektroforetycznego, barwienia. Prostota interpretacji pozwala na zminimalizowanie ryzyka przypadkowego błędu. Dodatkowo wiarygodność wyniku można zwiększyć powtarzając 2-3 krotnie badanie każdego DNA.

Istotną wadą metody jest możliwość uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Według badań niemieckich na około 2,4% chromosomów występują dwie kopie genu *SMN1* (42), co obniża czułość metody do około 95,2%. Na obniżenie czułości o kolejne 1,5% ma wpływ możliwość nosicielstwa mutacji punktowych, nie wykrywanych za pomocą omawianej metody. W chwili obecnej nie dysponujemy metodą całkowicie pewnej oceny stanu nosicielstwa.

Poza badaniem nosicielstwa „real-time PCR” można wykorzystać do oceny heterozygotyczności w przypadkach podejrzewanych o mutacje punktowe. W chwili obecnej rutynowe badanie heterozygotyczności nie jest możliwe ze względu na wysoki koszt. W przyszłości można by jednak przeprowadzać badanie ilościowe w przypadkach nie wykazujących homozygotycznej delecji, minimalizując możliwość przeoczenia SMA na poziomie molekularnym.

Metoda „real-time PCR” umożliwia również ocenę liczby kopii centromerowych genu *SMN*, co może stanowić potencjalny wykładnik rokowniczy (im więcej *SMN2* tym łagodniejszy przebieg choroby). Powyższe zastosowanie

(poza wartością poznawczą) wydaje się mieć w chwili obecnej marginalne znaczenie praktyczne. Przebieg choroby najczęściej koreluje z wiekiem wystąpienia objawów. Stąd wiek wystąpienia pierwszych symptomów pozwala, przynajmniej w przybliżeniu, ocenić rokowanie. Nie jest jednak wykluczone, że wraz z rozwojem technik molekularnych, zakres badań przesiewowych wieku noworodkowego znacznie się rozszerzy. Wprowadzenie przesiewowego testu na obecność delecji w genie *SMN1* wiązałoby się z potrzebą opracowania badania oceniającego rokowanie. Badaniem tym mogłaby być ilościowa ocena liczby kopii genu *SMN2*, co uzasadnia dalsze prace nad udoskonalaniem tej metody.

Dynamiczny rozwój biologii molekularnej w ostatnim dziesięcioleciu umożliwił dokonanie prawdziwego przełomu w dziedzinie badań nad SMA. Każdy kolejny rok przynosi zarówno nowe odkrycia, jak też i nowe wyzwania. Mam nadzieję, że niniejsza praca stanowi pewnego rodzaju rekapitulację wiedzy z ostatnich kilku lat.

Jako lekarz chciałam, by prowadzone przeze mnie badania miały pewien wymiar praktyczny, czego wyrazem jest próba modyfikacji schematu diagnostyki molekularnej SMA, poszukiwanie mutacji punktowych czy badanie nosicielstwa. Z drugiej strony analiza materiału zaowocowała wynikami o znaczeniu poznawczym (odrębność genotypowa, mutacje punktowe), a przed wszystkim przyniosła szereg pomysłów kontynuacji badań dotyczących zmienności wewnątrzrodzinnej, przewagi liczebnej płci męskiej, poszukiwania mutacji punktowych z wykorzystaniem RT-PCR.

Utrzymanie obecnego tempa rozwoju wiedzy na temat rdzeniowego zaniku mięśni pozwala żywić nadzieję nie tylko na dalszy rozwój diagnostyki, lecz również na dokonanie się przełomu terapeutycznego.

6. PODSUMOWANIE

1. Częstość homozygotycznej delecji genu *SMN1* w polskiej populacji chorych na dosiebny rdzeniowy zanik mięśni wynosi 96,6%. Około 2% (5/269) stanowią przypadki, których patogeneza związana jest prawdopodobnie z mutacjami punktowymi. Objawy rdzeniowego zaniku mięśni u pozostałych 1,5% chorych nie są związane z mutacjami genu *SMN1*
2. Fenotyp (typ objawów- rozkład osłabienia i zaniku mięśni) polskiej populacji chorych z SMA jest jednorodny. Jedynie u ok. 1,5% pacjentów (6/357) obserwowano objawy atypowe, związane raczej ze współwystępowaniem innych jednostek chorobowych. Stopień nasilenia objawów jest bardzo różnorodny, skorelowany zwykle z wiekiem wystąpienia pierwszych symptomów (początek od okresu płodowego do 34 roku życia). Uwagę zwraca wysoki odsetek przypadków łagodnej postaci choroby (43%), związany raczej z doborem materiału. We wszystkich grupach obserwuje się przewagę liczebną płci męskiej. W postaci 3b mężczyźni chorują dwukrotnie rzadziej niż kobiety. W 30% chorych rodzeństw występuje zjawisko klinicznej zmienności wewnątrzrodzinnej.
3. Genotyp polskiej populacji chorych, uwzględniając dobór grupy, różni się od obserwowanych w innych populacjach kaukaskich. Wysoki odsetek (21%) stanowi izolowana utrata eksonu 7 genu *SMN1*. W korelacji z wynikami badań haplotypu polskiej populacji chorych na SMA wynik ten może sugerować występowanie efektu założyciela
4. Stwierdzono istotną statystycznie korelację między wielkością delecji a postacią SMA. Duże delecje występują głównie u chorych z postacią ostrą, małe towarzyszą najczęściej SMA3. Dla obiektywnej oceny korelacji fenotypowo-genotypowych konieczna jest ocena innych czynników modyfikujących fenotyp.
5. W 9 przypadkach, spełniających kryteria diagnostyczne SMA, a nie wykazujących homozygotycznej delecji, poszukiwano małych mutacji wewnątrzgenowych. Zidentyfikowano jedną mutację punktową zmiany sensu T274I. Czterech pacjentów, ze względu na obniżoną dawkę genu *SMN1* w badaniu ilościowym, nadal podejrzewanych jest o mutacje punktowe, nie zidentyfikowane prawdopodobnie ze względu na niedoskonałość stosowanych metod.

6. Opracowano wstępnie metodę badania nosicielstwa, opartą na nowej technice molekularnej - „real-time PCR”. Dalszych prac wymaga standaryzacja wyników. Ze względu na szybkość, dużą wydajność, łatwość interpretacji wydaje się ona najlepszą potencjalną metodą oceny stanu nosicielstwa, a także heterozygotyczności w przypadkach podejrzewanych o mutacje punktowe. Możliwość wystąpienia dwóch kopii *SMN1* na jednym allelu oraz niemożność wykrycia tą metodą nosicielstwa mutacji punktowych obniża czułość metody do około 93,7%. Przedstawiona metoda może okazać się również przydatna w ocenie rokowania, ze względu na możliwość oceny liczby kopii genu *SMN2*. Nadal trudną do pokonania barierę stanowi wysoki koszt badania.

7. PIŚMIENICTWO

1. Al-Rajeh S., Majumdar R., Awada A. i wsp.: Application of DNA –based tests for diagnosis of spinal muscular atrophy in Saudi Arabia. *East.Mediter.Health J.* 1999, 5: 1225
2. Baccon J., Pellizzoni L., Rappsilber J. i wsp.: Identification and characterisation of Gemin 7, a novel component of the survival motor neuron complex. *J.Biol.Chem.* 2002, 277: 31957
3. Battaglia G., Princivalle A., Forti F., Lizier C. i wsp.: Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum.Mol.Genet.* 1997, 6: 1961
4. Batten F.E.: Progressive spinal muscular atrophy of infants and young children. *Brain* 1911, 33: 433
5. Batten F.E., Holmes G.: Progressive spinal muscular atrophy of infants Werdnig-Hoffmann's type. *Brain* 1913, 35: 38
6. Becker P.E.: Atrophia musculorum spinalis pseudo-myopathica. Hereditäre neurogene proximale Amyotrophie von Kugelberg und Welander. *Z.Menschl.Vererb.Konstitution Lehre* 1964, 37: 193
7. Becker P.E.: Heredity of proximal neurogenic amyotrophy (atrophia musculorum pseudomyopathica Kuglberg-Welander). *Electroenceph.Clin.Neurophysiol.* 1964, 17: 87
8. Beevor C.E.: A case of congenital spinal muscular atrophy and a case of haemorrhage into a spinal cord at birth, giving similar symptoms. *Brain* 1902, 25: 85
9. Bingham P.M., Shen M., Rennert H. i wsp.: Arthrogyrosis due to infantile neuronal degeneration associated with deletion of the SMN^T gene. *Neurology* 1997, 49: 848
10. Brahe C., Servidei S., Zapatta S. i wsp.: Genetic homogeneity between childhood-onset and adult onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995, 346: 741

11. Brandt S.: Werdnig-Hoffmann Infantile Progressive Muscular Atrophy. Copenhagen 1950, Ejnar Munksgaard
12. Brzustowicz L.M., Lehner T., Castilla LH. i wsp.: Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q 11.2-13.3. *Nature* 1990, 344: 540
13. Brzustowicz L.M., Wang C.H., Matseoane P. i wsp.: Linkage disequilibrium and haplotype analysis among Polish families with spinal muscular atrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 1995, 56: 210
14. Bunday S., Brett E.M.: Genetics and neurology. Edinburgh 1985, Churchill Livingstone
15. Burghes A.H., Vaessin H., de la Chapelle A.: Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science* 2001, 293: 2213
16. Burghes A.H.: When is a deletion? When it is converted. *Am.J.Hum.Genet.* 1997, 61: 9
17. Bürglen L., Amiel J., Viollet L. i wsp.: SMN gene deletions in the arthrogryposis multiplex congenital spinal muscular atrophy association. *J.Clin.Invest.* 1996, 98: 1130
18. Bürglen L., Spiegel R., Ignatus J. i wsp.: SMN gene deletion in variant of infantile spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995, 346: 316
19. Bürglen L., Seroz T., Miniou P. i wsp.: The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFFIH, is involved in large scale deletion associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am.J.Hum.Genet* 1997, 60: 72
20. Burlet P., Bürglen L., Clermont O. i wsp.: Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J.Med.Genet.* 1996, 33: 281
21. Burlet P., Huber C., Bertrand S., Ludosky M. i wsp.: The distribution of SMN protein complex in human foetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1998, 7: 1927

22. Bussalga E., Clermont O., Tizzano E i wsp.: A frame-shift deletions in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients *Nature Genet.* 1995, 11: 335
23. Byers R., Banker B.: Infantile muscular atrophy. *Arch Neurol.* 1961, 5 : 140
24. Campbell L., Hunter K.M.,Mohaghegh P., Tinsley J.M. i wsp.: Direct interaction of SMN with dp 103, a putative RNA helicase: a role for SMN in transcription regulation? *Hum.Mol.Genet* 2000, 9: 1093
25. Campbell L., Potter A., Ignatius J. i wsp. : Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implication for disease process and clinical phenotype. *Am.J.Hum.Genet.*1997, 61: 40
26. Chang J., Jong. Y., Lin S. i wsp.: Molecular analysis of survival motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) genes of spinal muscular atrophy and their parents. *Hum.Genet.* 1997, 100: 577
27. Chang J., Hsieh-Li H., Jong Y. i wsp.: Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 2001, 10: 2841
28. Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A. i wsp.: Gemin 3: a novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J.Cell.Biol* 1999, 147: 1181
29. Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A.i wsp.: Gemin 4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J.Cell.Biol* 2000, 148: 1177
30. Clermont O., Burlet P., Lefebvre S. i wsp.: SMN gene deletion in adult onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995, 346: 1712
31. Cobben J.M., Steege G., Grootscholten P., Visser M. i wsp.: Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am.J.Hum.Genet.*1995, 57: 805
32. Coover D., Le Thanh T., McAndrew P. i wsp.: The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1997, 6: 1205

33. Diaz C.C., Frugier T., Tiziano F. i wsp.: Deletion of murine smn exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J.Cell.Biol* 2001, 152: 1107
34. Dietz H.: Polishing the cutting edge of gems. *Nature Genet.* 1998, 20: 321
35. Dubowitz V.: Infantile muscular atrophy. A seven-year study with particular reference to a slowly progressive form. *Rev.Neurol.* 1964, 110: 558
36. Dubowitz V.: Infantile muscular atrophy. A prospective study with particular reference to a slowly progressive variety. *Brain* 1964, 87: 707
37. Dubowitz V.: Disorders of lower motor neurone: the spinal muscular atrophies. *Muscle disorders of childhood* (red.V. Dubowitz). London 1995, Saunders
38. Dubowitz V.: Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Europ. J.Paediatr.Neurol.* 1999, 3: 49
39. Echaniz-Laguna A., Miniou P., Bartholdi D. i wsp.: The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am.J.Hum.Gen.* 1999, 64: 1365
40. Emery A.: The nosology of the spinal muscular atrophies. *J.Med.Genet.* 1971, 8: 481
41. Erdem H., Pehlivan S., Topaloglu H. i wsp.: Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Develop.* 1999, 21: 86
42. Feldkotter M., Schwarzer V., Wirth R. i wsp.: Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on Real Time Light Cycler PCR: Fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 2002, 70: 358
43. Fischer U., Liu Q., Dreyfuss G.: The SMN-SIP1 Complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997; 90: 1023
44. Frugier T., Nicole S., Diaz C.C. i wsp.: The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr.Genet.Dev.* 2002, 12: 294

45. Frugier T., Tiziano F., Diaz C.C. i wsp.: Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2000, 9: 849
46. Glotov A.S., Kiselev A., Ivashchenko T. i wsp.: Analysis of deletional damage in SMN1, SMN2 and NAIP genes in patients with spinal muscular atrophy in the northwestern region of Russia. *Genetika* 2001, 37: 1156
47. Gambardella A., Mazzei R., Toscano A. i wsp.: Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann. Neurol.* 1998, 44: 83
48. Gubitz A.K., Mourrelatos Z., Abel L. i wsp.: Gemin 5: a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J.Biol.Chem.* 2002, 277: 5631
49. Hebert M.D., Szymczyk P.W., Shpargel K.B. i wsp.: Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes.Dev.* 2001, 15: 2720
50. Hahnen E., Forkert R., Marke C. i wsp.: Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy, evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum.Mol.Genet.* 1995, 4: 1927
51. Hahnen E., Schönling J., Rudnik-Schöneborn S i wsp.: Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum.Mol.Genet* 1997, 5: 821
52. Hausmanowa-Petrusewicz I., Askanas W., Badurska B. i wsp.: Infantile and juvenile spinal muscular atrophy. *J.Neurol.Sci.* 1968, 6: 269
53. Hausmanowa-Petrusewicz I., Prot J., Sawicka E. : W sprawie klinicznej zmienności dziecięcej i młodzieńczej postaci zaniku rdzeniowego mięśni Rozprawy Wydz Nauk Medycznych 1966, rozdz. X :185
54. Hausmanowa-Petrusewicz I., Zaremba J., Borkowska J., Prot J.: Genetic investigations on chronic forms of infantile and juvenile spinal muscular atrophy. *J.Neurol.*1976, 213:313

55. Hausmanowa-Petrusewicz I., Zaremba J., Borkowska J.: Chronic form of childhood spinal muscular atrophy. Are the problems of its genetics really solved? *J.Neurol.Sci.* 1979, 43: 313
56. Hausmanowa-Petrusewicz I., Fidziańska A., Niebrój-Dobosz i wsp.: Is Kugelberg-Welander spinal muscular atrophy a foetal defect. *Muscle Nerve* 1980, 3: 389
57. Hausmanowa-Petrusewicz I., Zaremba J., Borkowska J.: Juvenile motor neuron diseases-the sex influence in benign juvenile pseudodystrophic spinal muscular atrophy. *Human motor neuron diseases* (red. L.P.Rowland), New York 1982, Raven Press
58. Hausmanowa-Petrusewicz I., Zaremba J., Borkowska J. i wsp: Chronic proximal muscular atrophy of childhood and adolescence: sex influence. *J.Med.Genet* 1984, 21:447
59. Hausmanowa-Petrusewicz I.: *Choroby Nerwowo-Mięśniowe.* PWN, Warszawa 1999
60. Hausmanowa-Petrusewicz I., Jędrzejowska M.: Spinal muscular atrophy of childhood at the edge of the centuries. *Functional Neurol.* 2001, 16 (suppl.): 247
61. Hoffmann J.: Über chronische spinale Muskel-Atrophie in Kindesalter auf familiarere Basis. *Deutsche Ztschr. Nervenhk.* 1893, 3: 427
62. Hoffmann J.: Weitere Beiträge zur Lehre von der hereditären progressiven spinalen Muscelatrophie im Kindesalter. *Deutsche Ztschr. Nervenhk.* 1897, 10: 292
63. Hoffmann J: Dritter Beitrag zur Lehre von der hereditären progressiven spinalen Muscelatrophie im Kindesalter. *Deutsche Ztschr.Nervenhk.* 1900, 18: 217
64. Hsieh-Li H., Chang J., Jong Y. i wsp.: A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat.Genet* 2000, 24:66

65. Iwahashi H., Eguchi Y., Yasuhara N. i wsp.: Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 1997, 390: 413
66. Jędrzejowska M.: Rdzeniowy zanik mięśni – deficyt białka SMN. *Neurol.Neuroch.Pol.* 2001, 35: 289
67. Jones K.W., Górzyński K., Hales C.M. i wsp.: Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J.Biol.Chem.* 2001, 276: 38645
68. Jordanova A., Styanova V., Uzunova M. i wsp.: Deletion analysis of Bulgarian SMA families. *Hum.Mut.* 1998, 12: 33
69. Korinthenberg R., Sauer M., Ketelsen U.P. i wsp.: Congenital axonal neuropathy caused by deletions in the spinal muscular atrophy region. *Annls Neurol* 1997, 42: 364
70. Kugelberg E., Welander L.: Familial neurogenic (spinal?) muscular atrophy simulating ordinary proximal dystrophy. *Acta Psychiat.Scand.* 1954, 29: 42
71. Kugelberg E., Welander L.: Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *Arch.Neurol.Psychiat* 1956, 75: 500
72. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S. i wsp.: Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genet.* 1997, 16: 265-270
73. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S. i wsp.: Identification and characterization of a spinal muscular atrophy - determining gene. *Cell* 1995, 80: 155
74. Lefebvre S, Burglen L., Frezal J. i wsp.: The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1998, 7: 1531
75. Lewin B.: Genes for SMA: multum in parvo. *Cell* 1995, 80: 1
76. Liu Q., Dreyfuss G.: A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 1996, 15: 3555

77. Liu Q., Dreyfuss G., Wang F.: The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 1997, 90:1013
78. Lorson C., Strasswimmer J., Yao J. i wsp.: SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nature Genet.* 1998, 19: 63
79. Mailman M, Hemingway T., Darsey R. i wsp.: Hybrids monosomal for human chromosome 5 reveal the presence of a spinal muscular atrophy (SMA) carrier with two SMN1 copies on one chromosome. *Hum.Genet.* 2001, 108: 109
80. Martin Y., Valero A., Castillo E. i wsp.: Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletion: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations. *Hum Genet.* 2002, 110: 257
81. Matera A.G., Frey M.R.: Coiled bodies and gems: janus or gemini? *Am.J.Hum.Genet.* 1998, 63: 317
82. Melki J., Abdelhak S., Sheth P. i wsp.: Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990, 344: 767
83. Miller P.: A simple salting procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988, 17: 1784
84. Monani U., Sendtner M., Coover D. i wsp.: The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn* (-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet* 2000, 9:333
85. Monani U., Coover D., Burghes A.: Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2000, 9: 2451
86. Munsat T., Davies K.: Report on International SMA Consortium Meeting. *Neuromusc.Disord.* 1992, 2:423
87. Nicole S., Diaz C.C., Frugier T. i wsp.: Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects. *Muscle Nerve* 2002, 26:4

88. Parsons D., McAndrew P., Iannaccone S., i wsp.: Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am.J.Hum.Genet.* 1998, 63:1712
89. Patrizi A.L., Tiziano F., Zappata S. i wsp.: SMN protein analysis in fibroblast, amniocyte and CVS cultures from spinal muscular atrophy patients and its relevance for diagnosis. *Europ.J.Hum.Genet* 1999; 7: 301
90. Paushkin S., Gubitz A., Massenet S. i wsp.: The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr.Cell.Biol* 2002, 14: 305
91. Pearn J.H., Carter C., Wilson. J.: The genetic identity of acute infantile muscular atrophy. *Brain* 1973, 96: 463
92. Pearn J., Bunday S., Carter C.: A genetic study of subacute and chronic spinal muscular atrophy in childhood. *J. Neurol. Sci.* 1978, 37: 227
93. Prot J., Sawicka E.: Zmienność wewnątrzrodzinna w zaniku rdzeniowym mięśni. *Neur.Neurchir.Pol.* 1969, 3:301
94. Pellizzoni L., Baccon J., Charroux B. i wsp.: The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr.Biol.* 2001, 11: 1079
95. Pellizzoni L, Baccon J., Rappsilber J. i wsp.: Purification of native SMN complexes and identification of Gemin 6 as a novel component. *J.Biol.Chem.* 2002, 277: 7540
96. Pellizzoni L., Charroux B., Rappsilber J. i wsp.: A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J.Cell.Biol.* 2001, 152: 75
97. Rodrigues N., Owen N., Talbot K. i wsp.: Deletion in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1995, 4:631
98. Roy N., Mahadevan MS., McLean M. i wsp.: The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), a novel protein with homology to

- baculoviral inhibitors of apoptosis is partially deleted in individuals with type 1, 2 and 3 spinal muscular atrophy (SMA). *Cell* 1995, 80:167
99. Rudnik-Schöneborn S., Forket R, Wirth B. i wsp.: Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuroped* 1996, 27: 8
100. Samilchuk E., D'Souza B., Bastaki L. i wsp. Deletion analysis of the SMN and NAIP genes in Kuwaiti patients with spinal muscular atrophy. *Hum.Genet.* 1996, 98: 524
101. Savas S., Gokgoz N., Kayserili H. i wsp.: Screening of deletions in SMN, NAIP, and BTF3p44 genes in Turkish spinal muscular atrophy patients.. *Hym.Hered.* 2000, 50: 162
102. Scharf J.M., Endrizzi MG., Wetter A. i wsp.: Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nature Genet.* 1998, 20: 83
103. Schrank B., Gotz R., Gunnensen J.M. i wsp.: Inactivation of the survival motor neuron gene a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1997, 94: 9920
104. Sertie J., Barisic N., Sostarco M. i wsp.: Deletions in the SMN and NAIP genes in patients with spinal muscular atrophy in Croatia. *Collegium Antropologicum* 1997, 21: 487
105. Sevestre : Paralyse flasque des quatre membres et des muscles du tronc (sauf le diaphragme) chez un enfant de deux mois et demi. *Neurol.Centralbl.*1900, 19: 904
106. Spiegler A.W., Hausmanowa-Petrusewicz I., Borkowska J. i wsp.: Population data on acute infantile and chronic childhood spinal muscular atrophy in Warsaw. *Hum.Genet.*1990, 85: 211
107. Stevens G., Yawitch T., Rodda J. i wsp. Different molecular basis for spinal muscular atrophy in South African black patients. *Am.J.Med.Genet.*1999, 86: 420

108. Talbot K., Rodrigues N., Ignatius J. i wsp.: Gene conversion of SMN locus in autosomal recessive spinal muscular atrophy does not predict a mild phenotype. *Neuromusc.Dis.* 1997, 7: 198
109. Taylor J., Thomas N., Lewis C. i wsp.: Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Europ.J.Hum.Genet.* 1998, 6: 467
110. Van der Steege G., Grootsholten P., Van der Vlies P. i wsp.: PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995, 345: 985
111. Velasco E., Valero C., Valero A. i wsp.: Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of BCD541 and SMA phenotype. *Hum.,Mol.Genet.* 1996, 5: 257
112. Vyas S.: Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum.Mol.Genet.* 2002, 11:2751
113. Werdnig G.: Zwei fruchinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 1891, vol 22: 437
114. Werdnig G.: Die fruchinfantile progressive spinale Amyotrophie. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 1894, vol 26: 706
115. Wirth B., Herz M., Wetter A. i wsp.: Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counselling. *Am.J.Hum.Genet.* 1999, 64:1 340
116. Wirth B.: An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum.Mut.* 2000, 15: 228
117. Wirth B., Hahnen E., Morgan K. i wsp.: Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker

- genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum.Mol.Genet* 1995, 4: 1273
118. Yang T., Yuan L., Liu T. i wsp.: Detection of SMN gene deletions in spinal muscular atrophy. *Chung –Hua i Hsueh i Chuan Tsa Chih* 1998, 15: 95
119. Young P.J., Day P.M., Zhou J. i wsp.: A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J.Biol.Chem.* 2002, 277: 2852
120. Zellweger H.: The genetic heterogeneity of spinal muscular atrophy (SMA). The 2nd Conference of Clinical Delineation of Birth Defects. New York 1971, Vol.7, str: 82
121. Zaremba J.: Genetyka przewlekłej proksymalnej postaci rdzeniowego zaniku mięśni. Warszawa 1983, Instytut Psychoneurologiczny
122. Zerres K., Rudnik-Schöneborn, Forkert R. i wsp.: Genetic bases of adult onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995, 346: 1162
123. Zatkova A., Hahnen E., Wirth B. i wsp.: Analysis of the SMN and NAIP genes in slovac spinal muscular atrophy patients. *Hum.Heredity* 2000, 50: 171

8. STRESZCZENIE

Dosiebny dziecięcy i młodzieńczy rdzeniowy zanik mięśni (SMA) jest chorobą genetycznie uwarunkowaną, dziedziczną jako cecha autosomalna recesywna. Częstość występowania tej jednostki chorobowej szacuje się na 1 na 7-10 tysięcy urodzeń, co odpowiada częstości nosicielstwa 1 na 42-50 osób w populacji. SMA spowodowany jest utratą motoneuronów rdzenia kręgowego, co w konsekwencji prowadzi do postępującego osłabienia i zaniku mięśni. Chorobę charakteryzuje duża zmienność fenotypowa – od formy ostrej, rozpoczynającej się w pierwszych miesiącach życia – SMA1, poprzez formę pośrednią – SMA2, po formę młodzieńczą o późnym początku – SMA3.

Wszystkie trzy postaci SMA zmapowano na długim ramieniu chromosomu 5 (5q13). W obszarze tym zidentyfikowano cztery geny (*SMN*, *NAIP*, *p44*, *H4F5*) obecne w dwóch kopiach: telomerowej (*SMN1*) i centromerowej (*SMN2*). Genem determinującym wystąpienie objawów SMA jest gen *SMN1*. Według danych z literatury u około 95% chorych stwierdza się homozygotyczny brak (delecja lub konwersja) eksonu 7 kopii genu *SMN1*, u około 2% inne mutacje wewnątrzgenowe. Pozostałe 2-3% przypadków nie jest związana patogenetycznie z mutacjami genu *SMN1*. Utrata kopii centromerowej (*SMN2*) nie wywołuje objawów SMA - homozygotyczny brak kopii centromerowej stwierdza się u 5% zdrowej populacji. Wydaje się, że za zróżnicowanie obrazu klinicznego choroby odpowiedzialnych jest kilka czynników (wielkość delecji w regionie SMA, liczba kopii centromerowych, konwersja genu *SMN*), wpływających na ostateczny poziom białka SMN w komórce.

Wysoka homogenność podłoża molekularnego umożliwiła opracowanie szybkiego i wiarygodnego testu genetycznego, opartego na technice PCR. Test ten stał się podstawą diagnostyki rdzeniowego zaniku mięśni, a jego negatywny wynik w praktyce zaczął być traktowany jako podstawa do wykluczenia choroby. Jednak niewielki odsetek przypadków wywołany jest mutacjami punktowymi, nie wykrywanymi w rutynowej diagnostyce. Stosowany test genetyczny jest również nieprzydatny w ocenie stanu nosicielstwa zmutowanego genu.

Celem pracy była:

1. ocena częstości występowania homozygotycznej delekcji eksonu 7 genu *SMN1* w polskiej populacji chorych na SMA
2. ocena fenotypu i genotypu z uwzględnieniem zmienności wewnątrzrodzinnej i przypadków atypowych
3. poszukiwanie mutacji punktowych w grupie bez homozygotycznej delekcji
4. ocena korelacji kliniczno-genetycznych
5. opracowanie metody badania nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* w rodzinach ryzyka

Badana grupa obejmowała 442 pacjentów, kierowanych na badanie molekularne w kierunku SMA.

Analiza molekularna obejmowała:

1. ocenę wielkości delekcji w regionie SMA (ekson 7 i 8 genu *SMN1* oraz ekson 5 genu *NAIP*) przy użyciu techniki PCR,
2. poszukiwanie mutacji punktowych z zastosowaniem sekwencjonowania 8 eksonów kodujących, poprzedzonego ilościową oceną kopii genu *SMN1*
3. badanie nosicielstwa zmutowanego genu *SMN1* z użyciem metody ilościowego PCR („real-time PCR”)

Na podstawie przeprowadzonej analizy oszacowano częstość występowania homozygotycznej delekcji eksonu 7 genu *SMN1* na około 96,6%, co odpowiada średniemu odsetkowi tej mutacji w krajach Europy Zachodniej.

W charakterystyce fenotypu polskich pacjentów zwracał uwagę wysoki odsetek formy łagodnej oraz przewaga liczebna płci męskiej we wszystkich typach, przede wszystkim jednak w formie 3b. Pomimo bardzo różnego wieku zachorowania stwierdzono wysoką homogenność objawów klinicznych, dotyczącą przede wszystkim symetrii i stopnia zajęcia poszczególnych grup mięśniowych. W sześciu przypadkach na 357 pozytywnie zweryfikowane molekularnie stwierdzono objawy atypowe: niepełnosprawność intelektualną, artrogrypozę, wadę serca, objawy piramidowe, współwystępujące z klasycznym obrazem SMA. W 30% chorych rodzeństw obserwowano występowanie zmienności wewnątrzrodzinnej.

Największe zróżnicowanie dotyczyło 4 rodzeństw, w których współwystępowała forma 2 i 3b. Nie obserwowano wpływu płci na to zjawisko.

W analizie wielkości delecji w regionie SMA zwracała uwagę wysoka częstość izolowanego braku eksonu 7, związanego prawdopodobnie w części przypadków z konwersją genu, a nie rzeczywistą delecją. Stwierdzono istotną statystycznie korelację między wielkością delecji w regionie SMA a nasileniem objawów klinicznych. Duże delecje, obejmujące swym zasięgiem geny *SMN1* i *NAIP*, związane były najczęściej (w 85%) z ostrą formą choroby. Z drugiej strony aż 50% mutacji w postaci łagodnej stanowiła izolowana utrata eksonu 7 genu *SMN1*.

W grupie 9 chorych nie wykazujących homozygotycznej delecji eksonu 7, a spełniających kryteria diagnostyczne wg Międzynarodowego Konsorcjum SMA poszukiwano mutacji punktowych. Stosując metodę „real-time PCR” wyłoniono grupę 5 pacjentów z jedną kopią genu *SMN1* (potencjalni nosiciele mutacji punktowych na jednym allelu i delecji drugiego). W wyniku sekwencjonowania zidentyfikowano u jednego z nich mutację punktową zmiany sensu T274I, związaną się ze stosunkowo łagodnym fenotypem (SMA3a). Patogeneza choroby w pozostałych 4 przypadkach związana jest prawdopodobnie z mutacjami w obrębie intronów bądź sekwencji promotorowych genu. Objawy kliniczne chorych z prawidłową liczbą kopii *SMN1* w badaniu ilościowym najprawdopodobniej są spowodowane mutacjami innych niż *SMN1* genów.

W próbach nad opracowaniem metody badania nosicielstwa defektywnego genu wykorzystano nową technikę - „real-time PCR”. Zaprojektowano startery, rozróżniające kopie genu *SMN1* i *SMN2* z wysoką swoistością. U potencjalnych nosicieli (rodzice chorych dzieci) uzyskano dwukrotnie niższą liczbę kopii genu *SMN1* w porównaniu ze zdrową kontrolą. Uzyskane wyniki są jednak wynikami wstępnymi. Metoda wymaga dalszych prac, przede wszystkim nad standaryzacją wyników. Ze względu na swą prostotę oraz niewielką czasochłonność wydaje się być obiecującym testem przesiewowym na nosicielstwo.

9. SUMMARY

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder, with a prevalence of approximately 1/10 000 and a carrier frequency of 1/42- 1/50. The disease is caused by the loss of the lower motorneurons, leading to progressive muscle weakness and atrophy. SMA is subdivided into three clinical forms on the basis of age at onset and achieved milestones: acute (SMA1), intermediate (SMA2) and mild (SMA3). In 1990 all three forms were mapped by linkage analysis to the long arm of chromosome 5 (5q11.2-13.3). Four genes, all present in at least two copies- telomeric and centromeric, have been identified in critical SMA region: *SMN*, *NAIP*, *p44* and *H4F5*. Deletions of the telomeric copy of *SMN* gene (*SMN1*) appeared to be directly involved in SMA. About 95% of SMA patients display homozygous absence of exon 7 *SMN1* gene, whereas 2% present compound heterozygosity with a subtle mutation on one chromosome and deletion on the other one. About 2% of SMA patients are unlinked to chromosome 5q13.

Before the era of molecular genetics, the diagnosis was based on clinical features, muscle biopsy and electrophysiological findings. The homogeneity of molecular pathology made it possible to design a reliable diagnostic test based on PCR technique. It has become a screening test in SMA diagnostic procedure and its negative result is identified with exclusion of the disease. Small percentage of cases is caused by small intragenic mutations, not detected in routine PCR test. The PCR method is also useless as a carrier-screening test.

The aim of the study was:

1. To evaluate the frequency of homozygous deletion of exon 7 *SMN1* gene in population of Polish SMA patients
2. To characterise phenotype and genotype of Polish SMA patients with regard to intrafamilial heterogeneity and atypical cases
3. To determine frequency, type and relation of SMA phenotype to small intragenic *SMN1* mutations in a group of 9 SMA patients who did not reveal homozygous absence of exon 7 *SMN1* gene.
4. To correlate phenotype in relation to genotype
5. To design the carrier test of mutated gene in high risk families

The material consisted of 442 patients with suspected SMA.

Molecular analysis included:

1. Estimation of deletion size in SMA region, using PCR method
2. Searching for point mutation using direct sequencing of 8 coding exons, preceded by quantitative assay of *SMN1* copy for identification of SMA compound heterozygotes
3. Designing the screening-carrier test with the use of real time PCR

The frequency of homozygous absence of exon 7 *SMN1* gene was estimated to be about 96,6% in Polish SMA population. This is similar to average percentage of this mutation in Western European countries. High percentage of mild form and higher prevalence of males was noted in all three types. This is especially the case in SMA 3b. Despite differences in age of onset, high homogeneity of clinical symptoms was noticed, concerning mainly symmetry and degree of muscle weakness. In six of 357 genetically verified SMA cases atypical symptoms were present (coexisting with classical SMA). These were intellectual impairment, arthrogyrosis, heart defect and pyramidal signs. Intrafamilial heterogeneity was observed in 30% of SMA siblings. This clinical heterogeneity was most pronounced in four pairs of siblings with coexisting of SMA2 and 3b. There was no sex influence seen in families with intrafamilial clinical variability. The analysis of deletion size in SMA region showed high percentage of exon 7 but not exon 8 of *SMN1* gene absence. Positive correlation between deletion size in SMA region and severity of the disease was found. Large-scale deletions, including *SMN* and *NAIP* genes, were associated (in 85%) with the severe form of the disease (SMA1). As much as 50% of mutations in mild form were represented by isolated absence of exon 7 *SMN1* gene, connected probably (at least in some cases) with gene conversion. In the group of 9 non-deleted patients, fulfilling diagnostic criteria of International SMA Consortium, point mutations were searched for. Real-time PCR analysis revealed that four of these nine patients possessed only one copy of *SMN1* gene. It seems that they are compound heterozygotes. In one of these four cases we identified missence mutation T274I, connected with relatively mild phenotype (SMA3a). Other three patients could carry mutations in promotor

region or intronic sequences. Clinical symptoms of the patients with normal number of *SMN1* copies in quantitative analysis are most probably caused by mutations in genes unlinked to 5q13. In experiments leading to establish carrier-state of defective gene new technique of quantitative assay- real time PCR was used. The attempt of designing primers distinguishing *SMN1* from *SMN2* was successful. Preliminary results seem to be promising. The number of *SMN1* copies was two times lower (in comparison to control) in potential SMA carriers- the parents. However this method needs to be improved especially in result standardisation. Because of its simplicity this technique seems to be promising carrier-screening test.

10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

Ryciny:		str.
Ryc.1	Schemat budowy regionu SMA	18
Ryc.2	Schemat budowy genu <i>SMN</i>	19
Ryc.3	Ekspresji ulegają oba geny <i>SMN</i>	21
Ryc.4	Wynik poszukiwania delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i>	29
Ryc.5	Wynik poszukiwania delecji eksonu 8 genu <i>SMN1</i>	30
Ryc.6	Wynik poszukiwania delecji eksonu 5 genu <i>NAIP</i>	31
Ryc.7	Wynik amplifikacji metodą „real-time PCR” dla genów <i>SMN1</i> , <i>SMN2</i> i <i>RN-azy</i>	35
Ryc.8	Rodowód 531	43
Ryc.9	Rodowód 529	43
Ryc.10.	Rodowód 351	43
Ryc.11	Wielkość delecji w regionie SMA w polskiej populacji chorych na SMA	48
Ryc.12	Mutacja punktowa zmiany sensu T274I	56
Ryc.13	Umiejscowienie sekwencji starterów oraz sondy TaqMan użytych do badania ilościowego	65
Ryc.14	Wynik analizy ilościowej przy zastosowaniu kolejnych rozcieńczeń DNA	67
Ryc.15	Wynik analizy ilościowej osoby zdrowej, nie nosiciela	67
Ryc.16	Wynik analizy ilościowej nosiciela	68
Tabele:		
Tabela I	Klasyfikacja SMA	12
Tabela II	Rozkład zachorowań w polskiej populacji na różne typy SMA z uwzględnieniem płci	39
Tabela III	Rozkład zachorowań w rodzeństwach na różne typy SMA z uwzględnieniem płci	42
Tabela IV	Analiza przypadków atypowych z delecją w genie <i>SMN1</i>	45
Tabela V	Zależność między wielkością delecji w regionie	

	SMA a fenotypem	50
Tabela VI	Zależność między wielkością delecji w regionie SMA a fenotypem u chorych płci męskiej	51
Tabela VII	Zależność między wielkością delecji w regionie SMA a fenotypem u chorych płci żeńskiej	52
Tabela VIII	Analiza ilościowa genu <i>SMN1</i> w przypadkach podejrzewanych o mutacje punktowe	54
Tabela IX	Przypadki SMA nie wykazujące delecji w genie <i>SMN1</i>	64
Tabela X	Częstość występowania delecji wśród chorych na SMA w krajach europejskich	70
Fotografie:		
Fot.1	SMA1	14
Fot.2	SMA 2	15
Fot.3	SMA 3	17
Fot.4	Zmienność wewnątrzrodzinna	41
Fot.5	SMA 2 z objawami atypowymi	46
Fot.6	Pacjent z SMA1, nie wykazujący obuallelicznej delecji w genie <i>SMN1</i>	60

11. KRYTERIA DIAGNOSTYCZNE WEDŁUG MIĘDZYNARODOWEGO KONSORCJUM SMA (1992)

KRYTERIA WŁĄCZENIA

I. Kryteria kliniczne

Wiek zachorowania:

- SMA1 (forma ostra) - początek poniżej 6 mż
- SMA2 (forma pośrednia) - początek poniżej 18 mż
- SMA3 (forma łagodna) - początek powyżej 18 mż

Oslabienie mięśni:

- osłabienie mięśni kończyn i tułowia (mięśnie dosiebne bardziej zajęte niż odsiebne, kończyny dolne słabsze niż kończyny górne)
- symetryczne

uwagi: zanik mięśni często niewidoczny w SMA1

Objawy towarzyszące

- fibrylacje na języku, drżenie rąk

uwagi:

- drżenie rąk obserwowane jest często w SMA 2 i 3
- w SMA1 bywa obserwowane ograniczenie odwodzenia w stawach oraz wyprostu w stawie kolanowym i łokciowym

Przebieg

- w SMA1 i 2 zahamowanie rozwoju ruchowego :
 - Dzieci z SMA1 nigdy samodzielnie nie siadają
 - Dzieci z SMA2 nigdy samodzielnie nie stoją i nie chodzą
 - Pacjenci z SMA3 osiągają zdolność samodzielnego stania i chodzenia
- w SMA1 zgon zwykle poniżej 2 roku życia
- w SMA2 zgon zwykle powyżej 2 roku życia
- w SMA3 zgon po osiągnięciu wieku dorosłego

uwagi: niektórych pacjentów trudno zaklasyfikować jednoznacznie do określonej grupy

II. Kryteria diagnostyczne

Eektrofizjologia:

- nieprawidłowa czynność spoczynkowa np. fibrylacje, dodatnie potencjały, fascykulacje
- zwiększony czas trwania i amplituda pojedynczej jednostki ruchowej

Histopatologia mięśnia:

- grupy włókien zanikłych, zarówno typu 1 jak i 2
- włókna przerosłe typu 1
- „type grouping” w przypadkach przewlekłych

KRYTERIA WYŁĄCZENIA

I. Kryteria kliniczne

- osłabienie mięśni zewnętrznych oka, przepony, mięśnia sercowego lub znacznego stopnia osłabienie mięśni twarzy

Objawy towarzyszące

- zaburzenia czucia
- objawy uszkodzenia OUN
- artrogrypoza
- zajęcie innych części układu nerwowego lub narządów np. zaburzenia widzenia, słyszenia

II. Kryteria diagnostyczne

Biochemia:

- aktywność CK > 10 razy powyżej normy
- niedobór dystrofiny
- niedobór heksosaminidazy

Eektrofizjologia:

- zmniejszona szybkość przewodzenia poniżej 70% dolnych wartości normy
- nieprawidłowe potencjały czuciowe