

## Проксимальная спинальная мышечная атрофия типов I–IV: особенности молекулярно-генетической диагностики

В.В. Забненкова, Е.Л. Дадали, А.В. Поляков

ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

**Контакты:** Виктория Владимировна Забненкова V\_Zabnenkova@dnalab.ru

Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) типов I–IV — наиболее частое аутосомно-рецессивное нейромускулярное заболевание, вызываемое мутациями в гене *SMN1*, кодирующем белок выживаемости мотонейронов. Характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью вследствие поражения двигательных нейронов передних рогов спинного мозга. Классификация заболевания основана на времени его начала, тяжести течения и продолжительности жизни. Выявление мажорной мутации делеции экзонов 7 и/или 8 гена *SMN1* является качественным, надежным и чувствительным диагностическим тестом. Ген *SMN1* имеет почти полный гомолог — ген *SMN2*, что затрудняет анализ гетерозиготного носительства заболевания. Поэтому определение статуса носителя основано на количественном анализе числа копий гена *SMN1*. В работе освещаются проблемы и новые возможности в молекулярно-генетической диагностике проксимальной СМА.

**Ключевые слова:** спинальная мышечная атрофия, гены *SMN*, генетический анализ, число копий гена *SMN*, локус спинальной мышечной атрофии, генотип «2+0», точковые мутации гена, алгоритм диагностики, фенотипическая корреляция, скрытое носительство

### Proximal spinal muscular atrophy types I–IV: Specific features of molecular genetic diagnosis

V.V. Zabnenkova, E.L. Dadali, A.V. Polyakov

Research Center of Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) types I–IV is the most common autosomal recessive neuromuscular disease caused by mutations in the *SMN1* gene encoding the survival motor neuron protein. It is characterized by progressive muscle weakness due to injury of the motor neurons of the anterior horns of the spinal cord. The classification of the disease is based on the time of its onset, severity, and survival. The detection of the major mutation of exon 7 and/or 8 deletion in the *SMN1* gene is a qualitative reliable and sensitive diagnostic test. The *SMN1* gene has the almost complete homolog *SMN2* gene, which hampers the analysis of heterozygous carriage of the disease. So the determination of the carriage status is based on the quantitative analysis of the number of *SMN1* gene copies. The paper covers problems and new possibilities in the molecular genetic diagnosis of proximal SMA.

**Key words:** spinal muscular atrophy, *SMN* genes, genetic analysis, *SMN* gene copy numbers, spinal muscular atrophy locus, genotype 2+0, gene point mutations, diagnostic algorithm, pheno/genotypic correlation, latent carriage.

### Введение

Наследственные спинальные мышечные атрофии (СМА) — генетически гетерогенная группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующей дегенерацией и гибелью двигательных нейронов передних рогов спинного мозга, а в ряде случаев и ядер ствола головного мозга. Болезнь выражается в постепенном развитии симметричных вялых параличей и атрофии поперечно-полосатой мускулатуры, качественном перерождении соответствующих мышц и снижением их возбудимости.

Наиболее распространены проксимальные СМА типов I–IV, на долю которых приходится 85 % всех изолированных форм этой группы заболеваний. Приблизительно 1 из 6–10 тыс. человек страдает СМА различной степени тяжести. Частота носительства составляет 1/40–50 [1, 2].

Выделяют 4 клинических типа проксимальной СМА на основе различий в возрасте начала, тяжести течения и продолжительности жизни [3].

Тип I заболевания (болезнь Верднига–Гоффманна) является наиболее тяжелым и распространенным, на него приходится более 60 % больных СМА. Характеризуется ранним началом, в возрасте до 6 мес, и смертью от дыхательной недостаточности до достижения 2-летнего возраста. Пораженные дети не способны держать голову, переворачиваться, сидеть без поддержки. Проксимальная симметричная мышечная слабость, отсутствие моторного развития и мышечная гипотония — основные клинические признаки СМА типа I. Сохранность диафрагмы в сочетании со слабостью межреберной мускулатуры приводит к формированию куполообразной грудной клетки и парадоксального «брюшного» дыхания, когда ребенок напрягает мышцы живота, а не груди (диафрагма сильнее и используется как основная мышца при дыхании и тянет грудную клетку вниз). Наблюдаются фасцикуляции языка и трудности с глотанием и сосанием, что также способствует снижению защиты дыхательных путей

и увеличивает риск развития аспирационной пневмонии — важной причины смерти [3, 4].

Тип II заболевания, или хроническая СМА (болезнь Дубовица), имеет более позднее начало, в возрасте 6—18 мес, и менее тяжелое течение. Дети сохраняют способность сидеть самостоятельно. Некоторые пациенты могут стоять с поддержкой. Обычно развивается кифосколиоз, что требует хирургического или ортопедического вмешательства. Часто наблюдается мелкоразмашистый тремор пальцев вытянутых рук. Слабость глотания может препятствовать набору веса. Как и больные с СМА типа I, из-за нарушения иннервации и слабости межреберной мускулатуры пациенты с СМА типа II испытывают трудности с очищением дыхательных путей от секрета. Дыхательная недостаточность служит частой причиной смерти таких пациентов в подростковом возрасте [3, 4].

Начало СМА типа III (юношеская форма), или болезни Кугельберга—Веландер, варьирует в возрасте между 18 мес и первым-вторым десятилетием жизни. Больные со СМА типа III сохраняют способность передвигаться самостоятельно, но часто падают или испытывают трудности при подъеме и спуске по лестнице, беге, наклоне, подъеме из положения сидя. Нижние конечности при данном типе заболевания поражены сильнее, чем верхние. Часто развивается сколиоз [3, 4].

Также выделяют СМА типа IV. Данное заболевание возникает на 3-й декаде жизни. Характеризуется скрытым началом и медленно прогрессирующим течением. Двигательные нарушения носят мягкий характер, больные не испытывают трудностей с дыханием и питанием, сохраняют способность ходить в зрелом возрасте [5].

#### Молекулярно-генетические причины проксимальной СМА типов I–IV

Все клинические формы заболевания картированы на коротком плече хромосомы 5 в «горячей» области 5q12.2–13.3. Так называемый локус СМА представляет собой большой инвертированный повтор размером 500 тыс. пар нуклеотидов (п.н.), содержащий по крайней мере 4 гена, мутации в которых могут приводить к развитию СМА или оказывать модифицирующее влияние на тяжесть течения данного заболевания: *SMN*, *NAIP*, *SERF1A* (*H4F5*) и *GTF2H2* (*BTF2p44*). Каждый из этих генов представлен теломерной и центромерной копиями. Показано, что теломерная составляющая дуплика на 5q13, содержащая функциональные копии генов, демонстрирует компактную генную организацию размером 200 тыс. п.н., тогда как центромерная часть состоит из мозаичного комплекса ранее дуплицированных геномных сегментов [6, 7].

К возникновению проксимальных СМА приводят мутации в теломерной копии гена *SMN*, кодирующего белок выживаемости мотонейронов (survival motor neuron). Основным типом мутаций в этом гене являются делеции экзонов 7 и/или 8, которые выявляются

у 95 % больных. Остальные 5 % являются компаунд-гетерозиготами по делеции в одной копии гена *SMN1* и точковой мутации в другой.

Ген *SMN1* и его центромерная копия *SMN2* демонстрируют беспрецедентный уровень гомологии. Они состоят из 9 экзонов (1, 2a, 2b, 3–8) и различаются всего лишь 5 нуклеотидами: 3 в интронах 6 и 7; 2 в экзонах 7, 8. Критической точкой является замена цитозина на тимин в экзоне 7 гена *SMN2* (с. 840C > T). Замена в экзоне 7 не приводит к замене аминокислоты, изменения в экзоне 8 лежат в 3'-нетранслируемой области. На уровне аминокислотного состава наблюдается полная гомология между центромерной и теломерной копиями гена *SMN*. Вследствие различия в нуклеотидной последовательности основной транскрипт гена *SMN1* является полноценным (full-length SMN, FL-SMN) и состоит из всех 9 экзонов, в то время как транскрипт гена *SMN2* не содержит экзона 7 (SMN Δ7). Полагают, что замена с. 840C>T в экзоне 7 приводит к нарушению строения экзонного энхансера, активирующего расположенные рядом сайты сплайсинга или, как альтернативный вариант, создает сайт связывания для репрессора сплайсинга. Однако ген *SMN2* также продуцирует FL-SMN-транскрипт, но в относительно малых количествах [8, 9].

Продуктом гена *SMN* является белок, состоящий из 294 аминокислот, с молекулярным весом 38 кДа. Белок экспрессируется как в ядрах, так и в цитоплазме. В ядрах белок SMN локализуется в сфероподобных структурах, называемых гемами, ассоциированных с тельцами Кахала, вовлеченных в метаболизм РНК. Показано, что роль белка SMN связана с 2 важнейшими клеточными процессами, такими как биогенез сплайсомальных малых ядерных рибонуклеопротеинов и сплайсинг пре-мРНК. Кроме того, белок SMN участвует в сплайсинге пре-рРНК и биогенезе малых ядрышковых рибонуклеопротеинов, в генной экспрессии на уровне транскрипции [10, 11].

У пациентов со СМА, имеющих делецию гена *SMN1*, всегда представлена по крайней мере 1 копия гена *SMN2*.

Ген *SMN2* только частично функционален и поэтому не может полностью компенсировать отсутствие гена *SMN1*. У больных с делецией экзонов 7, 8 гена *SMN1* в гомозиготном состоянии экспрессируется малая часть функционального FL-SMN-белка, продуцируемого геном *SMN2*, тогда как неполноценная форма мРНК, SMN Δ7, крайне нестабильна и быстро разрушается. При исследовании больных СМА и моделей заболевания на животных отмечено, что продуцируемый геном *SMN2* уровень полноразмерного белка SMN достаточен для нормального функционирования большинства клеток, но не двигательных нейронов передних рогов спинного мозга. Полагают, что в α-мотонейронах существует механизм, влияющий на включение экзона 7 в мРНК, что жестко ограничивает синтез необходимого количества FL-SMN-белка, продуцируемого геном *SMN2* [12].

Благодаря нестабильности региона, в котором лежат гены *SMN*, ген *SMN2* может иметь несколько копий. Приблизительно у 80 % людей в популяции в целом наблюдается 1–2 копии. Описаны случаи делеции гена *SMN2* в гомозиготном состоянии у 5–10 % здоровых людей. У пациентов с СМА разнообразие числа копий гена *SMN2* гораздо больше и может варьировать от 1 до 6 копий. Следовательно, можно предположить: чем больше число копий гена *SMN2*, тем выше экспрессия полноценного белка *SMN*, продуцируемого центромерными копиями гена, и тем мягче фенотип заболевания.

Показано, что пациенты с тяжелой формой СМА типа I имеют от 1 до 2 копий гена *SMN2*, у большинства пациентов со СМА типа II ген *SMN2* представлен 2–3 копиями, а большая часть больных СМА типа III имеет от 3–4 до 5–6 копий гена *SMN2* [12–16].

### Диагностика проксимальной СМА

Идентификация гена *SMN1*, ответственного за развитие проксимальной СМА типов I–IV, открыла возможность для разработки прямой ДНК-диагностики данного заболевания. На рисунке представлен алгоритм диагностики СМА молекулярно-генетическими методами.

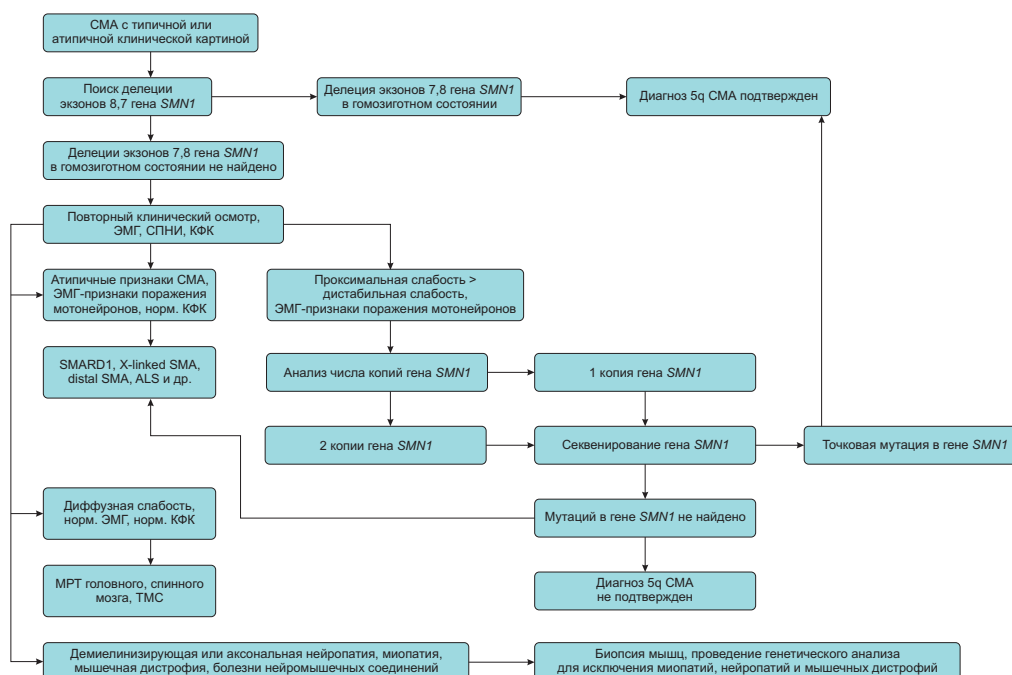
Пациентам, имеющим клинические признаки проксимальной СМА (5q13), в первую очередь следует проводить поиск делеции экзонов 7, 8 гена *SMN1*. Наличие мажорной мутации у 95 % больных, представляющей собой полную или частичную делецию гена *SMN1*, позволяет весьма эффективно диагностировать СМА в большинстве случаев. Однако сложность за-

ключается в наличии высокоомологичной копии гена *SMN1*, отличающейся всего 5 нуклеотидами. Два из них, располагающихся в экзонах 7 и 8, легли в основу методов, позволяющих отличить ген *SMN1* от его центромерной копии *SMN2*. Изначально прямая ДНК-диагностика проксимальной СМА проводилась методом SSCP-анализа. Однако позже он был заменен более простым и быстрым методом детекции делеций экзонов 7, 8 гена *SMN1* на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Обнаружение делеции экзонов 7 и/или 8 в гомозиготном состоянии позволяет подтвердить диагноз СМА у больного.

При отсутствии у пациента делеции экзонов 7 и/или 8 гена *SMN1* в гомозиготном состоянии следует провести количественный анализ числа копий генов *SMN*.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) возможно определение относительно-го числа копий генов *SMN*. Но на практике выявляется существенный недостаток: регистрируемый вариант нормы, определяемый соотношением числа копий гена *SMN1* к гену *SMN2* как 1:1 и подразумевающий наличие 2 копий каждого из генов, может маскировать случай гетерозиготного носительства делеции экзонов 7, 8 гена *SMN1* в сочетании с гетерозиготной делецией экзонов 7, 8 гена *SMN2*. При выявлении в результате ПЦР-ПДРФ-анализа делеции экзонов 7, 8 гена *SMN1* в гетерозиготном состоянии также нельзя однозначно утверждать о ее наличии, так как соотношение 1:2 визуально



Алгоритм диагностики проксимальной СМА молекулярно-генетическими методами. *SMN1* — ген, кодирующий белок выживаемости мотонейронов, теломерная копия; *SMARD1* — СМА с параличом диафрагмы, тип I; *X-linked SMA* — X-сцепленная СМА; *ALS* — боковой амиотрофический склероз; *distal SMA* — дистальная СМА; *5q СМА* — СМА, обусловленная мутациями в гене *SMN1*, картированном в локусе 5q13 на хромосоме 5; *КФК* — креатинфосфокиназа; *СПНИ* — скорость проведения нервных импульсов; *ЭМГ* — электромиография; *MPT* — магнитно-резонансная томография; *ТМС* — тандемная масс-спектрометрия

неразличимо с вариантом «2:3», т. е. в данном случае необходимо исключение дупликации гена *SMN2* [17].

На сегодняшний день оптимальным диагностическим методом для определения числа копий генов *SMN* является мультиплексная лигазная реакция с последующей амплификацией (Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). В основе данного метода лежит способность лигазы восстанавливать фосфодиэфирные связи в одноцепочечных разрывах двухцепочечных молекул ДНК. Преимущества метода MLPA: высокоточный — позволяет достоверно различить генотипы *SMN1*: *SMN2* «2:2» и «2:3», «2:3» и «2:4»; простой, относительно недорогой, обладает высокой пропускной способностью, позволяет количественно анализировать до 50 различных олигонуклеотидных последовательностей в 1 пробирке, возможно проведение анализа ДНК с малой концентрацией [17, 18].

При детекции количественным методом у больного СМА 1 копии гена *SMN1* и при уверенности врача в клиническом диагнозе, такому пациенту проводится поиск малых мутаций в гене *SMN1* методом прямого автоматического секвенирования.

При выявлении у больного 2 копий гена *SMN1* или 1 копии гена *SMN1* при отсутствии в ней точковой мутации следует пересмотреть возможный диагноз для данного пациента (см. рисунок).

Особое внимание хотелось бы уделить проблеме анализа носительства гена СМА. Как уже упоминалось выше, анализ гетерозиготного носительства усложняется высокой гомологией генов *SMN1* и *SMN2*. Определение статуса носителя должно осуществляться только количественным методом, позволяющим определять абсолютное число копий генов *SMN*.

Определение числа копий генов *SMN* рекомендуется:

- семьям, в которых биологический материал больного ребенка не доступен;
- вновь созданным парам, один из супругов в которых имеет в предыдущем браке ребенка с диагнозом СМА, подтвержденным молекулярно-генетическим методом;
- родственникам семей с отягощенным по СМА анамнезом.
- при скрининге носительства генов наиболее частых наследственных заболеваний в программе ЭКО, при подготовке к беременности.

Однако не стоит забывать, что и высокоточные количественные методы в ряде случаев остаются бессильными. Известно, что 3,2 % людей в популяции имеют обе копии гена *SMN1* на 1 хромосоме, т. е. имеют так называемый генотип «2+0» [19, 20]. Они являются носителями делеции, поскольку одна их хромосома 5 несет на себе 2 копии гена *SMN1*, а на второй — ген *SMN1* отсутствует. Еще 1,7 % составляют лица с малыми мутациями в гене *SMN1*, которые не детектируются количественными методами, однако могут быть выявлены путем прямого автоматического секвенирования [21].

Количественный анализ дал нам возможность определять число копий не только гена *SMN1*, но и гена *SMN2*. Как упоминалось выше, различия в возрасте манифестации и тяжести течения аллельных вариантов проксимальных СМА типов I–IV могут быть обусловлены модифицирующим влиянием числа копий гена *SMN2*. Может ли данный параметр быть полезным для определения типа и прогнозирования тяжести течения заболевания? На сегодняшний день проведено много исследований, посвященных фенотипическим корреляциям при СМА. Установлено, что у больных со СМА типов II, III число копий гена *SMN2* больше, чем у лиц с типом I. Но также описаны случаи, когда число копий гена *SMN2* не коррелирует с тяжестью течения заболевания. Показано, что критичным параметром является не число копий гена *SMN2*, а количество продуцируемого им полноразмерного белка SMN [22, 23]. Поэтому отсутствие абсолютной корреляции между числом копий гена *SMN2* и тяжестью течения заболевания не дает возможность использовать этот показатель для определения типа заболевания и прогноза тяжести его течения.

Для семей с идентифицированными мутациями в гене *SMN1* проводится пренатальная ДНК-диагностика проксимальной СМА. Материалом для исследования могут служить ворсины хориона, амниотическая жидкость и пуповинная кровь.

Кроме того, доступна и преимплантационная ДНК-диагностика (*in vitro*). Однако для этой процедуры необходимо высокое технологическое обеспечение. Данный вид анализа проводится только в специализированных медицинских центрах.

### Заключение

Проксимальная СМА типов I–IV — одно из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных заболеваний, характеризующихся тяжелым, инвалидизирующим течением, приводящим к раннему летальному исходу. Диагностика заболевания основывается на особенностях клинических проявлений, типичных признаков поражения передних рогов спинного мозга при проведении электромиографического исследования и ДНК-анализа, направленного на обнаружение делеции 7 и/или 8 экзона гена *SMN1* в гомозиготном состоянии. Традиционно при проведении ДНК-анализа в целях диагностики заболевания применяется метод ПЦР-ПДРФ-анализа. Однако, если использование данного метода необходимо и достаточно для постановки диагноза проксимальной СМА, при обнаружении гетерозиготного носительства делеции гена *SMN1* имеется ряд ограничений. Поэтому для определения статуса гетерозиготного носителя необходимо использовать только количественный метод ДНК-диагностики, наиболее оптимальным вариантом которого является MLPA-анализ. Для определения типа или прогноза тяжести течения заболевания использовать такой критерий, как число копий гена *SMN2*, не рекомендуется.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Pearn J.H. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980;26;1(8174):919–22.
2. Pearn J.H., Walton J.N. A clinical and genetic study of adult-onset spinal muscular atrophy. The autosomal recessive form as a discrete disease entity. *Brain* 1978;101:591–606.
3. Crawford T.O. Spinal Muscular Atrophies. *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence. A Clinician's Approach* by Jones H.R., De Vivo D.C. and Darras B.T. 2003. Chpt. 8. P. 145–166.
4. Prior T.W., Russman B.S. Spinal muscular atrophy. *Gene Review*, 2003.
5. Tsao B., Stojic A.S. Spinal muscular atrophy. *Emedicine*, 2009.
6. Burglen L., Lefebvre S., Clermont O. et al. Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 1996;32:479–82.
7. Courseaux A., Richard F., Grosgeorge J. et al. Segmental duplications in euchromatic regions of human chromosome 5: a source of evolutionary instability and transcriptional innovation. *Genome Res* 2003;13:369–81.
8. Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J., Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6307–6311.
9. Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W. et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 1999;8:1177–83.
10. Vyas C., Bechade C., Riveau B. et al. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum Mol Genet* 2002;11:2751–64.
11. Tizzano E., Baiget M. Molecular bases of spinal muscular atrophy: the survival motor neuron gene. *Contributions to Science* 2001;2: 35–42.
12. Ruggiu M., McGovern V.L., Lotti F. et al. A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy. *Mol Cell Biol* 2012;32(1):126.
13. Feldkotter M., Schwarzer V., Wirth R. et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: Fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70:358–68.
14. Jedrzejowska M., Milewski M., Zimowski J. et al. Phenotype modifiers of spinal muscular atrophy: the number of SMN2 gene copies, deletion in the NAIP gene and probably gender influence the course of the disease. *Acta Biochim Pol* 2009;56:103–8.
15. Zapletalova E., Hedvicakova P., Kozak L. et al. Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscul Disord* 2007;17(6):476–81.
16. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Руденская Г.Е. и др. Анализ фено-генотипической корреляции у российских больных СМА I–IV типа. *Мед генетика* 2012;11(11):15–21.
17. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Анализ носительства делеций в гене *SMN*, ответственном за возникновение спинальной мышечной атрофии I–IV типа. *Мед генетика* 2012;1(1):3–9.
18. <http://mrc-holland.com>
19. Chen K.L., Wang Y.L., Rennert H. et al. Duplications and de novo deletions of the SMNt gene demonstrated by fluorescence-based carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* 1999;85:463–9.
20. Ogino S., Wilson R.B. SMN dosage analysis and risk assessment for spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70:1596–8.
21. Wang C.H., Carter T.A., Das K. et al. Extensive DNA deletion associated with severe disease alleles on spinal muscular atrophy homologues. *Ann Neurol* 1997;42:41–9.
22. Le T.T., Pham L.T., Butchbach M.E. et al. SMN Delta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 2005;14:845–57.
23. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Модифицирующие факторы, оказывающие влияние на тяжесть течения спинальных мышечных атрофий I–IV типов. *Мед генетика* 2011;10(5):15–21.