

## Genetyka chorób nerwowo-mięśniowych

JACEK ZAREMBA

Z Zakładu Genetyki IPiN w Warszawie

*W wykładzie omówiono metody wprowadzone w ostatnich latach do badań w dziedzinie genetyki molekularnej. Przyniosły one ogromny postęp wiedzy na temat mechanizmów dziedziczenia niektórych chorób. Postęp ten zilustrowano wynikami badań genetycznych nad dystrofiami mięśniowymi Duchenne'a i Beckera oraz rdzeniowym zanikiem mięśni (red.).*

---

Słowa kluczowe: choroby nerwowo-mięśniowe - genetyka

---

Od dawna już wiadomo, że duża część chorób nerwowo-mięśniowych jest genetycznie uwarunkowana. Znane są różne typy dziedziczenia, jak: autosomalny dominujący, autosomalny recesywny oraz dominujący i recesywny sprzężony z płcią, czyli z chromosomem X. Na podstawie analizy rodowodów można wypowiadać się na temat typu dziedziczenia i podawać ryzyko zachorowania potomstwa. Genetyka kliniczna nadal posługuje się tymi klasycznymi metodami i w wielu przypadkach są one jeszcze bardzo przydatne.

Ostatnio jednak, zwłaszcza w ciągu ostatniego dziesięciolecia, odnotowaliśmy ogromny postęp w dziedzinie genetyki molekularnej. Metody stosowane w inżynierii genetycznej, poprzednio wypróbowywane głównie na mikroorganizmach, są obecnie szeroko stosowane w genetyce człowieka. Dzięki tym metodom zlokalizowano na poszczególnych chromosomach człowieka wiele chorób, w tym szereg chorób nerwowo-mięśniowych. Wiele genów zostało też sklonowanych. Dysponujemy więc materiałem, który można poddawać dalszej analizie, na przykład sekwencjonowaniu, czyli ustalaniu kolejności zasad azotowych tworzących kod genetyczny. Fragmenty DNA zlokalizowane w sąsiedztwie genów bądź też stanowiące części samych genów, znajdują zastosowanie jako sondy genetyczne – po wyznakowaniu ich izotopem radioaktywnym lub odpowiednim barwnikiem.

Szerokie zastosowanie znalazł tzw. *polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA*, czyli tzw. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), związany z zastosowaniem bakteryjnych enzymów, tzw. endonukleaz stanowiących system obrony bakterii w warunkach naturalnych. Enzymy te, zwane też restryktazami, posiadają tę własność, że tną nici DNA w swoich – dla danego enzymu – miejscach. Dzięki nim możemy poddawać trawieniu nici DNA, tzn. ciąć je na różnej długości fragmentów. Zmienność rozmiarów tych fragmentów, swoista dla danej osoby i dla danego enzymu, określa się właśnie jako RFLP. Polimorfizm ten dziedziczy się zgodnie z prawami Mendla i stanowi doskonały marker w analizie sprzężeń genetycznych.

Dużą karierę w analizie DNA zrobiła *metoda Southerna*. Polega ona na tym, że DNA po pocięciu enzymami restrykcyjnymi, poddaje się elektroforezie na żelu agarozowym, a następnie przenosi się fragmenty DNA z tego żelu na nitrocelulozę lub filtry nylonowe. Po denaturacji cieplnej, dzięki której uzyskuje się DNA jednoniciowy, dodaje się określoną sondę DNA (również jednoniciową) wyznakowaną na przykład fosforem radioaktywnym. Sonda ta łączy się swoiście (hybrydyzuje) z odpowiednim – komplementarnym – odcinkiem badanego DNA. Posługując się następnie metodą autoradiografii uzyskujemy na kliszy rentgenowskiej układ prążków swoisty dla danej osoby.

Ogromny postęp w analizie DNA przyniósł wprowadzenie metody pozwalającej na amplifikację - powielanie - badanych odcinków DNA przy pomocy tzw. *reakcji łańcuchowej z polimerazą* (PCR - Polymerase Chain Reaction). Metoda ta pozwala na uzyskanie dziesiątków tysięcy kopii badanego odcinka DNA, dzięki czemu wiele żmudnych stosowanych dotąd metod można było znacznie uprościć i skrócić.

Duże zastosowanie znalazła metoda tzw. *odwrotnej genetyki* polegająca na możliwości odтворzenia sekwencji DNA z RNA matrycowego przy pomocy enzymu - odwrotnej transkryptazy. W ten sposób uzyskuje się komplementarny DNA, który w całości składa się z sekwencji kodujących, tzn. z samych egzonów.

W celu zilustrowania postępu, jaki dokonał się w badaniach nad genetycznie uwarunkowanymi chorobami nerwowo-mięśniowymi, posłużę się kilkoma przykładami.

### 1. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a i Beckera

Dystrofie Duchenne'a i Beckera (DMD/BMD) są chorobami allelicznymi - zależnymi od mutacji w obrębie tego samego genu. Gen ten został zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu X w miejscu p21. Okazał się on być największym ze znanych genów u człowieka, składa się bowiem z około 2,5 miliona par zasad. W jego skład wchodzi około 75 egzonów. Odpowiadające temu genowi mRNA zawiera około 14 tysięcy par zasad. Większość mutacji występujących w obrębie genu stanowią delecje polegające na utracie różnej wielkości fragmentów DNA; stanowią one około 65% wszystkich mutacji; 5% stanowią duplikacje (podwojenie odcinka DNA); pozostałe 30% stanowią mutacje punktowe. Większość delecji skupia się w obrębie egzonów od 45 do 53. Produktem genu jest białko - dystrofina - składające się z 4 części określonych jako domeny. Białko to znajduje się głównie w komórkach mięśniowych, jego obecność stwierdzono jednak także w neuronach. Dystrofina została zidentyfikowana dzięki wspomnianej wyżej metodzie odwrotnej genetyki.

*W ciężkiej postaci choroby* - DMD - dystrofina w mięśniach występuje tylko w ilościach śladowych

lub w ogóle jej obecności nie udaje się stwierdzić. *W postaci lżejszej* - BMD - stwierdza się zaś obecność dystrofiny skróconej (niekompletnej). Istnieją obecnie podstawy, by przyjąć, że w DMD mutacja narusza fazę (ramkę) odczytu kodu genetycznego, w wyniku czego białko nie może być syntetyzowane. W BMD natomiast, mimo uszkodzenia genu, faza odczytu zostaje zachowana. Dystrofina może być więc syntetyzowana, chociaż jest zawsze niekompletna i funkcjonalnie "niepełnosprawna". W związku z tym obraz kliniczny postaci lżejszej - BMD - jest zmienny - od postaci dość ciężkich zbliżonych do DMD do stosunkowo lekkich - w zależności od nasilenia defektów strukturalnego i funkcjonalnego dystrofiny. Stwierdzone różnice w budowie i funkcji dystrofiny występującego w komórkach mięśniowych i nerwowych wiążą się z uaktywnianiem różnych regionów promotorowych genu - swoistych dla danej tkanki. Defekt dystrofiny w neuronach mózgu wiąże się zapewne z upośledzeniem umysłowym, które stwierdza się w części przypadków DMD/BMD.

### 2. Dystrofia miotoniczna Steinerta

Gen dystrofii miotonicznej (DM) został niedawno zlokalizowany na chromosomie 19 w miejscu q13.2. Nastąpiło to dzięki identyfikacji nowych markerów genetycznych leżących w najbliższym jego sąsiedztwie: apolipoprotein E i CII oraz genu mięśniowej kinazy kreatynowej. Przypomnijmy, że DM była pierwszą chorobą u człowieka, w której w roku 1954 stwierdzono sprzężenie genetyczne z genem Se (wydzielacza) i genem grupy krwi Lutheran. DM jest chorobą dominującą, w której zaobserwowano interesujące zjawisko antycypacji, tzn. nasilania się ciężkości choroby z pokolenia na pokolenie. Występuje też postać wrodzona choroby, i co szczególnie ciekawe, w przypadkach tych gen przenoszony jest z reguły przez matkę. Ostatnio wykazano, że podobnie jak ma to miejsce w zespole kruchego chromosomu X, mutacja choroby wiąże się z występowaniem powtarzających się sekwencji zasad azotowych CAG (cytozyna, adenina, guanina) i, że liczba tych

powtórzeń może się zwiększać z pokolenia na pokolenie, co wydaje się wiązać ze wspomnianym zjawiskiem antycypacji. Analiza sekwencji DNA wykazała, że normalna sekwencja CAG występująca u osoby zdrowej, u osób chorych ulega zwielokrotnieniu do tego stopnia, że może osiągać do 5 tysięcy par zasad. Stwierdzono też, że zwielokrotniony w ten sposób odcinek genu ma większe wymiary, gdy przekazywany jest przez matkę. Wiąże się to najpewniej z podanym wyżej faktem, że ciężka - wrodzona postać choroby przekazywana jest zawsze przez matkę.

### 3. Rdzeniowy zanik mięśni

Rdzeniowy zanik mięśni (RZM) stanowi dla genetyki klinicznej poważny problem, ponieważ jest to choroba częsta – druga po mukowiscydozie wśród chorób autosomalnych-recesywnych. RZM ma kilka form klinicznych:

- *ostra postać Werdniga-Hoffmanna (Typ I)*
- *postać pośrednia (Typ II)*
- *choroba Kugelberga-Welander (Typ III)*

W roku 1990 Brzustowicz i wsp. opublikowali wyniki swoich badań, z których wynika, że gen choroby znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 5 w odcinku q11.2-13.3. Początkowo opublikowane dane wydawały się świadczyć, że wszystkie trzy wymienione typy choroby są alleliczne, tzn. uwarunkowane mutacją w obrębie tego samego genu. Późniejsze wyniki badań (z roku 1991), z zastosowaniem dwóch polimorficznych markerów flankujących (położonych po obu stronach genu) – D5 S39 i D5 S6 w zasadzie potwierdziły tę lokalizację, jednak analiza niektórych rodzin wydaje się wskazywać, że RZM w części przypadków może być heterogeny. Gen nie został jeszcze sklonowany, nie wiadomo więc, jaki charakter mają znajdujące się w nim mutacje i co jest produktem genu. Postęp jest więc znaczący, ale obszar naszej niewiedzy na temat tej bardzo ważnej choroby jest jeszcze bardzo duży.

### 4. Inne choroby monogeniczne

Jest jeszcze wiele innych chorób nerwowo-mięśniowych, których geny zostały niedawno

zlokalizowane. Stwierdzono na przykład, że gen autosomalnej recesywnej dystrofii mięśniowej kończynowo-obrzęzowej znajduje się na chromosomie 15. Na chromosomie 5 znajduje się natomiast gen autosomalnej dominującej postaci tej choroby. Jak wykazały badania molekularne wiele przypadków kończynowo-obrzęzowej dystrofii okazało się być nieprawidłowo rozpoznanymi przypadkami dystrofii mięśniowej Beckera. Gen miopatii nemalinowej znajduje się na chromosomie 1; miopatii typu central core – na chromosomie 19q. Ogromną heterogenność wykazuje choroba Charcota-Marie-Tootha (C-M-T). W typie I choroby występuje duplikacja genu w miejscu 17p11.2. Inna, rzadsza postać choroby zależna jest od mutacji genu znajdującej się na chromosomie 1 – w sprzężeniu z grupą krwi Duffy. Znane są też 3 inne postaci choroby C-M-T sprzężone z chromosomem X: jedna dominująca w miejscu Xq13 i dwie recesywne – w miejscach Xp22.2 i Xq26-28. Gen choroby C-M-T typu II nie został jeszcze zlokalizowany.

### 5. Aberracje chromosomowe

Rozwój nowoczesnych technik przyniósł także znaczny postęp w badaniach aberracji chromosomowych. Bardzo interesujące odkrycie dotyczy na przykład zespołu Pradera-Willy'ego (znaczna hipotonia wrodzona, hipogonadyzm, otyłość, upośledzenie umysłowe), w którym udoskonalone metody cytogenetyczne, w tym metoda prążkowa o wysokim stopniu rozdzielczości oraz metoda hybrydyzacji in situ z sondami molekularnymi, pozwoliły na wykrycie uchwytnej morfologicznie, małej delecji (tzw. mikrodelecji), dotyczącej odcinka 15q11-13 (krytyczne miejsce znajduje się najpewniej w 15q12). Okazało się przy tym, że w zespole Pradera-Willy'ego chromosom z delecją pochodzi zawsze od ojca. Jeżeli zaś delecja jest pochodzenia matczynego, występuje zupełnie inna jednostka chorobowa - a mianowicie zespół Angelmana (tzw. zespół wesołej laleczki - happy puppet syndrome).

### 6. Rodzicielskie piętno genomowe

Funkcje genomu matczynego i ojcowskiego nie są więc jednakowe. Różnice w ich aktywno-

ności zależą od tzw. modyfikacji epigenetycznej – określanej jako rodzicielskie piętno genomowe (parental genomic imprinting), które powstaje w czasie gametogenezy. Chromosomy z tej samej pary – matczyne i ojcowski – są inaczej “napiętnowane” i wzajemnie się uzupełniają. Jeżeli jednak wskutek zaburzeń w podziale komórki zdarzy się, że dany osobnik oba chromosomy z tej samej pary otrzyma od jednego z rodziców - mamy wówczas do czynienia z tzw. "jednorodzielską" disomią (uniparental disomy), która może wiązać się z obecnością poważnych zaburzeń rozwojowych. Krańcowy przypadek disomii rodzicielskiej u człowieka stanowi zespół groniasty, w którym, jak się okazało, cały zestaw chromosomów 46,XX jest pochodzenia ojcowskiego (podwojenie ojcowskiego haploidalnego zestawu chromosomów 23,X). Zjawiskiem rodzicielskiego piętna genomowego tłumaczy się również pewne właściwości dziedziczenia występujące w dystrofii miotonicznej (patrz wyżej) i w płasawicy Huntingтона (chodzi o różnice zależne od płci osoby przenoszącej gen chorobowy).

## 7. Choroby genomu mitochondrialnego

Wszystkie choroby genetyczne, które zostały krótko omówione lub wspomniane powyżej dotyczą materiału genetycznego zawartego w chromosomach znajdujących się, jak wiadomo, w obrębie jądra komórkowego. Niewielka część materiału genetycznego znajduje się jednak poza jądrem w strukturach cytoplazmatycznych zwanych mitochondriami. Ich najbardziej istotną funkcją polega na syntezie ATP. Każdy mitochondrion zawiera po kilka kolistych chromosomów. W skład mitochondrialnego DNA (mtDNA) wchodzi tylko 16.569 par zasad. Trzeba zaznaczyć, że każdy osobnik otrzymuje mtDNA tylko od matki – razem z cytoplazmą zawartą w komórce jajowej; w plemnikach mitochondria nie występują.

Choroby genomu mitochondrialnego opisano po raz pierwszy w 1988 roku. Mają one najczęściej charakter encefalomiopatii. Dzieli się je na trzy główne grupy:

- *postępująca oftalmoplegia zewnętrzna*

- *zespół padaczki mioklonicznej i włókien mięśniowych poszarpanych (strzępiastych) (myoclonus epilepsy with ragged red fibers)*

- *zespół miopatii, encefalopatii, kwasicy mleczanowej, z epizodami udaropodobnymi.*

Od początku w chorobach tych odnotowano dwa ważne zjawiska:

- występowanie delecji w obrębie mtDNA obejmujących po kilka tysięcy par zasad

- występowanie heteroplazmii, tzn. współistnienia dwóch typów mtDNA w obrębie jednej komórki - jednego prawidłowego i drugiego z delecją.

Choroby genomu mitochondrialnego są dziedziczne i mają z natury rzeczy pochodzenie matczyne - tak w każdym razie należy oczekiwać, ponieważ mitochondria pochodzą tylko od matki. W większości przypadków choroby genomu mitochondrialnego występują sporadycznie, co oznacza, że mutacje w mtDNA powstają najczęściej *de novo*.

Powyższe dane stanowią rzut oka na postęp, jaki dokonał się w ciągu kilku ostatnich lat w badaniach molekularnych nad genetycznie uwarunkowanymi chorobami nerwowo-mięśniowymi. Można oczekiwać, że postęp ten otworzy w niedalekiej przyszłości nowe możliwości leczenia tych chorób. Obecnie ważny jest fakt, że w większości chorób, których przykłady przytoczono powyżej, dzięki stosowanym metodom molekularnym, możliwe jest prenatalne lub pre-symptomatyczne diagnozowanie. Wielki postęp stanowią zwłaszcza coraz to udoskonalane metody analizy DNA. W części chorób umożliwiają one bezpośrednie wykrywanie mutacji genowych - na przykład delecji w DMD/BMD; w innych pozwalają na diagnozowanie pośrednie, poprzez badanie sprzężeń pomiędzy genem chorobowym a określonymi markerami RFLP.

Na zakończenie ważna uwaga praktyczna: w analizie DNA niezbędne jest dysponowanie próbkami pobranymi od osób chorych i innych członków ich rodzin. Z myślą więc o możliwościach diagnostycznych, zwłaszcza w aspekcie badań prenatalnych, należy pobierać krew od osób chorych, izolować DNA i przechowywać

do momentu, kiedy rodzina zwróci się o pomoc. Szczególnie istotne jest to w przypadkach chorób ciężkich związanych ze znacznym skróce-

niem czasu przeżycia, jak na przykład w ostrej postaci rdzeniowego zaniku mięśni.

*Adres: Prof. Jacek Zaremba, Zakład Genetyki IPiN, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa*