

Molekulárně genetická diagnostika svalových dystrofií dětského věku

doc. RNDr. Lenka Fajkusová, CSc., Mgr. Jana Zídková, Ph.D.

Centrum molekulární biologie a genetiky, Fakultní nemocnice Brno

Svalové dystrofie jsou vzácná onemocnění vyznačující se velkou klinickou a genetickou heterogenitou. Nejznámější a nejčastější svalovou dystrofií dětského věku je Duchennova svalová dystrofie, dále následují v ne zcela jasném pořadí myotonická dystrofie 1, facioskapulohumerální svalová dystrofie 1 a svalové dystrofie ze skupiny kongenitálních svalových dystrofií a pletencových svalových dystrofií. Identifikace patogenních variant v asociovaných genech vede k výraznému posunu v chápání etiopatogeneze onemocnění, umožňuje predikci průběhu onemocnění a eventuálně i jeho cílenou léčbu.

Klíčová slova: svalové dystrofie, genetická diagnostika, sekvenace.

Molecular genetic diagnostics of childhood muscular dystrophies

Muscular dystrophies are rare diseases characterized by great clinical and genetic heterogeneity. The best known and most common muscular dystrophy of childhood is Duchenne muscular dystrophy, followed in a not entirely clear order by myotonic dystrophy 1, facioscapulohumeral muscular dystrophy 1 and muscular dystrophies from the group of congenital muscular dystrophies and limb-girdle muscular dystrophies. The identification of pathogenic variants in associated genes leads to a significant shift in understanding of the etiopathogenesis of disease, enables the prediction of the disease course of and possibly its targeted treatment.

Key words: muscular dystrophy, genetic diagnostics, sequencing.

Svalové dystrofie jsou geneticky podmíněná onemocnění vyznačující se progredující svalovou slabostí. Klinický průběh svalových dystrofií je velmi různorodý a zahrnuje svalové dystrofie s počátkem nástupu v dětském věku (spojené s významnou ztrátou svalové funkce ovlivňující schopnost pohybu, držení těla, srdeční a respirační funkce), stejně jako svalové dystrofie s pozdním nástupem (spojené s mírnou svalovou slabostí a únavou po námaze). Nejznámější a nejčastější svalovou dystrofií dětského věku je **Duchennova svalová dystrofie**, následuje v ne zcela jasném pořadí **myotonická dystrofie 1**, **facioskapulohumerální svalová dystrofie 1** a svalové dystrofie ze skupiny **kongenitálních svalových dystrofií** a **pletencových svalových dystrofií**. Do současné doby bylo identifikováno 74

genů asociovaných se svalovými dystrofiemi (www.musclechannel.fr).

Genetickou podstatou **Duchennovy svalové dystrofie** (DMD) jsou varianty v genu *DMD* (Xp21.2), který kóduje protein dystrofin. Ve svalových buňkách dystrofin spoluutváří glykoproteinový komplex (*DGC, dystrophin associated glycoprotein complex*), který spojuje buněčný cytoskelet s extracelulární matrix. Předpokládá se, že DGC působí jako stabilizátor svalové membrány během svalové kontrakce a dilatace a zprostředkovává i další funkce včetně buněčné signalizace (Rando, 2001). Dystrofinopatie mají velkou fenotypovou variabilitu, od těžkého fenotypu Duchennovy svalové dystrofie (DMD) po lehčí fenotyp Beckerovy svalové dystrofie (BMD). Odhadovaná prevalence DMD je

7,1/100 000 mužů, incidence BMD je odhadovaná na 19,8/100 000 živě narozených chlapců (Crisafulli et al., 2020).

Gen *DMD* je největším známým lidským genem (2 200 kb). Nejčastějšími patogenními variantami genu *DMD* jsou delece zahrnující jeden nebo více exonů (60 až 70% všech případů DMD, 80 až 85% případů BMD). Varianty malého rozsahu jsou zodpovědné za přibližně 26% případů DMD a 13% případů BMD. Rozsáhlé duplikace představují 10 až 15% všech případů DMD a 5 až 10% případů BMD (Gao et McNally, 2015). Obecně je DMD spojena s mutacemi, které mění čtecí rámec translace a způsobují vznik předčasného terminačního kodonu (PTC, *premature termination codon*). Transkripty nesoucí PTC stejně jako proteiny neobsahující karboxy-terminální konec jsou

většinou nestabilní a podléhají rychlé degradaci (Kurosaki et al., 2019). Naproti tomu pacienti s BMD mají obvykle varianty, které neruší čtecí rámec translace. Toto rozdělení ale nemusí vždy korelovat s nálezy na úrovni DNA. Jsou známy případy pacientů, u kterých byla identifikována mutace typu *nonsense* (varianta způsobující vznik PTC v místě mutace), a přesto jejich fenotyp odpovídá BMD. Analýza na úrovni mRNA genu *DMD* u těchto pacientů odhalila změnu sestřihu mRNA. Toto ovlivnění sestřihu je většinou způsobeno lokalizační genetické varianty v místě důležitém pro sestřih mRNA a výsledkem je tedy změna sestřihu vedoucí k vystřížení exonu, ve kterém je varianta lokalizovaná. Pokud delece vystříženého exonu neruší čtecí rámec translace, výsledkem je fenotyp BMD, kdy výsledný proteinový produkt je vnitřně zkrácen a exprimován většinou v nižších hladinách, než by odpovídalo standardu, ale přesto zůstává částečně funkční (Fajkusova et al., 2001).

Velkou výzvou související s interpretací genetických variant genu *DMD* jsou varianty typu *missense* (event. malé delece/duplikace/inzerce neovlivňující čtecí rámec translace). Stanovení jejich patogenity je často proces zahrnující funkční analýzy. V databázi *Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) je v současné době popsáno 105 patogenních *missense* mutací. Ne ale u všech těchto variant byl kladen dostatečný důraz na potvrzení jejich patogenity. Na druhou stranu řada prací patogenní efekt analyzuje velmi systematicky a důkladně s využitím exprese mutantních proteinů a analýzy jejich stability, lokalizace a vazby s dalšími proteiny. Prezentované výsledky ukazují, že patogenní *missense* varianty v genu *DMD* mohou způsobovat *protein misfolding*, v jehož důsledku dochází ke snížené stabilitě a zvýšené degradaci proteinu (Talsness et al., 2015). Kromě těchto efektů byly popsány i patogenní *missense* varianty ovlivňující vazbu dystrofinu s vazebnými partnery při tvorbě DGC (Vulin et al., 2014).

Myotonická dystrofie 1 (DM1) je autosómně dominantní onemocnění způsobené expanzí repetice CTG v 3' nepřekládané oblasti genu *DMPK* (19q13.32). RNA genu *DMPK* obsahující takovou expanzi je zadržovaná v jádře a abnormálně interaguje s proteiny vážícími se k RNA, což má za následek řadu defektů

souvisejících dominantně se sestřihem mRNA (Batra et al., 2014). Dochází k narušení řady klíčových buněčných funkcí a ve výsledku ke složitému multiorgánovému fenotypu DM1.

Na základě věku nástupu onemocnění a jeho závažnosti je možné rozlišit DM1 kongenitální, s nástupem v dětství, juvenilní, s nástupem v dospělosti a s nástupem v pozdní dospělosti. Odhadovaná prevalence DM1 ve všech věkových skupinách je 8,26/100 000 a u dětí 1,41/100 000 (Mah et al., 2016). Alely genu *DMPK* spojené s manifestací onemocnění mají 50 a více repetice CTG. Jedinci s 50 až 150 repeticemi mají obvykle pozdější nástup onemocnění, zatímco jedinci s více než 1 000 repetice mají závažnější průběh onemocnění spojený s nástupem v dětském věku, event. kongenitální DM1. Toto pravidlo, ale neplatí bez výjimky a jsou popisováni pacienti s nástupem onemocnění v dospělosti a expanzí přesahujícími 1000 CTG, stejně jako pacienti s kongenitální DM1 a kratšími expanzí repetice CTG (Lanni et Pearson, 2019). Standardní počet repetice CTG v genu *DMPK* je méně než 37, jedinci s 35 až 49 repeticemi CTG jsou považováni za asymptomatické nosiče premutace. Expandovaná repetice je geneticky nestabilní a má tendenci dále expandovat v zárodečných buňkách, což vede ke snížení věku nástupu onemocnění a jeho závažnějšímu průběhu v další generaci (tzv. *anticipace*). V dřívějších studiích bylo popisováno téměř výlučné spojení kongenitální DM1 s maternálním přenosem expandované alely. Nedávná studie 314 dětských pacientů s DM1 (55 % s kongenitální formou) ale ukázala paternální přenos expandované alely v 13 % studovaných případů (Laguer et al., 2019). Repetice CTG může rovněž expandovat během života pacienta v somatických tkáních a podílet se tak na progresi onemocnění (Monckton et al., 1995).

Facioscapulohumerální dystrofie (FSHD) je autosómně dominantní onemocnění s různým věkem nástupu a závažnosti. FSHD je způsobená chromatinovými změnami v oblasti repetice D4Z4 na chromozomu 4 a následnou derepresí genu *DUX4*, který je kódován těmito repeticemi. Funkční kopie genu *DUX4* je přítomna pouze na chromozomu typu 4qA (Lemmers et al., 2002). Rozlišujeme dvě genetické formy FSHD1 (95 %) a FSHD2.

U pacientů s FSHD1 dochází ke snížení počtu D4Z4 repetice na 1–10 jednotek na 4qA alele, zatímco běžně v populaci je přítomno 8–100 jednotek. FSHD2 je důsledkem přítomnosti 4qA alely a patogenní varianty v genu působící jako chromatinový modifikátor (zejména gen *SMCHD1*) (Lemmers et al., 2012).

Věk nástupu FSHD1 bývá většinou ve druhé až třetí dekádě života, u cca 10 % pacientů se ale onemocnění začne projevovat již v dětství. Odhadovaná prevalence FSHD ve všech věkových skupinách je 3,95/100 000 a u dětí byla stanovena na 0,29/100 000 (Mah et al., 2016). V literatuře je FSHD s časným nástupem často popisována jako závažný subtyp FSHD spojený s těžkou svalovou slabostí, častými systémovými komplikacemi a jednou až třemi repeticemi D4Z4. Tato pozorování vznikla ale zřejmě na základě publikovaných kazuistik jednotlivých pacientů. Studie, která se systematicky zabývala výskytem FSHD v dětství (sledováno 28 pacientů ve věku 2 až 17 let, průměrný věk při vyšetření 11,5 roku, průměrný věk nástupu onemocnění 6,7 roku), ukázala, že u dětí je místo velmi závažného fenotypu pozorováno celé spektrum klasických klinických projevů FSHD (Goselink et al., 2018). Genetické nálezy v publikované kohortě dětských pacientů byly podobné genetickým nálezům u dospělé populace: průměrný počet repetice D4Z4 byl 5,3 (oproti 5,8 repeticím D4Z4 u dospělých pacientů s FSHD) a frekvence FSHD2 byla 3,7 % (oproti 5 % u dospělých pacientů). Pokud byla odděleně analyzována skupina 9 pacientů splňujících kritéria pro tzv. *early-onset* FSHD (známky slabosti svalů obličeje před 5. rokem věku a ramenního pletence před 10. rokem věku) průměrný počet repetice byl 3,9. Uvedená studie stanovila prevalenci FSHD v dětství na 1/100 000. FSHD je tedy relativně častá svalová dystrofie dětského věku a je třeba s ní počítat i v diferenciální diagnostice zahrnující kongenitální myopatie a kongenitální myastenické syndromy.

Kongenitální svalové dystrofie se vyznačují časným nástupem onemocnění (do 6. měsíce věku) a mezi nejznámější zástupce patří svalové dystrofie s úplným nebo částečným deficitem merosinu (gen *LAMA2*) a svalové dystrofie spojené s kolagenem 6 (gen *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*). Uvedené geny kódují proteiny spojující extracelulární matri

s plazmatickou membránou svalových buněk. Dědičnost patogenních variant genu *LAMA2* je recesivní, v případě genů *COL6A1-3* je popisována dědičnost dominantní i recesivní. Další podskupinou jsou kongenitální svalové dystrofie spojené s defektem glykosylace alfa-dystroglykanu (gen *FKRP*, *POMT1*, *POMT2* a další). Celkem bylo identifikováno 36 genů asociovaných s fenotypem kongenitální svalové dystrofie (www.musclegenetable.fr). Řada těchto genů může způsobovat alelická onemocnění spojená s jinými typy svalových dystrofií (Thompson et Straub, 2016). Příkladem jsou patogenní varianty v genech spojených s glykosylací alfa-dystroglykanu, které kromě závažných fenotypů kongenitální svalové dystrofie mohou způsobovat i relativně mírnější fenotypy pletencové svalové dystrofie (Endo, 2015). Odhadovaná prevalence kongenitální svalové dystrofie ve všech věkových skupinách je 0,99/100 000, u dětí je toto číslo 0,82/100 000 (Mah et al., 2016).

Pletencové svalové dystrofie (Limb-Girdle Muscular Dystrophies, LGMD) jsou čtvrtou nejčastější svalovou dystrofií. Asi 10 % LGMD má dominantní typ dědičnosti a 90 % LGMD recesivní typ dědičnosti (Angelini et al., 2018). Doposud bylo identifikováno 29 genů asociovaných s LGMD, které rozdělují LGMD do 29 subtypů (Straub et al., 2018). Jednotlivé subtypy LGMD jsou variabilní ve věku nástupu onemocnění, rychlosti progresu a celkové závažnosti onemocnění, variabilita klinických projevů se ale vyskytuje i v rámci jednoho subtypu. Odhadovaná prevalence všech subtypů LGMD je 1,63/100 000. U dětí je odhadovaná prevalence LGMD 0,48/100 000 (Mah et al., 2016). Jednotlivé subtypy LGMD nesdílejí společný patofyziologický mechanismus onemocnění, který by je odlišoval od jiných forem svalových dystrofií. Právě naopak LGMD jsou asociovány s geny, jejichž proteinové produkty mají různou funkci a buněčnou lokalizaci (Liewluck et Milone, 2018).

Molekulárně genetická diagnostika

Základním metodickým přístupem v molekulárně genetické diagnostice svalových dystrofií je masivní paralelní sekvenace (MPS) souboru genů event. celého exomu (WES, *whole-exome sequencing*) spojená

s bioinformatickou analýzou sekvenčních dat. Výsledkem MPS je identifikace velkého množství sekvenčních variant (odchylek od referenční sekvence), které je třeba vyhodnotit z pohledu jejich závažnosti (patogenity). V současné době většina laboratoří vychází při interpretaci sekvenčních variant z doporučení vydaných *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Toto ACMG doporučení rozděluje sekvenční varianty do pěti kategorií: (a) patogenní, (b) pravděpodobně patogenní, (c) nejasného významu, (d) pravděpodobně benigní a (e) benigní (Richards et al., 2015).

Techniky MPS (často je používán i termín sekvenování nové generace) umožňují identifikovat patogenní varianty u 35 až 50 % pacientů s podezřením na monogenní onemocnění. Navzdory těmto pokrokům zůstává velké procento pacientů bez genetické diagnózy. Tento stav má několik možných vysvětlení, mezi ty nejčastěji zmiňované patří (1) problematika interpretace variant nejasného významu; (2) skutečnost, že techniky MPS nezachytí strukturní změny chromozomů, expanze/delece repetitivních sekvencí, dále může být problematické identifikovat varianty v repetitivních oblastech genů nebo v genech s výskytem pseudogenu; a (3) skutečnost, že panel genů nebo WES dostatečně nezachytí varianty v intronech a regulačních oblastech genů. Tyto varianty je možné identifikovat sekvenací na úrovni celého genomu (WGS, *whole-genome sequencing*), zde pak ale zase nastává velký problém související s funkční interpretací variant.

Na základě literárních dat je možné odhadnout, že 9 až 30 % variant způsobujících onemocnění ovlivňuje expresi a/nebo zpracování RNA a nachází se v nekódujících oblastech, které nejsou standardně analyzovány MPS na úrovni souboru genů nebo exomu. Ideální pro identifikaci těchto variant je masivní paralelní sekvenace RNA (RNA-seq). Je popsáno mnoho studií, které díky aplikaci RNA-seq podstatně rozšířily množství pacientů s potvrzenou genetickou diagnózou. Příkladem může být studie, která se zaměřila na aplikaci sekvenace RNA ve skupině 25 pacientů s předpokládaným monogenním neuromuskulárním onemocněním (Gonorazky et al., 2019). U těchto pacientů byla provedena MPS

rozsáhlého souboru genů a/nebo WES, patogenní varianty způsobující onemocnění ale nebyly identifikovány. Po provedení RNA-seq se podařilo najít patogenní varianty u 9 z nich. Molekulární patofyziologie identifikovaných variant zahrnovala potlačení transkripce, přeskočení exonu nebo inkluzi intronu při sestřihu mRNA. Jistou nevýhodou tohoto diagnostického přístupu je nárok na použití zdrojového materiálu pro analýzu, který musí být relevantní pro danou chorobu. V případě NMD se tedy bude jednat o svalovou tkáň, event. je možno použít kožní fibroblasty, které je ale nutno pro analýzu diferencovat na t-myotuby (Gonorazky et al., 2019).

Techniky MPS není ale možné aplikovat v případě myotonické dystrofie a facioskapulohumerální svalové dystrofie 1, tedy u onemocnění spojených s expanzí/deleci repetitivní sekvence. Základním metodickým přístupem v molekulárně genetické diagnostice DM1 je *repeat primed* PCR (RP-PCR). Tato metoda však není schopna prokázat rozsah počtu opakování nad určitý práh. K tomuto účelu je nutno použít Southern blot a hybridizaci. Molekulárně genetická diagnostika FSHD1 je založena na Southern blotu a hybridizaci, navíc je komplikována potřebou rozlišit alelické varianty 4qA a 4qB (FSHD1 je spojena pouze s alelou 4qA), přítomností téměř identických repetitivních sekvencí D4Z4 na chromozomu 10q a požadavkem na kvalitní vysokomolekulární DNA (Lemmers et al., 2002).

Závěr

V případě svalových dystrofií diagnostický algoritmus historicky zahrnoval svalovou biopsii, imunohistochemickou analýzu svalových proteinů, event. zobrazení svalu magnetickou rezonancí a cílené genetické testování jednotlivých genů. Techniky masivní paralelní sekvenace dramaticky zlepšují diagnostický výtěžek a navyšují procento pacientů s potvrzenou genetickou diagnózou. Identifikace patogenních variant v asociovaných genech vede k výraznému posunu v chápání etiopatogeneze onemocnění, umožňuje predikci průběhu onemocnění, event. jeho cílenou léčbu, která může být specifická pro jednotlivé typy NMD nebo dokonce pro jednotlivé typy patogenních sekvenčních variant.

LITERATURA

1. Angelini CL, Marozzo G, Marozzo R. An update on diagnostic options and considerations in limb-girdle dystrophies. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(9):693-703.
2. Batra R, Charizanis K, Manchanda M, et al. Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell.* 2014;56(2):311-322.
3. Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):141.
4. Endo T. Glycobiology of alpha-dystroglycan and muscular dystrophy. *J Biochem.* 2015;157(1):1-12.
5. Fajkusova L, Lukas Z, Tvrdikova M, et al. Novel dystrophin mutations revealed by analysis of dystrophin mRNA: alternative splicing suppresses the phenotypic effect of a nonsense mutation. *Neuromuscul Disord.* 2001;11(2):133-138.
6. Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1223-1239.
7. Gonorazky HD, Naumenko S, Ramani AK, et al. Expanding the Boundaries of RNA Sequencing as a Diagnostic Tool for Rare Mendelian Disease. *Am J Hum Genet.* 2019;104(3):466-483.
8. Goselink RJM, Schreuder THA, van Alfen N, et al. Facioscapulohumeral Dystrophy in Childhood: A Nationwide Natural History Study. *Ann Neurol.* 2018;84(5):627-637.
9. Kurosaki T, Popp MW, Maquat LE. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(7):406-420.
10. Lagrue E, Dogan C, De Antonio M. A large multicenter study of pediatric myotonic dystrophy type 1 for evidence-based management. *Neurology* 2019;92(8):e852-e865.
11. Lanni S, Pearson CE. Molecular genetics of congenital myotonic dystrophy. *Neurobiol Dis.* 2019;132:104533.
12. Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet.* 2002;32(2):235-236.
13. Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, et al. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet.* 2012;44(12):1370-1374.
14. Liewluck T, Milone M. Untangling the complexity of limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 2018;58(2):167-177.
15. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, et al. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(1):163-177.
16. Monckton DG, Wong LJ, Ashizawa T, et al. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet.* 1995;4(1):1-8.
17. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 2001;24(12): 1575-1594.
18. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2018;17(5):405-424.
19. Straub V, Murphy A, Udd B, et al. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(8):702-710.
20. Talsness DM, Belanto JJ, Ervasti JM. Disease-proportional proteasomal degradation of missense dystrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(40):12414-12419.
21. Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies – international collaborations for translational research. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(5):294-309.
22. Vulin A, Wein N, Strandjord DM, et al. The ZZ domain of dystrophin in DMD: making sense of missense mutations. *Hum Mutat.* 2014;35(2):257-264.