

Рецессивная скапулоперонеальная спинальная мышечная атрофия как аллельный вариант болезни Кугельберга—Веландер

ШАГИНА И.А., ДАДАЛИ Е.Л., МАЛЬМБЕРГ С.А., ПОЛЯКОВ А.В., ЕВГРАФОВ О.В.

ГУ Медико-Генетический Научный Центр 115478, Москва, ул. Москворечье, 1.

Скапулоперонеальная спинальная мышечная атрофия (СПСМА) представляет собой клинически полиморфную группу заболеваний, в основе которых лежит поражение клеток передних рогов спинного мозга. Клинические симптомы СПСМА сходны со спинальной мышечной атрофией III типа (СМА III, или болезнь Кугельберга—Веландер). Основное различие СПСМА и СМА заключается в локализации мышечного поражения, затрагивающего при СПСМА в первую очередь перонеальную группу мышц. Описаны аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и X-сцепленный типы наследования. Одна из доминантных форм заболевания картирована в локусе 12q24. Гены рецессивной и X-сцепленной форм до сих пор не локализованы. Мы исследовали трех неродственных пациентов с диагнозом СПСМА с целью поиска делеций в локусе SMN. У одного пациента была обнаружена делеция экзона 7 гена SMN1 в гомозиготном состоянии, хотя экзон 8 присутствовал. У второго пациента отсутствовала последовательность экзонов 7 и 8 гена SMN1. У третьего пациента было зарегистрировано соотношение интенсивности полос, специфичных для экзонов 7 и 8 генов SMN2 и SMN1, характерное для гетерозиготного носительства делеции гена SMN1. Таким образом, принимая во внимание клиническое сходство СПСМА и СМА I-III и полученные нами результаты, можно сделать вывод, что ген SMN1 вовлечен также и в развитие аутосомно-рецессивных СПСМА.

Введение

Скапулоперонеальная спинальная мышечная атрофия (СПСМА) — генетически гетерогенная группа редких моногенных болезней нервной системы, обусловленных прогрессирующей дегенерацией мотонейронов передних рогов спинного мозга. Особенностью этого варианта СМА является преимущественное поражение мышц перонеальной группы и плечевого пояса. Наиболее часто встречается СПСМА Старка, с аутосомно-доминантным типом наследования, впервые описанная этим исследователем в 1958 г. и подробно изученная Кайзером в 1964 г. [6]. Наряду с этим в литературе имеются единичные описания семей с двумя сибсами, имеющими типичные клинические проявления СПСМА, что дает основание предполагать существование аутосомно-рецессивного типа наследования заболевания [3]. Особенностью этого варианта является ранний возраст начала и быстрое прогрессирование процесса, приводящее к ранней инвалидизации больных. Описан также и X-сцепленный рецессивный вариант СПСМА, манифестирующий в детском возрасте и протекающий с выраженными нарушениями сердечной проводимости [13].

Одна из доминантных форм заболевания картирована в локусе 12q24 [5]. Гены, ответственные за возникновение других форм СПСМА, до сих пор не локализованы. Это обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на идентификацию генов, ответственных за

СПСМА. Естественно, что в качестве первого этапа этих исследований может быть поиск мутаций в уже идентифицированных генах других вариантов СМА, особенно тех, которые имеют сходство клинических проявлений и типа наследования.

Клинические проявления аутосомно-рецессивных вариантов СПСМА сходны с таковыми при проксимальной СМА Кугельберга—Веландер (СМА III типа) как по возрасту начала, так и характеру симптомов. Основное различие СПСМА и СМА III типа заключается в преимущественной локализации мышечного поражения: при СПСМА мышечная слабость захватывает в первую очередь перонеальную группу мышц нижних конечностей, а при СМА III — мышцы тазового пояса. Известно, что ген СМА III с аутосомно-рецессивным типом наследования картирован на длинном плече хромосомы 5 в районе 5q13 [4, 9, 10]. Этот регион содержит инвертированный повтор, в котором обнаружено по крайней мере 4 гена, представленных теломерной и центромерной копиями: SMN [7], NAIP [11], BTFR44 [1] и H4F5 [12]. У большей части пациентов с диагнозом СМА I-III (94—98%) [15] регистрируется делеция теломерной копии гена SMN1, затрагивающая в ряде случаев ген NAIP. Делеции центромерной копии гена SMN2, в свою очередь, регистрируются у 5% здоровых людей [7]. Наличие точечных мутаций в гене SMN1, обнаруживаемых у пациентов с СМА I-III, свидетельствует в пользу гена SMN1 как СМА-детерминирующего гена. Гены SMN1 и SMN2 отличаются пятью нуклеотидными

заменами: 3 из них находятся в интронах, одна — в экзоне 7 (не приводит к замене аминокислоты), одна — в экзоне 8 (в 3'-нетранслируемой области). По-видимому, только изменение в экзоне 7 имеет функциональную значимость и приводит в результате альтернативного сплайсинга к синтезу укороченного белкового продукта [8].

Учитывая сходство клинических проявлений и патоморфологии СМА I-III и СПСМА, мы выдвинули гипотезу о возможном вовлечении гена SMN1 в развитие СПСМА. Данная работа посвящена исследованию пациентов со спорадическими случаями СПСМА (наиболее вероятно с рецессивной формой) на наличие делеции в экзонах 7–8 гена SMN.

Материалы и методы

Работа выполнена на образцах ДНК, полученных стандартным методом из лимфоцитов периферической крови больных СПСМА.

Регистрация делеций экзонов 7–8 генов SMN1, SMN2 проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией с использованием эндонуклеаз *Bse* NI и *Eco* RV.

Полимеразную цепную реакцию проводили на программируемом термоциклере MC2 производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы *Biotaq* («БиоМастер»). ПЦР проводили по следующей схеме: 0,1–1 мкг геномной ДНК; 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата помещали в 25 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 67 mM Tris-HCl; pH 8,8; 16,6 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween-20; 6 mM MgCl₂; 1,5 единицы термофильной ДНК-полимеразы, 20–30 мкл минерального масла.

Для амплификации фрагментов генов SMN1 и SMN2: праймеры для экзона 7 — F 5'-AAAGCTATCTATATAGCTATCG*AT-3'; R5'-TCACCTTTCATAATGCTGGCAGAC-3' и для экзона 8 праймеры, описанные Lefebvre et al., — F 5'-GTAATAACCAATGCAATGTGAA-3'; R 5'-CTACAACCCCTTCTCACAGG-3' [7], использовали следующие условия ПЦР: первоначальная денатурация 95°C — 5 мин, 28 циклов амплификации: 94°C — 45 с, 55°C (57°C) — 45 с, 72°C — 45 с. Заключительная элонгация 72°C — 7 мин. Размер ПЦР-продукта — 152 п.н. для экзона 7 и 188 п.н. для экзона 8.

Рестрикцию амплификационных фрагментов экзонов 7 и 8 генов SMN1 и SMN2 проводили с использованием эндонуклеаз *Eco*RV и *Bse*NI соответственно (производства НПО Fermentas), реакцию проводили, согласно протоколу фирмы-производителя. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов оценивали в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Количественную оценку гетерозиготного носительства делеции экзонов 7–8 гена SMN1 осуществ-

ляли с помощью *Imagin* станции GEL DOC 2000 и пакета программ QUANTITY ONE® (BioRad).

Результаты и их обсуждение

Данные клинического обследования

В результате проведения медико-генетического консультирования в научно-консультативном отделе МГНЦ РАМН среди 392 семей с диагнозом СМА выявлено 3 неродственных пациента со СПСМА.

Пациент А. — девочка 14 лет, первый ребенок здоровых родителей, не связанных кровным родством. Ранний анамнез не отягощен. Первые признаки заболевания обнаружены в 3-летнем возрасте в виде слабости перонеальных мышц, что проявлялось изменением походки в виде степпажа, трудностью ходьбы на пятках. Спустя несколько месяцев к указанным симптомам присоединилась слабость мышц плечевого пояса. При обследовании ребенка в возрасте 14 лет выявлены атрофия и слабость мышц голени, тазового и плечевого поясов, снижение сухожильных рефлексов с рук и ног, фасцикуляции мышц плечевого пояса, тремор пальцев вытянутых рук. Лицевая мускулатура, глазодвигательные мышцы и мускулатура шеи были интактными. Чувствительных нарушений выявлено не было. Интеллект больной соответствовал возрасту. При проведении электромиографического исследования выявлено наличие потенциалов фасцикуляций во всех исследованных мышцах при неизменных амплитудах М ответов и показателей скоростей проведения нервного импульса по периферическим нервам.

Пациент В. — 23-летняя женщина, единственный ребенок здоровых родителей. Семейный анамнез не отягощен. Первые признаки заболевания выявлены в 5-летнем возрасте и выражались в слабости сгибательной мускулатуры голени. В возрасте 7 лет — слабость мышц плечевого и тазового поясов конечностей. В 10 лет наблюдался тремор рук. В возрасте 23 лет симптомы заболевания включали атрофию и слабость мышц плечевого, тазового поясов и мышц ног, замечены трудности при подъеме по лестнице. Сухожильные рефлексы отсутствовали. Отмечались фасцикуляции, тремор рук, при этом бульбарных, чувствительных и мозжечковых нарушений не наблюдалось. Интеллект в норме. Электромиографическое исследование показало наличие регулярных, спонтанных фибрилляций с нормальной скоростью проведения нервного импульса.

Пациент С. — юноша 18 лет. Имеет здоровую сестру. Семейный анамнез не отягощен. Первые симптомы замечены в возрасте 3 лет и выражались в ритмичном треморе вытянутых рук. В 10 лет отмечалась атрофия икроножных мышц, сопровождающаяся симптомом «висячей стопы». В возрасте 18 лет на момент обследования отмечена слабость проксимальных и дистальных мышц конечностей, плечевого пояса, мышц лица, тремор пальцев рук, некоторые признаки мозжечковой атаксии. Рефлексы

отсутствовали. Нарушений чувствительности и интеллекта не наблюдалось. Ходил самостоятельно, водил машину. Электромиографическое исследование показало регулярные спонтанные единицы активности при исследовании мышц ног и туловища. Скорость проведения нервного импульса по *nervus medianus* была нормальной.

Таким образом, спектр и характер клинических симптомов у наблюдаемых нами больных, особенно в период развернутой стадии заболевания, сходен с таковыми при СМА III. Для отнесения наблюдаемых больных к одному из вариантов СПСМА мы использовали следующие критерии.

1. Начальные признаки атрофического процесса при СПСМА — мышечная слабость перонеальной группы мышц, что клинически проявляется изменением походки по типу степпажа, симптомом “висячей стопы”. В случае СМА III, в первую очередь поражаются мышцы тазового пояса, т.е. в патологический процесс сначала вовлекаются проксимальные, а затем, по мере прогрессирования заболевания, у части больных могут поражаться дистальные группы мышц конечностей. Клинические признаки СПСМА в начальной стадии заболевания подобны наследственной мотосенсорной нейропатии (НМСН), однако отсутствие нарушения чувствительности, характерного для поражения периферических нервов, позволяет отличить СПСМА и НМСН. Ведущими в дифференциальной диагностике этих форм являются данные ЭМГ-исследования, обнаруживающие наличие потенциалов фасцикуляции во всех группах мышц у больных с СПСМА.

2. Лопаточные мышцы при СПСМА вовлекаются в патологический процесс одновременно с перонеальными.

3. У пациентов с СПСМА, в отличие от пациентов с СМА III, не наблюдается деформаций грудной клетки и позвоночника, а также выраженных контртур суставов.

Результаты молекулярно-генетического обследования больных

Нами проведен поиск делеции экзонов 7 и 8 гена SMN у трех больных с клиническими проявлениями СПСМА.

В результате молекулярно-генетического исследования у пациента А. была обнаружена делеция экзона 7 гена SMN1 в гомозиготном состоянии, хотя экзон 8 присутствовал (рис. 1). При этом соотношение интенсивности SMN2:SMN1 специфичных полос составляло 1,97, что соответствует наличию делеции экзона 8 гена SMN1 в гетерозиготном состоянии. Данный генотип встречается у пациентов с СМА I-III и никогда не был описан у здоровых людей [7, 15].

У пациента В. отсутствовала последовательность экзонов 7 и 8 гена SMN1. Данная мутация наблюдается у большинства больных с диагнозом СМА I-III.

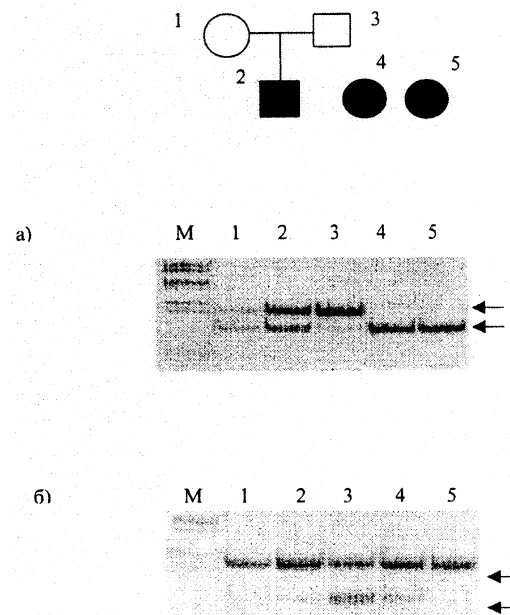


Рис. 1. Электрофореграмма рестриционного анализа экзонов 7, 8 генов SMN1, SMN2 образцов ДНК пациентов А, В, С с диагнозом СПСМА:

а) регистрация делеции экзона 7 генов SMN1, SMN2;

б) регистрация делеции экзона 8 генов SMN1, SMN2.

М — маркер молекулярного веса λ /PstI, дорожка 2 — образец ДНК пациента С, дорожки 1, 3 — образцы ДНК родителей пациента С, дорожка 4 — образец ДНК пациента А, дорожка 5 — образец ДНК пациента В

У пациента С. было зарегистрировано соотношение интенсивности полос, специфичных для экзонов 7 и 8 генов SMN2 и SMN1, характерное для гетерозиготного носительства делеции гена SMN1 (1,99 и 2,01 соответственно). Такой генотип присутствует у небольшой части пациентов с СМА I-III, а также у здоровых носителей делеции гена SMN1. В результате анализа ДНК членов семьи больного такая же картина была обнаружена у матери пациента, у отца было зарегистрировано соотношение интенсивности полос, соответствующих генам SMN1 и SMN2, для экзонов 7 и 8 равное (1,03 и 1,17), что характерно для нормального контроля.

Таким образом, в пяти из шести исследованных хромосом была обнаружена делеция 7 экзона гена SMN1, что наблюдается в 96—98% СМА-хромосом [15]. Принимая во внимание клиническое сходство СПСМА и СМА I-III и полученные нами результаты, можно сделать вывод, что ген SMN1 ответственен и за развитие СПСМА с аутомно-рецессивным типом наследования и об отсутствии нозологической самостоятельности этой формы заболевания. Более генерализованный характер поражения мышечных групп при СПСМА, а также начало болезни с поражения перонеальных мышц могут быть рассмотрены как более широкий клинический полиморфизм СМА III.

Фенотипические различия данных форм могут быть обусловлены различиями мутаций (например, размер или расположение точек разрыва делеций)

в одной или обеих поврежденных хромосомах. Кроме того, нельзя исключить вовлечения в процесс генов-модификаторов и влияния других, пока неизвестных факторов, таких, как NAIP, или других, еще не известных. В формировании определенного клинического фенотипа могут принимать участие и факторы окружающей среды.

Список литературы

1. Carter T.A., Bonnemann C.G., Wang C.H. et al. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to region and demonstrates SMA associated deletions // Hum. Mol. Genet. — 1997. — Vol. 6. — P. 229—236.
2. Emery A.E.H. The nosology of spinal muscular atrophies // J. Med. Genet. — 1971. — Vol. 8. — P. 481—495.
3. Feigenbaum J., Munsat T.L. A nevrromuscular syndrome of scapuloperoneal distribution // Bull Los Ang. Neurol. Soc. — 1970. — Vol. 35. — P. 47—57.
4. Gilliam T.C., Brzustowicz L.M., Castella L.H. et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy // Nature. — 1990. — Vol. 345. — P. 823—825.
5. Isozumi K., De Long R., Kaplan J. et al. Linkage of scapuloperoneal spinal muscular atrophy to chromosome 12q24.1-q24.31 // Hum. Mol. Genet. — 1996. — Vol. 5. — P. 1377—1382.
6. Kaeser H.E. Die familiare scapuloperoneale muskeltrophie // Dt. Z. nervenheilk. — 1964. — Vol. 186. — P. 379—394.
7. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene // Cell. — 1995. — Vol. 80. — P. 155—165.
8. Lorson C.L. et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96 (11). — P. 6307—6311.
9. Melki J., Abdelhak S., Sheth P. et al. Gene for proximal spinal muscular atrophy to chromosome 5 q // Nature. — 1990a. — Vol. 344. — P. 767—768.
10. Melki J., Sheth P., Abdelhak S. et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophies maps to chromosome 5 q 12-q14. // Lancet. — 1990b. — Vol. 336. — P. 271—273.
11. Roy N., Mahadwan M.S., Mc Lean M. et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy // Cell. — 1995. — Vol. 80. — P. 167—178.
12. Scharf J.M., Endrizzi M.G., Wetter A. et al. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics // Nature Genet. — 1998. — Vol. 20. — P. 83—86.
13. Skre H. et al. Unusual type of neural muscular atrophy with a possible X-chromosomal inheritance pattern // Acta. Neurol. Scand. — 1978. — Vol. 58. — P. 249—260.
14. Pearn J.H. Classification of spinal muscular atrophies // Lancet. — 1980. — P. 919—922.
15. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) // Hum. Mutation. — 2000. — Vol. 15. — P. 228—237.

RECESSIVE SCAPULOPERONEAL SPINAL MUSCULAR ATROPHY

SHAGINA I.A., DADALI E.L., MALMBERG S.A., POLYAKOV A.V., EVGRAPHOV O.V.

Research Centre for Medical Genetics RAMN,
Moskvorechye str., 1, 115478 Moscow, Russia

Scapuloperoneal spinal muscular atrophy (SPSMA) comprises a group of clinically heterogeneous disorders caused by defects of anterior horn cells. It is similar to spinal muscular atrophy (SMA) in many aspects but starts from weakness of scapuloperoneal muscle. Autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked recessive forms have been described. One of dominant forms of SPSMA has been assigned to 12q24. Recessive and X-linked forms have not been assigned yet. We investigated 3 unrelated patients with sporadic SPSMA (most probably recessive form) for deletions in the SMN locus. One patient was shown to have a homozygous deletion in exon 7 of the SMN1 gene, although exon 8 was present. Another patient lacked both exons 7 and 8 of the SMN1 gene. The third patient revealed a decreased ratio of SMN1 to SMN2-specific bands, which is most probably explained by a deletion of SMN1 in a chromosome. Taking into account a strong association between SMN1 gene mutations and both SMA and SPSMA, and the phenotypic similarities between the two disorders, it could be concluded that SMA locus is also responsible for SPSMA phenotype in families with autosomal recessive inheritance.