

## Doporučení Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP

### Molekulárně genetická diagnostika SMA

(19/9/2020)

**Spinální svalová atrofie (SMA)** je autosomálně recesivní neuromuskulární onemocnění asociované s genem *SMN1*<sup>1</sup>. Onemocnění je charakterizované progresivní symetrickou svalovou slabostí a atrofií. SMA je dle klinické závažnosti rozdělena do čtyř typů – typ I (OMIM# 253300), typ II (OMIM# 253550), typ III (OMIM# 253400) a typ IV (OMIM# 271150). Gen *SMN1* (OMIM# 600354) a jeho téměř identická kopie gen *SMN2* (OMIM# 601627) jsou lokalizovány na chromosomu 5q13.2. Kódující sekvence obou genů se liší jednou nukleotidovou záměnou lokalizovanou v exonu 7, která nemění kódovanou aminokyselinu, ale modifikuje sestřih mRNA – gen *SMN2* produkuje převážně transkript s delecí exonu 7, jehož translaci vzniká nestabilní a nefunkční protein. Kromě transkriptu obsahujícího delecí exonu 7 produkuje gen *SMN2* i malé množství transkriptu o plné délce a tedy malé množství funkčního proteinu SMN<sup>2</sup>. Mnoho studií prokázalo, že počet kopií genu *SMN2* mění závažnost onemocnění (pacienti s více kopiemi *SMN2* mají mírnějšími fenotypy SMA)<sup>3</sup>.

Celkem 95% pacientů s SMA má homozygotní delecí exonu 7 genu *SMN1*. Zbývajících 5% pacientů představuje heterozygoty nesoucí delecí exonu 7 na jednom chromosomu a patogenní variantu jiného typu na druhém chromozomu<sup>4</sup>.

Odhadovaná incidence SMA: 1/10 000

Odhadovaná frekvence výskytu přenašečů SMA v evropských populacích je přibližně 1/37 jedinců.

Molekulárně genetická diagnostika SMA je nejčastěji prováděna metodou **MLPA (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification)**. Molekulárně genetická diagnostika SMA má svůj kód výkonu ve Stratifikaci odbornosti 816 (<https://www.vzp.cz/poskytovatele/informace-pro-praxi/vykazovani-a-uh rady/informace-pro-poskytovatele-hrazenych-sluzeb-v-odbornosti-816-laborator-lekarske-genetiky>) – výkon 94970.

Molekulárně genetickou diagnostiku SMA musí mít provádějící zdravotnická laboratoř akreditovanou dle ČSN EN ISO 15 189:2013 dle ustanovení §28-29 zákona 373/2011 Sb.

**Princip MLPA:** MLPA je založena na amplifikaci sond, z nichž každá detekuje specifickou sekvenci DNA. MLPA sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů, které hybridizují k sousedícím cílovým sekvencím DNA a následně jsou spojeny ligací. Všechny ligované sondy jsou současně amplifikovány s použitím stejného páru primerů. Jeden z primerů je fluorescenčně značený, což umožňuje vizualizaci jednotlivých produktů PCR kapilární elektroforézou. Obecně je MLPA složena z následujících kroků: (1) denaturace vzorku DNA, (2) hybridizace sond k denaturovanému vzorku DNA, (3) ligace hybridizovaných sond, (4) amplifikace ligovaných sond, (5) separace produktů PCR kapilární elektroforézou, (6) analýza výsledků pomocí software. **Výsledky MLPA určují relativní počet kopií cílové sekvence v testovaném vzorku DNA vzhledem k referenčním DNA.**

**V současné době jsou k dispozici dvě MLPA diagnostické soupravy pro identifikaci počtu kopií genu *SMN1* a *SMN2*, které mají prohlášení o shodě CE-IVD – SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier**

a **SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA** ([www.MRC-Holland.com](http://www.MRC-Holland.com)) a tyto by měly být používány i v rámci České republiky.

**SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier** je CE-IVD diagnostická souprava pro detekci počtu kopií exonu 7 a 8 genu *SMN1* za účelem stanovení přenašečství SMA a diagnózy SMA. Tuto soupravu lze také použít pro detekci počtu kopií exonu 7 a 8 genu *SMN2*, jako interpretační pomůcky při stanovení počtu kopií genu *SMN1*. Kit obsahuje 21 MLPA sond – 2 sondy specifické pro exon 7 nebo exon 8 genu *SMN1*, 2 sondy specifické pro exon 7 nebo 8 genu *SMN2* a 17 referenčních sond, které detekují sekvence mimo geny *SMN1/SMN2*. <https://www.mrcholland.com/product/P060/1056>

**SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA** je CE-IVD diagnostická souprava pro detekci počtu kopií genu *SMN1* za účelem stanovení diagnózy SMA a přenašečství SMA. Tato souprava může být použita i pro detekci počtu kopií genu *SMN2* za účelem zjištění prognózy onemocnění a vhodnosti terapie založené na modifikaci sestřihu mRNA genu *SMN2*. Obsahuje 32 MLPA sond – 2 sondy specifické pro exon 7 nebo exon 8 genu *SMN1*, 2 sondy specifické pro exon 7 nebo 8 genu *SMN2*, 17 sond detekujících sekvence přítomné v obou genech (nejméně jedna sonda na exon); 1 sondu pro gen *NAIP* a 10 referenčních sond detekujících sekvence mimo geny *SMN1/SMN2*. <https://www.mrcholland.com/product/P021/634>

Pro obě výše uvedené diagnostické soupravy platí následující:

- Každý z genů *SMN1* (LRG\_676; NG\_008691.1) a *SMN2* (LRG\_677; NG\_008728.1) má 9 exonů, které jsou u obou kitů tradičně číslovány 1, 2a, 2b, 3-8. Číslování exonů v referenčních sekvencích je 1-9.
- Vstupním materiálem pro analýzu je lidská DNA izolovaná z periferní krve, kultivovaných i nekultivovaných amniocytů, kultivovaných i nekultivovaných choriových klků, fetální krve, krevních skvrn (např. z novorozenecké screeningové kartičky), event. z dalšího materiálu.
- Oligonukleotidy jednotlivých sond specificky nasedají do míst, ve kterých geny *SMN1* a *SMN2* mají odlišnou sekvensi; tj. do oblasti tranzice C>T v exonu 7 (záměna měnící sestřih mRNA genu *SMN2*) resp. G>A v exonu 8.
- **Sonda specifická pro exon 7 genu *SMN1* stanovuje počet kopií exonu 7 genu *SMN1*, což je zásadní pro stanovení přenašečství a diagnostiku SMA.**
- Signál sondy specifické pro exon 8 genu *SMN1* stanovuje počet kopií exonu 8 genu *SMN1*. **Signál sondy specifický pro exon 8 genu *SMN1* nelze ale použít pro kvantifikaci počtu kopií *SMN1*, jelikož mutace v exonu 8 nemají patogenní efekt na výsledný protein.** STOP kodon je na konci exonu 7.
- Sondy pro exon 7 a exon 8 genu *SMN2* identifikují počet kopií exonu 7 resp. exonu 8 genu *SMN2*, tento výsledek ale neovlivňuje identifikaci přenašečů SMA a ani přímo nesouvisí se stanovením genetické diagnózy SMA.

Diagnostická souprava **SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier** by dle doporučení výrobce neměla být používána pro stanovení počtu kopií genu *SMN2* za účelem zjištění prognózy SMA a vhodnosti terapie založené na modifikaci sestřihu mRNA genu *SMN2*. Pro spolehlivější stanovení počtu kopií genu *SMN2* je určena diagnostická souprava **SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA**. V řadě laboratoří se však standardně používá diagnostická souprava **SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier** jak pro stanovení přenašečství SMA a diagnostiku SMA, tak zároveň pro stanovení počtu kopií *SMN2*. Pokud se takto děje, měla by mít laboratoř na vzorcích s různým počtem kopií genu *SMN2* (např. DNA vzorky z mezinárodní biobanky [www.coriell.org](http://www.coriell.org)) ověřeno, že jí vypracovaný postup umožní odečet vyššího počtu kopií genu *SMN2* (tj. 3, 4, event. 5).

Diagnostická souprava **SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA** kromě sond specificky rozlišujících gen *SMN1* a *SMN2* obsahuje sedm sond, které nespecificky detekují gen *SMN1* a *SMN2* v oblasti exonu 7,

intronu 7 a exonu 8. U normálních jedinců, kteří nesou dvě kopie *SMN1* a dvě kopie *SMN2*, tyto sondy detekují celkem čtyři genové kopie. **V případě homozygotní delece *SMN1*, mohou být tyto sondy použity k přesnějšímu určení počtu kopií *SMN2*.** Další desíť sond detekuje exon 1-6 genu *SMN1/SMN2* a identifikuje tak vzorky pacientů se ziskem nebo ztrátou těchto exonů, jakož i vzácné přenašeče SMA, kteří mají dvě kopie exonu 7 genu *SMN1*, ale jeden z genů *SMN1* je nefunkční z důvodu delece exonu 1-6. Jelikož tyto sondy detekují jak *SMN1*, tak *SMN2*, delece exonů 1-6 detekovaná těmito sondami by měla být považována za patogenní pouze v závislosti na fenotypu pacienta a dalších genetických nálezech.

**Naprostο zásadní pro správný výsledek celé analýzy je výběr vhodných referenčních DNA.** Pro výběr vhodných referenčních DNA z vlastní kolekce vzorků může sloužit referenční DNA, která je součástí diagnostické soupravy (obsahuje dvě kopie *SMN1* a *SMN2*), a DNA z biobanky Corriell ([www.corriell.org](http://www.corriell.org)). Počty kopií exonu 7 a 8 genu *SMN1* a genu *SMN2* identifikované v různých vzorcích DNA z biobanky Corriell jsou uvedeny v popisech jednotlivých SALSA® MLPA® probemix SMA. Pro stanovení přenašečství SMA a diagnostiku SMA se nejčastěji jako referenční vzorky používají DNA s dvěma kopiemi genu *SMN1* a *SMN2*. Pokud by byla diagnostická souprava SALSA® MLPA® Probemix P060-B2 SMA Carrier použita i pro stanovení počtu kopií genu *SMN2* za účelem zjištění prognózy onemocnění a vhodnosti terapie, je nezbytné zařadit referenční vzorky s více kopiemi genu *SMN2*. Referenční DNA z diagnostické soupravy MLPA nebo z Coriell biobanky by měly sloužit jen pro počáteční experimenty, tj. do doby než se jako vhodné reference vyberou DNA z vlastních vyšetřených vzorků.

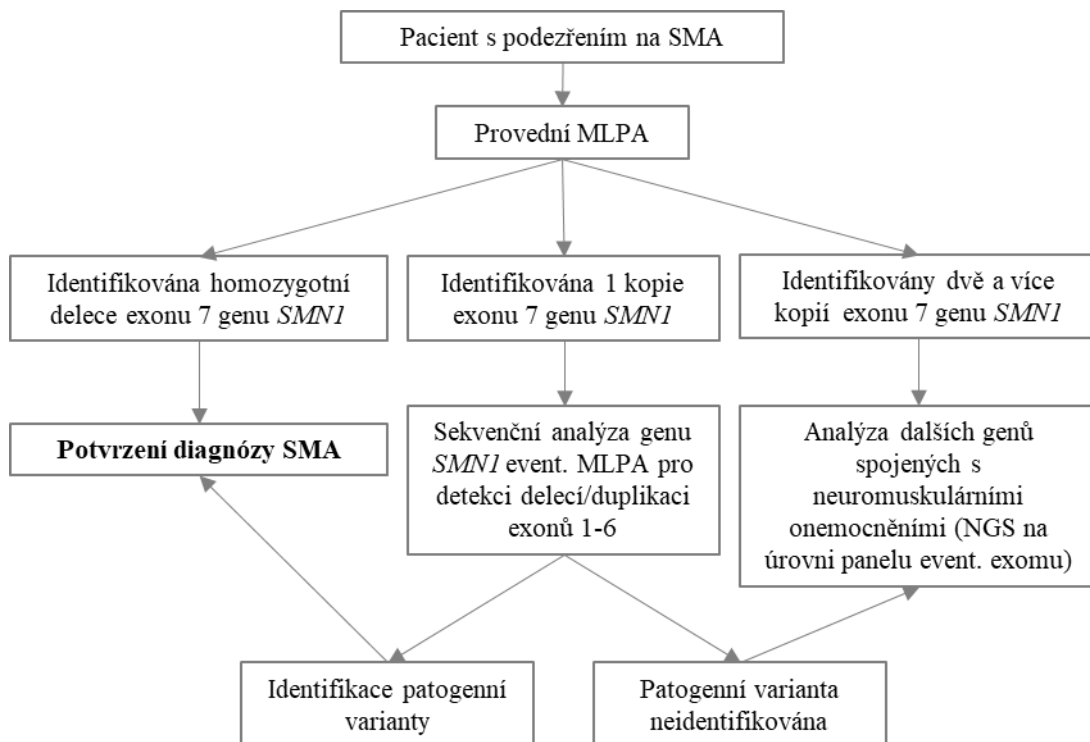
**Výsledky MLPA jsou zpracovávány pomocí software Coffalyser.Net,** který kromě vlastní analýzy dat automaticky provádí i kontrolu množství DNA vstupující do reakce, denaturace a ligace. **Pouze data, která splňují požadavky na kvalitu, jsou vhodná pro interpretaci výsledků.** <https://www.mrcholland.com/>

**Oblast chromosomu 5q13, ve které jsou lokalizovány geny *SMN1/SMN2*, je velmi nestabilní s výskytem delecí, duplikací a genových konverzí. Pro interpretaci výsledků je proto třeba mít na paměti následující:**

- Pro správnou interpretaci výsledků je naprostο zásadní správný výběr referenčních DNA.
- 95% pacientů s SMA má homozygotní delecí exonu 7 genu *SMN1*. U zbývajících 5% pacientů se vyskytuje delece exonu 7 na jenom chromosomu a patogenní sekvenční varianta malého rozsahu na chromosomu druhém. Detekce těchto změn je možná sekvenční analýzou, která je ale komplikovaná přítomností vysoce homologního genu *SMN2*. Může se vyskytnout i rozsáhlá delece v oblasti exonu 1-6, pro její detekci je vhodná diagnostická souprava SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA.
- V případě použití diagnostické soupravy SALSA® MLPA® Probemix P021-B1 SMA je třeba při interpretaci výsledků mít na paměti možnost výskytu třetí varianty genu *SMN* – *SMN1/2Δ7-8*. Tato varianta obsahuje exony 1-6, její klinický význam však dosud není znám.
- U přibližně 95 % vzorků počet kopií detekovaný sondami pro exon 7 a exon 8 genu *SMN1* je identický. U zbývajících 5% vzorků konverze mezi geny *SMN1* a *SMN2* vede ke vzniku chimérického genu, který obsahuje sekvenci exonu 7 z *SMN1* a exonu 8 z *SMN2*. **Výsledným produktem takového hybridního genu je plně funkční protein.**
- Přítomnost více než dvou kopií genu *SMN1* nebo úplné absence genu *SMN2* u zdravých jedinců je relativně běžný jev.
- Ačkoliv vzácně, mohou se vyskytovat přenašeči SMA se dvěma kopiemi exonu 7 genu *SMN1*. V těchto případech je třeba zvážit možnost výskytu obou kopií *SMN1* na jednom chromosomu.

- U složitějších výstupů může být pro správnou interpretaci výsledků nezbytná analýza rodičovské DNA k určení vazebné fáze.
- Výsledek MLPA může být ovlivněn dalšími variantami v cílové sekvenci DNA nebo v její blízkosti.

Obr. Možné výsledky molekulárně genetické diagnostiky SMA po provedení MLPA



#### Literatura:

- 1) Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165, 1995.
- 2) Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34: 460-4, 2003.
- 3) Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am. J. Med. Genet.* 130A: 307-310, 2004.
- 4) Prior TW, Nagan N, Sugarman EA, et al. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genet in Med* 13: 686-694, 2011.

#### Poznámka:

Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP připravuje doporučení pro molekulárně genetickou analýzu genu *SMN1* pro identifikaci patogenních variant malého rozsahu.

Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP sleduje aktuální rozvoj technik používaných pro molekulárně genetickou diagnostiku SMA. V této souvislosti budou prováděny i možné revize předloženého doporučení.