

## Informacja dotycząca badań genetycznych w kierunku SMA

Monika Gos, Maria Jędrzejowska

Rdzeniowy zanik mięśni (ang. Spinal Muscular Atrophy 5q; SMA5q) (OMIM: 253300, 253400, 253550, 271150, ORPHA: 70) spowodowany jest niedoborem białka SMN (ang. Survival of Motor Neuron), warunkującego przeżycie motoneuronów (Oskoui M i wsp. 2018, Singh NN i wsp. 2016).

Białko SMN jest kodowane przez dwa bliźniaczo podobne geny – *SMN1* i *SMN2*. Ich sekwencja kodująca różni się pięcioma podstawieniami nukleotydowymi. Z genu *SMN1* powstaje funkcjonalne białko SMN o pełnej długości (full length SMN; fSMN). Natomiast transkrypt *SMN2*, ze względu na różnice w sekwencji nukleotydowej, podlega alternatywnemu składaniu. Obecność tyminy w pozycji c.840 powoduje, że większość transkryptów *SMN2* pozbawiona jest eksonu 7. Powstałe na matrycy takiego transkryptu białko nie posiada domeny C-końcowej odpowiedzialnej m.in. za tworzenie oligomerów. Krótsze białko ulega również szybkiej degradacji. Jedynie 10–20% cząsteczek mRNA genu *SMN2* zawiera ekson 7, dzięki czemu możliwa jest synteza funkcjonalnego białka SMN (Singh NN i wsp 2018).

Za występowanie objawów SMA odpowiadają tylko mutacje genu *SMN1*. Obecność wariantów w genie *SMN2* nie wiąże się z występowaniem objawów klinicznych. Najczęstszym uszkodzeniem (mutacją) genu *SMN1*, stwierdzaną u >95% pacjentów (w polskiej populacji u 96,5%) jest utrata obu kopii genu *SMN1*, która może być efektem obecności rozległej delecji lub konwersji genu *SMN1* w *SMN2* (Wirth B. i wsp. 2020, Jędrzejowska M i wsp. 2005). W pozostałych przypadkach (ok. 3–5%) stwierdza się obecność heterozygotycznej delecji genu *SMN1* i mutacji punktowej (dotyczącej zazwyczaj pojedynczego nukleotydu) w obecnej kopii genu *SMN1* (Wirth B i wsp. 2020, Jędrzejowska M. i wsp. 2014). Do chwili obecnej zidentyfikowano >100 mutacji punktowych genu *SMN1* (źródło: Human Gene Mutation Database Professional 2021.4). W literaturze opisano także pojedyncze przypadki pacjentów z homozygotyczną mutacją punktową w genie *SMN1*, jednak dotyczyły one dzieci spokrewnionych rodziców (Rad IA i wsp. 2016, Kirwin SM i wsp. 2013).

Gen *SMN2* pełni rolę modyfikatora fenotypu, zaś jego mutacje nie są patogenne. Utratę obu kopii genu *SMN2* stwierdza się u około 10% zdrowej populacji. Z kolei zwiększenie liczby kopii genu *SMN2* (wskutek duplikacji czy konwersji) łagodzi przebieg kliniczny SMA5q. U pacjentów z formą ostrą najczęściej obserwuje się 2 kopie *SMN2*, u pacjentów z postacią pośrednią - 3 kopie, a u pacjentów z SMA3 – 3 lub 4 kopie *SMN2*. Uważa się, że obecność 5 kopii genu *SMN2* może niwelować utratę obu alleli genu *SMN1* (Calucho M i wsp. 2018). Warto dodać, że w przypadku terapii celowanych (nusinersen [Spinraza], onasemnogen abeparwówek [Zolgensma], rysdyplam [Evrysdi]) warunkiem rejestracyjnym lub refundacyjnym włączenia terapii jest oznaczenie liczby kopii *SMN2* (Kirschner J i wsp. 2020, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information_pl.pdf), [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/evrysdi-epar-product-information\\_pl.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/evrysdi-epar-product-information_pl.pdf)). Ma to swoje odzwierciedlenie także w realizowanym w Polsce programie lekowym: Leczenie Rdzeniowego Zaniku Mięśni B102 (<https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-nieonkologiczne>).

Diagnostyka rdzeniowego zaniku mięśni całkowicie oparta jest na badaniu genetycznym. W przypadku podejrzenia klinicznego SMA, a także w ramach diagnostyki różnicowej dziecka wiotkiego i zespołu dwuobrczowego, wykonuje się badania genetyczne w kierunku SMA.

Badania genetyczne w kierunku SMA, zgodnie z zaleceniami SMA Care Group (Mercuri E i wsp. 2018), powinny być wykonane w oparciu o metody ilościowe, umożliwiające ocenę liczby kopii *SMN1* i *SMN2*. Złotym standardem, jak pokazują badania kontroli jakości organizowane przez European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), jest aktualnie technika MLPA, która umożliwia jednoczesną ocenę liczby kopii *SMN1* i *SMN2* (Eggermann K i wsp. 2020). Alternatywną jest ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Obie techniki dają możliwość identyfikacji nie tylko pacjentów z homozygotyczną utratą obu kopii genu *SMN1*, ale także tych kilku procent z delecją *SMN1* na jednym allelu i podejrzeniem mutacji punktowej na drugim. Stwierdzenie u pacjenta objawowego jednej kopii genu *SMN1* jest wskazaniem do kontynuacji diagnostyki i wykonania sekwencjonowania genu *SMN1* (Zapletalova E i wsp. 2007). Testy oparte o metody ilościowe dają również możliwość równoczesnej oceny liczby kopii genu *SMN2*.

Stosowane rutynowo przed 2010 rokiem metody umożliwiające identyfikację homozygotycznej delecji eksonu 7 genu *SMN1* (np. PCR-RFLP) dają możliwość uzyskania szybkiego wyniku diagnostycznego w określonych sytuacjach klinicznych (np. diagnostyka prenatalna w rodzinach ryzyka genetycznego). Nie umożliwiają jednak dokładnej oceny liczby kopii *SMN1*. W ostatnich latach na rynku pojawiły się także zestawy do testów przesiewowych w kierunku SMA, które z powodzeniem wykorzystywane są w programach badań przesiewowych noworodków również w Polsce (Kariyawasam DST i wsp. 2020). Umożliwiają one podobnie jak testy oparte o technikę PCR-RFLP identyfikację noworodków z homozygotyczną delecją eksonu 7 genu *SMN1*. Wynik takiego testu w ramach programów jest weryfikowany alternatywną techniką, w przypadku polskich dzieci jest to technika MLPA (Gos M i wsp. 2021). O ile większość noworodków w momencie wykonania badania jest bezobjawowa, tak w przypadku dzieci objawowych, u których możemy uzyskać pozytywny wynik, wykonanie takiego testu jest błędem w sztuce.

Wykonanie testu przesiewowego lub PCR-RFLP u objawowej osoby nie umożliwia identyfikacji heterozygotycznej delecji genu *SMN1* oraz oceny liczby kopii genu *SMN2*. Powoduje to brak lub opóźnienie diagnozy SMA u kilku procent pacjentów, u których choroba związana jest z mutacjami punktowymi. Powoduje także opóźnienie włączenia leczenia u pacjentów z potwierdzoną obualleleliczną delecją (konieczność wykonania kolejnego badania, umożliwiającego ocenę liczby kopii genu *SMN2*). Ponadto, w związku z wprowadzeniem badań przesiewowych w kierunku SMA, obejmujących całą Polskę, badania takie stają się bezcelowe. Wszystkie nowo urodzone dzieci mają wykonany test przesiewowy w kierunku obuallelelicznej delecji *SMN1*.

Należy również zaznaczyć, że ze względu na złożone podłoże genetyczne i znaczne podobieństwo genów *SMN1* i *SMN2*, techniki sekwencjonowania następnej generacji na obecnym etapie nie umożliwiają identyfikacji hetero/homozygotycznej delecji genu *SMN1*, liczby kopii genu *SMN2*, ani mutacji punktowych genu *SMN1*. Tym samym nie powinny być zlecane celem potwierdzenia/wykluczenia SMA.

Piśmiennictwo:

1. Calucho M, Bernal S, Alias L i wsp. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: an analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28: 208–215.

2. Eggermann K, Gläser D, Abicht A, Wirth B. Spinal muscular atrophy (5qSMA): best practice of diagnostics, newborn screening and therapy. *Medizinische Genetik*, 2020, 32 (3):263-272.
3. Gos M, Jędrzejowska M, Ołtarzewski M. Badania przesiewowe noworodków w kierunku rdzeniowego zaniku mięśni. *Postępy Neonatologii*. 2021, 3: 27-34
4. Jędrzejowska M, Wiszniewski W, Zimowski J i wsp. Application of a rapid non-invasive technique in the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy (SMA). *Neurol Neurochir Pol* 2005, 39: 89-94.
5. Jędrzejowska M, Gos M, Zimowski JG i wsp. Novel point mutations in survival motor neuron 1 gene expand the spectrum of phenotypes observed in spinal muscular atrophy patients. *Neuromuscul Disord*, 2014, 24: 617–623.
6. Kariyawasam DST, Russell JS, Wiley V i wsp. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genet Med*, 2020, 22: 557–565.
7. Kirschner J, Butoianu N, Goemans N i wsp. European ad-hoc consensus statement on gene replacement therapy for spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020 28:38-43.
8. Kirwin SM, Vinette KM, Gonzalez IL i wsp. A homozygous double mutation in SMN1: a complicated genetic diagnosis of SMA. *Mol Genet Genomic Med*. 2013. 1(2):113-7.
9. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F i wsp.: Diagnosis and management of spinal muscular atrophy. Part 1: recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28: 103–115.
10. Oskoui M, Darras BT, De Vivo DC. Spinal muscular atrophy: 125 years later and on the verge of a cure in spinal muscular atrophy. W: *Spinal muscular atrophy: disease mechanism and therapy* (red. C. Sumner, S. Paushkin, C.P. Ko). Academic Press, Cambridge 2018.
11. Rad IA, Vahabi A, Ghazavi A. Homozygous Point Mutation in a Patient with Spinal Muscular Atrophy Type 1. *J Genet Disor Genet Rep*, 2016, 5:3.
12. Singh NN, Howell MD, Singh RN. Cellular and molecular mechanism of the disease. W: *Spinal Muscular Atrophy. Disease mechanism and therapy* (red. C. Sumner, S. Paushkin, C.P. Ko). Academic Press, Cambridge 2018.
13. Wirth B, Karakaya M, Kye MJ i wsp. Twenty-Five Years of Spinal Muscular Atrophy Research: From Phenotype to Genotype to Therapy, and What Comes Next, *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 2020; 21:231-261.
14. Zapletalová E, Hedvicáková P, Kozák L i wsp. Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscul Disord*, 2007, 17(6):476-81.

Stanowisko ekspertów Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka,  
Polskiego Towarzystwa Neurologów Dziecięcych oraz Zespołu  
Koordynacyjnego do Spraw Leczenia Chorych na Rdzeniowy Zanik Mięśni w  
sprawie badań genetycznych w kierunku SMA

Rdzeniowy zanik mięśni (ang. Spinal Muscular Atrophy 5q; SMA5q) (OMIM: 253300, 253400, 253550, 271150, ORPHA: 70) spowodowany jest niedoborem białka SMN (Survival of Motor Neuron), które kodowane jest przez geny *SMN1* i *SMN2*.

Za występowanie objawów SMA5q odpowiadają tylko mutacje genu *SMN1*. Najczęstszą mutacją genu *SMN1*, stwierdzaną u >95% pacjentów jest utrata obu kopii genu *SMN1*, która może być efektem obecności rozległej delecji lub konwersji genu *SMN1* w *SMN2*. W pozostałych przypadkach (ok. 3—5%) stwierdza się obecność delecji genu w jednym allelu i mutacji punktowej w drugim allelu genu *SMN1*.

Diagnostyka rdzeniowego zaniku mięśni całkowicie oparta jest na badaniu genetycznym. W przypadku podejrzenia klinicznego SMA, a także w ramach diagnostyki różnicowej dziecka wiotkiego i zespołu dwuobrczowego, wykonuje się badania molekularne w kierunku SMA.

Zgodnie z zaleceniami SMA Care Group analiza molekularna w przypadku podejrzenia SMA powinna być wykonana w oparciu o metody ilościowe (MLPA, qPCR), umożliwiające ocenę liczby kopii *SMN1* i *SMN2*. Obie techniki dają możliwość identyfikacji nie tylko pacjentów z homozygotyczną utratą obu kopii genu *SMN1*, ale także tych kilku procent z delecją *SMN1* na jednym allelu i podejrzeniem mutacji punktowej na drugim. Testy oparte o metody ilościowe dają również możliwość równoczesnej oceny liczby kopii genu *SMN2*. Stosowane rutynowo przed 2010 rokiem metody umożliwiające jedynie identyfikację homozygotycznej delecji eksonu 7 genu *SMN1* (np. PCR-RFLP), jak również metody stosowane w testach przesiewowych (np. PCR-HRM), dają niewątpliwie możliwość uzyskania szybkiego wyniku potwierdzającego obecność homozygotycznej delecji eksonu 7 genu *SMN1*. Jednak jest to zasadne w określonych sytuacjach klinicznych np. podczas diagnostyki prenatalnej w rodzinach ryzyka genetycznego.

Ponadto, w związku z wprowadzeniem badań przesiewowych w kierunku SMA na terenie całej Polski, badania takie stają się bezcelowe. Wszystkie nowo urodzone dzieci mają wykonany test przesiewowy w kierunku obuallelicznej delecji *SMN1*.

Dodatkowo, wykonanie testu przesiewowego lub PCR-RFLP u osoby objawowej nie umożliwia identyfikacji heterozygotycznej delecji genu *SMN1* oraz oceny liczby kopii genu *SMN2*. Powoduje to brak lub opóźnienie diagnozy SMA u kilku procent pacjentów, u których choroba związana jest z mutacjami punktowymi. Stosowanie tego typu testu powoduje także opóźnienie włączenia leczenia u pacjentów z potwierdzoną obualleliczną delecją genu *SMN1*, ze względu na konieczność wykonania kolejnego badania, oceniającego liczbę kopii genu *SMN2*.

Należy również zaznaczyć, że ze względu na złożone podłoże genetyczne i znaczne podobieństwo genów *SMN1* i *SMN2*, techniki sekwencjonowania następnej generacji na obecnym etapie nie umożliwiają identyfikacji hetero/homozygotycznej delecji genu *SMN1*, liczby kopii genu *SMN2*, ani mutacji punktowych genu *SMN1*. Tym samym nie powinny być zlecane celem potwierdzenia/wykluczenia SMA.

**W związku z tym eksperci obu Towarzystw oraz Zespołu ds Leczenia Chorych na Rdzeniowy Zanik Mięśni, stwierdzają, co następuje:**

- 1. U pacjentów objawowych nie należy wykonywać badań genetycznych identyfikujących tylko homozygotyczną delecję genu *SMN1***
- 2. Każdy pacjent z podejrzeniem SMA lub fenotypem wskazującym na konieczność uwzględnienia w diagnostyce różnicowej SMA, powinien mieć wykonane badanie genetyczne oparte o technikę ilościową (MLPA lub qPCR), umożliwiające jednoczasową ocenę liczby kopii genu *SMN1* i *SMN2***
- 3. Wynik badania diagnostycznego w kierunku SMA powinien zawierać jasną informację o liczbie funkcjonalnych kopii genu *SMN1* i *SMN2***
- 4. U pacjentów objawowych, u których w badaniu ilościowym zidentyfikowano obecność 1 kopii genu *SMN1*, należy wykonać celowane sekwencjonowanie genu *SMN1***
- 5. Nie jest wskazane wykonywanie badań metodą NGS w celu potwierdzenia/wykluczenia SMA5q**

W imieniu:

Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka  
prof. dr hab. Olga Haus

Polskiego Towarzystwa Neurologów Dziecięcych  
prof. dr hab. Maria Mazurkiewicz-Betdzińska

Zespołu Koordynacyjnego do Spraw Leczenia Chorych na Rdzeniowy Zanik Mięśni  
prof. dr hab. Katarzyna Kotulska-Jóźwiak