

# Genetika dědičných svalových onemocnění

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

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Fakultní nemocnice Brno

Dědičná svalová onemocnění jsou vzácná onemocnění vyznačující se velkou klinickou a genetickou heterogenitou. Rozvoj molekulárně genetických metod, zejm. masivní paralelní sekvenace, vede k rozšíření znalostí o jejich genetických příčinách a etiopatogenezi, což umožňuje predikci průběhu onemocnění, event. jeho cílenou léčbu.

**Klíčová slova:** nervosvalová onemocnění, dystrofie, myopatie, masivní paralelní sekvenace.

## Genetics of neuromuscular diseases

Hereditary neuromuscular diseases are rare diseases characterised by large clinical and genetic heterogeneity. The progress in molecular genetic methods especially massive parallel sequencing leads to increase knowledge of their genetic causes and etiopathogenesis that enables the prediction of clinical course or the using of targeted therapy.

**Key words:** neuromuscular diseases, dystrophy, myopathy, massive parallel sequencing.

Dědičná neuromuskulární onemocnění (NMD, *NeuroMuscular Diseases*) se vyznačují velkou klinickou a genetickou heterogenitou, kdy patogenní sekvenční varianty v jednom genu jsou spojeny s různými fenotypovými projevy a naopak velmi podobný fenotypový projev je způsoben patogenními sekvenčními variantami často v mnoha různých genech. Příkladem klinické heterogenity může být gen *LMNA* kódující protein lamin A/C, jehož patogenní varianty mohou způsobovat dle databáze OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) 11 různých typů neuromuskulárních onemocnění (dilatační kardiomyopatii, Charcot-Marie-Toothovu neuropatii, Emery-Dreifusovu svalovou dystrofii, Hutchinson-Gilfordovu progerii, lipodystrofii a další). Příkladem genetické heterogenity je pletencová svalová dystrofie, kdy podobný klinický projev je spojen s patogenními variantami v jednom z 29 doposud popsaných genů. Dle *Gene Table of Neuromuscular Disorders* ([www.musclegenetable.fr](http://www.musclegenetable.fr)) bylo k 1. 3. 2019 známo 955 typů neuromuskulárních onemocnění a 535 asociovaných genů.

Dědičnost NMD může být autosomálně dominantní, recesivní nebo X-vázaná. U genů spojených s NMD byly popsány různé typy patogenních sekvenčních variant.

Jednonukleotidové substituce v kódujících oblastech genu mohou vést ke změně aminokyseliny (*missense* mutace) nebo ke vzniku předčasného terminačního kodonu (*nonsense* mutace). Substituce, které nevedou ke změně aminokyseliny (tiché mutace), mohou mít také patogenní efekt, pokud například leží v konsenzuální sekvenci sestřihového místa, v oblasti regulačních elementů nebo pokud vznikne nové sestřihové místo. Substituce v přilehlých intronových oblastech exonů mohou také vést ke změně sestřihu. Důsledky změn v ostatních nekódujících oblastech genu jsou těžko predikovatelné, proto se v diagnostické praxi analyzují pouze exony a jejich přilehlé intronové oblasti.

Delece, inserce a duplikace mohou být na úrovni pouze několika nukleotidů nebo může docházet k delecím (inzercím, duplikacím) větších úseků např. celých exonů nebo i celých genů. Důsledkem je zachování čtecího rámce transla-

ce nebo jeho přerušení, kdy dochází ke vzniku předčasného terminačního kodonu (tzv. *frameshift* mutace). Příkladem NMD s častým výskytem celoxonových delecí a duplikací je Duchennova/Beckerova svalová dystrofie (gen *DMD*).

V rámci NMD jsou také popsána onemocnění, která jsou spojená s expanzí krátkých repetitivních sekvencí a následným toxickým vlivem mRNA nesoucí tuto expanzi (např. myotonická dystrofie a okulofaryngeální svalová dystrofie). Naproti tomu facioskapulohumerální svalová dystrofie (FSHD) je způsobena delecí makrosatelitních repetitivních sekvencí.

## Metodické přístupy používané v genetické diagnostice neuromuskulárních onemocnění

Základním metodickým přístupem v molekulárně genetické diagnostice svalových onemocnění je v současné době sekvenční analýza. U pacienta s NMD je ve většině případů provedena masivní paralelní sekvenace (MPS) souboru genů, event. celého exomu/genomu,

bioinformatické zpracování dat a interpretace identifikovaných sekvenčních variant.

Identifikace rozsáhlejších delecí/duplikací je zatím pro bioinformatické zpracování dat MPS komplikovaná a ne zcela spolehlivá, proto se v diagnostice pro detekci delecí/duplikací využívá metoda *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

Specifickým případem je molekulárně genetická diagnostika onemocnění s expanzí krátkých repetitivních sekvencí (např. myotonická dystrofie; základním metodickým přístupem je *repeat-primed* PCR) a facioskapulohumerální svalové dystrofie (základním metodickým přístupem je pulzní gelová elektroforéza, Southern blot a hybridizace). Molekulární problematika a diagnostika těchto onemocnění je probírána v samostatné kapitole.

## Sekvenace DNA

Sekvenace DNA je souhrnný termín pro metody, kterými se zjišťuje pořadí nukleotidů (A, C, G, T) v úsecích DNA. **Masivní paralelní sekvenace (MPS)** nebo také sekvenování nové generace (NGS, *Next Generation Sequencing*) umožňuje rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství sekvencí DNA v jednom sekvenačním běhu. MPS využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování stovek, tisíců až milionů úseků DNA současně, a to i u více pacientů v jednom sekvenačním běhu. Prvním krokem MPS je většinou příprava sekvenační knihovny tj. cílových úseků DNA, následuje jejich amplifikace a poté samotné sekvenování. Samotný princip amplifikace a sekvenace knihovny je odlišný u jednotlivých platform od různých výrobců. Výsledkem MPS je obrovské množství vygenerovaných dat, které je třeba zpracovat a vyhodnotit.

Cílovými úseky DNA pro přípravu sekvenační knihovny může být soubor genů (většinou jejich exony a přilehlé intronové oblasti), exom nebo genom. V diagnostické praxi se v současné době asi nejčastěji pomocí MPS analyzuje soubor genů, které souvisí s daným dědičným onemocněním, a jedná se o tzv. cílené sekvenování. Tento soubor genů, často označovaný jako panel genů, může být různě velký od několika genů až po stovky genů a laboratoř si může navrhnout vlastní panel genů, který průběžně aktualizuje, nebo využít komerční kit.

Pro kvalitu MPS je důležitá hloubka čtení, tzn. počet čtení daného nukleotidu, která je

obvykle při cíleném sekvenování řádově vyšší než např. u celoexomového sekvenování. Při diagnostice dědičných onemocnění je vyžadována minimální hloubka čtení 20–30 (tzn. každá báze je přečtena nejméně 20–30×). Pokrytí však v praxi nebývá rovnoměrné a je pravděpodobné, že budou existovat úseky DNA, kde pokrytí bude pod 20 čtení, zatímco sekvence jiných oblastí mohou být ve stovkách čtení. Tato nevyváženost může být způsobena mnoha různými faktory, jako je rozdílná míra účinnosti hybridizačních sond, nebo vlivem repetitivních oblastí DNA a zastoupením jednotlivých bází v daném úseku DNA.

Důležitou součástí techniky MPS je bioinformatické zpracování dat. Základním postupem je mapování všech sekvenačních čtení na referenční sekvenci (tzv. *alignment*), tedy nalezení referenční sekvence ke každému sekvenovanému fragmentu DNA. V dalším kroku je pak potřeba nalézt rozdíly mezi jednotlivými čteními mapovanými na referenční sekvenci a touto referenční sekvencí – tzv. sekvenční varianty. Na základě vyhodnocení bioinformatického zpracování je pak určena pravděpodobnost, s jakou se na pozicích vyskytují skutečné změny a s jakou pravděpodobností jde jen o technické chyby v sekvenaci či v mapování čtení.

Výsledkem masivní paralelní sekvenace je identifikace velkého množství sekvenčních variant (odchylek od reference), 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; Richards et al. 2015). Toto ACMG doporučení rozděluje sekvenční varianty do pěti kategorií – (a) patogenní, (b) pravděpodobně patogenní, (c) nejasného významu, (d) pravděpodobně benigní a (e) benigní. Pro popis identifikovaných sekvenčních variant existují standardy vydané *Human Genome Variation Society* (HGVS; <http://varnomen.hgvs.org>). Detekované sekvenční varianty jsou shromažďovány v různých databázích např. v databázi LOVD (*Leiden Open Variation Database*; <https://www.lovd.nl>) nebo v databázi HGMD (*Human Gene Mutation Database*; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>), která obsahuje publikované patogenní varianty a funkční polymorfismy asociované s nemocemi.

**Klasická sekvenace dle Sanger** slouží k cílené analýze určitého úseku DNA. V sou-

časné diagnostické praxi NMD slouží hlavně k potvrzení sekvenčních variant identifikovaných metodou MPS a ke genetické analýze rodinných příslušníků pacienta. U rodinných příslušníků se genetická diagnostika cíleně zaměřuje na úsek DNA, ve kterém byla detekována sekvenční varianta u probanda.

Dále může být klasická sekvenční analýza aplikována v případech, kdy se u pacienta jedná o onemocnění s jasným fenotypem a toto onemocnění je spojeno s určitým typem genetické příčiny. Příkladem aplikace může být okulofaryngeální svalová dystrofie (OPMD). Toto onemocnění má specifické klinické projevy a jeho genetickou příčinou je expanze tripletu nukleotidů kódujících alanin nad normální počet (tj. deset opakování) v exonu 1 genu *PABPN1*.

## Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA je metoda pro zjišťování delecí/duplikací v analyzovaném genu. MLPA je semi-kvantitativní metoda pro stanovení relativního počtu kopií až 60 sekvencí sond v jediné multiplexní PCR reakci.

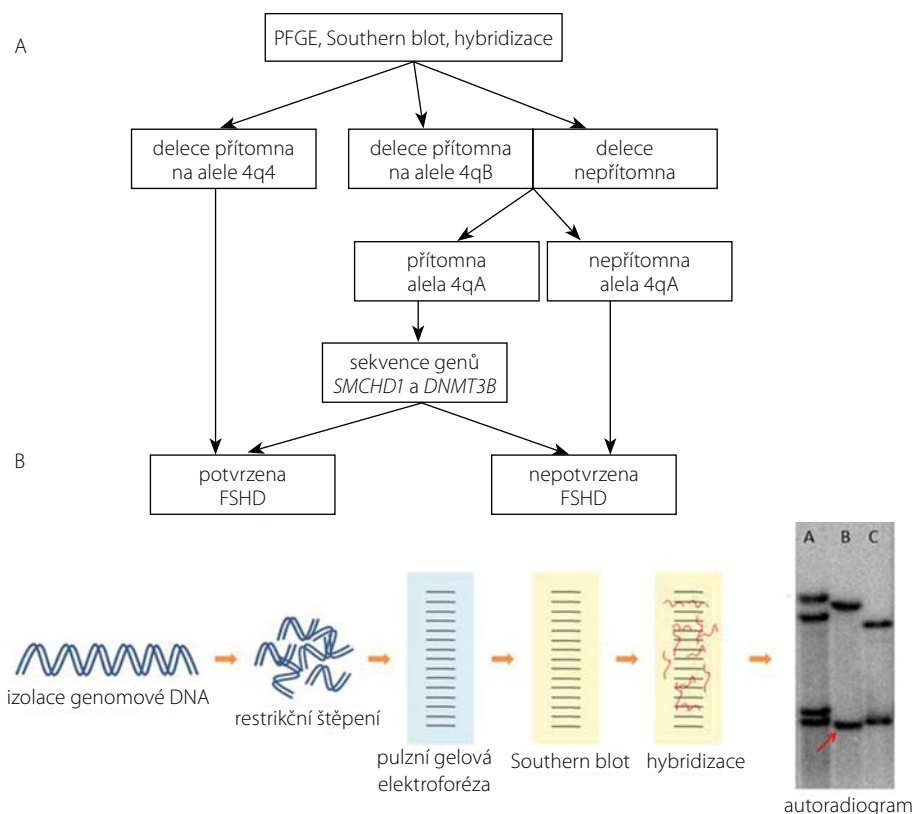
V diagnostice svalových onemocnění se MLPA uplatňuje nejčastěji při diagnostice Duchennovy/Beckerovy svalové dystrofie. Pokud je u pacienta identifikována pouze jedna patogenní varianta v genu s recesivním typem dědičnosti a pokud klinický stav odpovídá fenotypu při poruše tohoto genu, měla by se do diagnostického postupu zařadit analýza zaměřená na přítomnost delecí/duplikací na druhé alele analyzovaného genu.

## Dědičné myopatie

Dědičná svalová onemocnění jsou klinicky a geneticky velmi heterogenní. Jednotlivé skupiny svalových onemocnění se překrývají na úrovni klinické, patologické i genetické.

**Svalové dystrofie** jsou skupina svalových onemocnění asociovaná s geny kódujícími zejména proteiny extracelulární matrix, sarkomery nebo jaderné membrány, a se známými dystrofického procesu ve svalové tkáni. Klinický průběh svalových dystrofií je velmi různorodý, zahrnující svalové dystrofie s počátkem nástupu v dětském věku (spojené s významnou ztrátou svalové funkce ovlivňující schopnost pohybu, srdeční a respirační funkce), stejně jako svalové dystrofie s pozdním nástupem (spojené

**Obr. 1.** A) Schéma molekulárně genetické diagnostiky FSHD; B) postup molekulárně genetické diagnostiky FSHD1 – zjištění přítomnosti delece repetice D4Z4: genomová DNA je štěpena ve třech paralelách a to enzymy: *EcoRI* (dráha A), *EcoRI* a *BlnI* (dráha B), *XbaI* (dráha C). Fragmenty jsou rozděleny pulzní gelovou elektroforézou, následuje přenesení rozdělených fragmentů z gelu na membránu (Southern blot) a hybridizace s radioaktivně značenou sondou p13E-11, která přisedá do oblasti před repetice D4Z4 na chromozomu 4 a chromozomu 10. Repetice z obou chromozomů se liší přítomností/nepřítomností restrikčního místa pro enzymy *BlnI* a *XbaI*. V dráze A jsou proto fragmenty DNA nesoucí repetice D4Z4 pocházející z chromozomu 4 a 10; v dráze B jsou fragmenty nesoucí repetice D4Z4 pocházející z chromozomu 4; v dráze C jsou fragmenty nesoucí repetice D4Z4 pocházející z chromozomu 10. Vizualizace fragmentů z obou chromozomů je nezbytná pro případy, kdy došlo k výměně repetice mezi chromozomy 4 a 10



s mírnou svalovou slabostí a únavou po námaze). Nejznámější a nejčastější svalovou dystrofií dětského věku je Duchennova/Beckerova svalová dystrofie (gen *DMD*), mezi nejčastější svalové dystrofie dospělého věku patří myotonická dystrofie (MD), facioskapulohumerální svalová dystrofie (FSHD) a velká skupina pletencových svalových dystrofií (tzv. LGMD).

**Kongenitální svalové dystrofie** se vyznačují časným nástupem onemocnění a mezi nejznámější zástupce patří svalové dystrofie s úplným nebo částečným deficitem merosinu (gen *LAMA2*), svalové dystrofie spojené s defektem kolagenu 6 (geny *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*), svalové dystrofie s defektem glykosylace (gen *FKRP*, *POMT1*, *POMT2*, *ISPD* a další), svalové dystrofie spojené s patogenními variantami v genech *SELENON* (původně *SEPN1*) a *LMNA* (Fu et Xiong, 2017).

**Kongenitální myopatie** jsou nedystrofické myopatie a jsou spojeny s defekty v genech kódujících zejména strukturní proteiny, které se

uplatňují při kontrakci svalu, a ve svalové tkáni jsou patrné ultrastrukturní změny. Kongenitální myopatie jsou historicky klasifikovány na základě ultrastrukturních nálezů ve svalové tkáni (Cassandrini et al., 2017) a dělíme je tak na:

- nemalinové myopatie (ve svalových vláknech přítomny malé tyčovité inkluze; geny s nejčastějším výskytem patogenních variant: *NEB*, *ACTA1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*)
- core myopatie (ve svalových vláknech při oxidačním barvení přítomny zakulacené struktury zvané „cores“; geny s nejčastějším výskytem patogenních variant: *RYR1*, *SELENON*, *MYH7*)
- centronukleární myopatie (abnormální poloha jader uvnitř svalových vláken; geny s nejčastějším výskytem patogenních variant: *MTM1*, *DNM2*, *BINI*, *RYR1*, *TTN*)
- CFTD myopatie (disproporce svalových vláken typu 1 a typu 2; geny s nejčastějším výskytem patogenních variant: *TPM3*, *RYR1*, *ACTA1*, *MYH7*, *TPM2*, *SELENON*)

- myopatie spojené s ukládáním myosinu (gen *MYH7*)

S rozvojem masivního paralelního sekvenování jsou stále popisovány nové geny ve spojení s fenotypem kongenitální myopatie. Schartner et al. (2017) popsali kongenitální myopatii spojenou s patogenními variantami v genu *CACNA1S*, který je primárně spojován s hypokalemií, periodickou paralýzou a maligní hypertermií. Zaharieva et al. (2016) popsali 11 případů kongenitální myopatie spojené s recesivními mutacemi v genu *SCN4A*. Patogenní varianty v genu *SCN4A* byly původně popsány u hypokalemií a hyperkalemií, kongenitální myotonie, paramyotonie a myastenického syndromu.

**Distální myopatie** jsou heterogenní skupina svalových onemocnění postihující distální svaly horních a dolních končetin. Dosud bylo v souvislosti s distálními myopatiemi popsáno cca 20 genů (např. *MYOT*, *LDB3*, *TTN*, *MYH7*, *DYSF* a další).

**Myofibrilární myopatie** (MFM) jsou charakterizovány ohniskovým narušením myofibril a agregací degradovaných myofibrilárních produktů do inkluzí. Nejčastěji se vyskytují patogenní varianty v genech: *DES*, *CRYAB*, *MYOT*, *FLNC*, *LDB3* a *BAG3* (Olive et al., 2013).

## Pletencové svalové dystrofie

Pletencové svalové dystrofie (LGMD, *limb girdle muscular dystrophy*) jsou jak klinicky, tak geneticky velice heterogenní skupina. Jedná se o dědičné, nekongenitální svalové dystrofie s progresivní slabostí zejména pletencových svalů.

Dědičnost LGMD je jak dominantní, tak recesivní. Dosud bylo popsáno 29 genů spojených s LGMD. Mutace v některých genech mohou být asociovány i s jinými fenotypy – např. geny *DYSF* a *TTN* jsou spojovány i s distálními myopatiemi, geny *FKRP*, *FKTN*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, nebo *DAG1* patří do skupiny tzv. dystroglykanopatií mohou mít těžké kongenitální formy onemocnění.

Původní klasifikace rozdělovala LGMD na dvě skupiny podle typu dědičnosti – dominantní LGMD1 a recesivní LGMD2. Jednotlivé subtypy pak byly označeny písmeny, řazeny abecedně podle pořadí popsání kauzálního genu. S rozvojem masivního paralelního sekvenování byly postupně objeveny další geny a poslední popsán gen byl klasifikován jako LGMD 2Z, což otevřelo

otázku, jak postupovat v dalším značení. Straub et al. (2018) navrhli nový klasifikační systém, který je již používán v databázi OMIM. Podle nové nomenklatury jsou pletencové svalové dystrofie opět rozděleny na skupiny s dominantní a recesivní dědičností, označené jako LGMD D a LGMD R, následuje číselné označení podle pořadí objevu poškozeného proteinu. Např. pletencová svalová dystrofie způsobená patogenními variantami v genu *CAPN3* nesla označení LGMD 2A, podle nové nomenklatury je označena jako LGMD R1 a LGMD D4. Kromě nomenklatury byla popsána i kritéria pro vytvoření další podskupiny LGMD s nově objeveným kauzálním genem. Na základě těchto kritérií může být nový gen spojen s fenotypem LGMD, až pokud je popsán u nejméně dvou nepříbuzných rodin. Podle nových kritérií některé geny ze skupiny LGMD vypadly (např. *DES*, *LMNA*, *BVES*); naopak některé geny přibýly – např. *LAMA2* jako LGMD R23.

Prevalence jednotlivých subtypů LGMD se liší v různých zemích. Obecně jsou recesivní formy častější než dominantní. V České republice je nejčastější formou LGMD R1 (gen *CAPN3*), dále následují LGMD R9 (gen *FKRP*), LGMD R3 (gen *SGCA*), LGMD R12 (gen *ANO5*) a LGMD R2 (gen *DYSF*) (Stehlíková et al., 2014; Stehlíková et al., 2017).

## Facioskapulohumerální svalová dystrofie

Facioskapulohumerální svalová dystrofie (FSHD, *facioscapulohumeral muscular dystrophy*; OMIM: 158900) je onemocnění s autosomálně dominantní dědičností. Na základě výsledků molekulárně genetické analýzy rozlišujeme dvě genetické varianty FSHD – FSHD1 a FSHD2. Častější forma FSHD1 (asi 95 % případů) je spojena s kontrakcí makrosatelitních repetit D4Z4 na počet 1–10 repetit v subtelomerní oblasti chromozomu 4q35. V populaci se vyskytují dvě alelické varianty uspořádání subtelomery 4q: 4qA a 4qB. FSHD1 je spojena výlučně se zkrácením počtu repetit D4Z4 na alele 4qA, zatímco stejné zkrácení na alele 4qB k FSHD1 nevede (Lemmers et al., 2002). Repetice D4Z4 jsou 3 300 pb dlouhé a součástí repetice je gen *DUX4*. *DUX4* je transkripční faktor, který se exprimuje ve varlatech zejména během zárodečného vývoje a v průběhu buněčné diferenciace je jeho exprese potlačena. Repetice D4Z4 obsahují GC – bohaté oblasti, tyto jsou v případě standardní DNA spojeny s metylací DNA a histono-

vými modifikacemi typickými pro transkripčně neaktivní chromatin. U FSHD1 pacientů dochází ke snížení počtu repetit, což má za následek konformační změny chromatinu a v důsledku toho exprese genu *DUX4*. Stabilní *DUX4* transkripty vznikají na alele, která obsahuje polyadenylační signál, který je součástí pouze alely 4qA. Reaktivace genu *DUX4* má vliv na dráhy související s metabolismem RNA a buněčnou signalizací. Expres *DUX4* v konečném důsledku ovlivní myogenezi a vede k oxidativnímu stresu a k apoptóze.

U FSHD2 pacientů byly detekovány patogenní varianty v genech *SMCHD1* (18p11.32) a *DNMT3B* (20q11.21) (Lemmers et al., 2012; van den Boogaard et al., 2016). Ve svalových buňkách se protein *SMCHD1* váže přímo na repetice D4Z4 a je nezbytný pro zachování jejich heterochromatinové struktury (tj. transkripčně neaktivního chromatinu). Gen *DNMT3B* kóduje metyltransferázu, enzym potřebný pro metylaci DNA. U FSHD2 pacientů je oblast repetit D4Z4 na chromozomu 4q hypometylována jako u FSHD1 a je také přítomna alela 4qA.

Oba typy, FSHD1 a FSHD2, jsou tedy výsledkem změněné exprese proteinu *DUX4* ve svalových buňkách. Reaktivace *DUX4* je u FSHD1 důsledkem sníženého počtu repetit D4Z4 a u FSHD2 je způsobena mutacemi v genu *SMCHD1* nebo *DNMT3B*. V obou případech musí být přítomna alela 4qA (Lemmers et al., 2015).

Molekulárně genetická diagnostika FSHD1 je založena na restričním štěpení DNA, rozdělení fragmentů DNA pulzní gelovou elektroforézou (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), následuje přenesení rozdělené DNA z gelu na membránu (Southern blot), hybridizace s radioaktivně značenými sondami a autoradiografie, jejímž výsledkem je identifikace velikosti fragmentu DNA nesoucího repetice D4Z4 na chromozomu 4 a identifikace přítomnosti alely 4qA (obrázek 1). Molekulárně genetická diagnostika FSHD je poměrně složitá a navíc komplikována tím, že téměř identické repetice D4Z4 se vyskytují i na chromozomu 10q a může docházet k výměně repetit mezi chromozomy 4q a 10q.

## Myotonická dystrofie

Myotonická dystrofie (MD, *Myotonic Dystrophy*) je nejčastější dystrofie dospělého věku. MD má autosomálně dominantní dědičnost a rozlišujeme dvě formy MD – myotonickou dystrofií typu 1 a myotonickou dystrofií typu 2.

Myotonická dystrofie typu 1 (MD1; *Steinert disease*; OMIM: 160900) je způsobena expanzí trinukleotidové repetice v 3' nepřekládané oblasti genu *DMPK* (9q13.32). U zdravých jedinců je počet repetit do 37 repetit. Mutantní alely mají počet repetit větší než 50 (50–4 000 repetit). Počet repetit 38–50 je označován jako premutace a nosiči premutace jsou asymptomatictí. U MD1 existuje korelace mezi počtem repetit a závažností fenotypu; s narůstajícím počtem repetit je závažnější fenotyp a dřívější věk nástupu. Kongenitální formy MD1 jsou spojeny s počtem větším než 1 000 repetit; zatímco mírné formy jsou spojeny s počtem 51–149 repetit.

Oblast repetit je nestabilní během mitotického dělení i během meiózy. Důsledkem je častý somatický mozaicismus, který vysvětluje fenotypovou variabilitu jak mezi různými tkáněmi, tak mezi rodinnými členy. Premutace a mutace jsou nestabilní během meiózy, což vede k tzv. anticipaci (zvyšování počtu repetit při přenosu na další generaci). Kongenitální MD1 je spojená s výlučně maternálním přenosem.

Myotonická dystrofie typu 2 (MD2; OMIM: 602668) je spojena s expanzí tetranukleotidové repetice v intronu 1 genu *CNBP* (3q21.3, původně *ZNF9*). Alely zdravých osob obsahují méně než 30 repetit. Mutantní alely mají počet repetit v rozmezí 75–11 000 repetit. Podobně jako u MD1 vykazují alely s premutací nestabilitu během meiózy. Avšak na rozdíl od MD1, není u MD2 popsána korelace mezi rozsahem expanze a klinickým postižením či věkem manifestace onemocnění. MD2 se manifestuje výhradně v dospělém věku a nemá kongenitální či infantilní formu.

MD1 a MD2 mají navzdory různé lokalizaci genového defektu podobné rysy: kromě svalové slabosti jde o myotonii, kataraktu, systémové projevy a dominantní dědičnost. Klíčem pro pochopení původu řady společných klinických projevů je společný patogenní mechanismus – akumulace transkribované RNA s expanzemi v jádře vedoucí ke tvorbě jaderných inkluzí, které vážou a zadržují RNA-vazebné proteiny, čímž dochází k ovlivnění řady buněčných procesů včetně sestřihu mRNA některých genů (Udd et Krahe, 2012). Znalost tohoto patomechanismu je nadějí pro kauzální léčbu vycházející z vazby malých molekul buď přímo na repetice na úrovni RNA, nebo cíleně na další složky, které jsou součástí tohoto patomechanismu (LoRusso et al., 2018).



Základním metodickým přístupem v molekulárně genetické diagnostice MD je *repeat primed* PCR (RP-PCR). Metoda je založena na amplifikaci pomocí trojice primerů – první primer je fluorescenčně značený a komplementární k DNA lokalizované před analyzovanými repetitciemi, druhý primer je komplementární k repeticií a na svém konci nese sekvenci specifickou pro nasedání třetího primeru. Výsledné produkty amplifikace jsou rozděleny kapilární elektroforézou, která v případě přítomnosti expanze vytváří charakteristický profil amplikonů. Metoda však není schopna prokázat přesně rozsah počtu opakování nad určitý práh. K tomuto účelu se používá Southern blot a hybridizace.

## Závěr

Dědičná svalová onemocnění jsou geneticky extrémně heterogenní skupina s několika častými typy a s mnoha vzácnými. Rozvoj techniky masivní paralelní sekvenace je zásadní pro

molekulárně genetickou diagnostiku zejména vzácnějších typů NMD, ale i pro identifikaci nových kauzálních genů.

MPS odhaluje u každé analyzované DNA velké množství sekvenčních variant, které je nutno dále analyzovat z pohledu možného spojení s onemocněním pacienta. Aby tyto analýzy byly úspěšné u co největšího počtu pacientů, musí existovat úzká spolupráce mezi klinickým a laboratorním pracovištěm. Pouze na základě takové spolupráce, kdy je třeba vždy pečlivě zvažovat, zda nalezená varianta vysvětluje nebo může vysvětlovat fenotyp pacienta, nebo která z nalezených variant nejlépe vysvětluje fenotyp pacienta, je možné interpretovat sekvenční varianty dle platných doporučení a identifikovat patogenní, resp. kauzální varianty. Velký význam má i testování vybraných sekvenčních variant v rodině pacienta v návaznosti na neurologické vyšetření pro potenciální spojení s dominantním přenosem onemocnění, se vznikem vari-

ant de novo nebo pro potvrzení pozice *trans* s další variantou genu v případě onemocnění s recesivním typem dědičnosti. V případě NMD je ale řada genů, které mohou mít jak dominantní, tak recesivní typ dědičnosti (příkladem jsou geny *RYR1*, *ACTA1*, *LMNA*, *COL6A1-A3*, aj.). Klinické informace týkající se pacienta a jeho rodiny včetně rodokmenu by měly být nedílnou součástí dokumentů zaslaných laboratoři před genetickým testováním. Velmi přínosné je zejména u dětských pacientů současné zaslání vzorků DNA od obou rodičů, protože je obvykle potřeba pro správnou interpretaci významu nalezených variant.

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

- Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, Minetti C, Astrea G, Bruno C, Santorelli FM. Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital J Pediatr* 2017; 43(1): 101.
- Fu XN, Xiong H. Genetic and Clinical Advances of Congenital Muscular Dystrophy. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130(21): 2624–2631.
- Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet* 2002; 32(2): 235–236.
- Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Dondin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma-Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM. 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.
- Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, Camano P, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, Miller DG, Upadhyaya M, Verschuuren JJ, Lopez de Munain Arregui A, van Engelen BG, Padberg GW, Sacconi S, Tawil R, Tapscott SJ, Bakker B, van der Maarel SM. Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2. *Hum Mol Genet* 2015; 24(3): 659–669.
- LoRusso S, Weiner B, Arnold WD. Myotonic Dystrophies: Targeting Therapies for Multisystem Disease. *Neurotherapeutics* 2018; 15(4): 872–884.
- Olive M, Kley RA, Goldfarb LG. Myofibrillar myopathies: new developments. *Curr Opin Neurol* 2013; 26(5): 527–535.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL. 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* 2015; 17(5): 405–424.
- Schartner V, Romero NB, Donkervoort S, Treves S, Munot P, Pierson TM, Dabaji I, Malfatti E, Zaharieva IT, Zorzato F, Abath Neto O, Brochier G, Lornage X, Eymard B, Taratuto AL, Böhm J, Gonorazky H, Ramos-Platt L, Feng L, Phadke R, Bharucha-Göbel DX, Sumner CJ, Bui MT, Lacene E, Beuvin M, Labasse C, Dondaine N, Schneider R, Thompson J, Boland A, Deleuze JF, Matthews E, Pakleza AN, Sewry CA, Biancalana V, Quijano-Roy S, Muntoni F, Fardeau M, Bönnemann CG, Laporte J. Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. *Acta Neuropathol* 2017; 133(4): 517–533.
- Stehlíková K, Skálová D, Zídková J, Mrázová L, Vondráček P, Mazanec R, Vohánka S, Haberlová J, Hermanová M, Zámečník J, Souček O, Ošlejšková H, Dvořáčková N, Solařová P, Fajkusová L. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Czech Republic. *BMC Neurol* 2014; 14:154.
- Stehlíková K, Skálová D, Zídková J, Haberlová J, Vohánka S, Mazanec R, Mrázová L, Vondráček P, Ošlejšková H, Zámečník J, Honzík T, Zeman J, Magner M, Šišková D, Langová M, Gregor V, Godava M, Smolka V, Fajkusová L. Muscular dystrophies and myopathies: the spectrum of mutated genes in the Czech Republic. *Clin Genet* 2017; 91(3):463–469.
- Straub V, Murphy A, Udd B, LGMD workshop study group. 229<sup>th</sup> 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.
- Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 2012; 11(10): 891–905.
- van den Boogaard ML, Lemmers RJ, Balog J, Wohlgemuth M, Auranen M, Mitsunashi S, van der Vliet PJ, Straasheijm KR, van den Akker RFP, Kriek M, Laurensse-Bik MEY, Raz V, van Oostaijen-Ten Dam MM, Hansson KBM, van der Kooij EL, Kiuru-Enari S, Udd B, van Tol MJD, Nishino I, Tawil R, Tapscott SJ, van Engelen BGM, van der Maarel SM. Mutations in DNMT3B Modify Epigenetic Repression of the D4Z4 Repeat and the Penetrance of Facioscapulohumeral Dystrophy. *Am J Hum Genet* 2016; 98(5): 1020–1029.
- Zaharieva IT, Thor MG, Oates EC, van Karnebeek C, Hendson G, Blom E, Witting N, Rasmussen M, Gabbett MT, Ravenscroft G, Sframeli M, Suetterlin K, Sarkozy A, D'Argenzio L, Hartley L, Matthews E, Pitt M, Vissing J, Ballegaard M, Krarup C, Lørdahl A, Halvorsen H, Ye XC, Zhang LH, Løken N, Werlauff U, Abdelsayed M, Davis MR, Feng L, Phadke R, Sewry CA, Morgan JE, Laing NG, Vallance H, Ruben P, Hanna MG, Lewis S, Kamsteeg EJ, Männikkö R, Muntoni F. Loss-of-function mutations in SCN4A cause severe foetal hypokinesia or 'classical' congenital myopathy. *Brain* 2016; 139(Pt 3): 674–691.