Postępy Psychiatrii i Neurologii, 1997, 6, 49–60

Mutacje dynamiczne w chorobach zwyrodnieniowych układu nerwowego

Dynamic mutations in degenerative diseases of the nervous system

DOROTA HOFFMAN-ZACHARSKA

Z Zakładu Genetyki IPiN w Warszawie

STRESZCZENIE. *W pracy omówiono istotę mutacji dynamicznych, przypuszczalny mechanizm ich powstawania oraz ich znaczenie w patogenezie niektórych procesów zwyrodnieniowych układu nerwowego. Przedstawiono dokładniej amplifikację określonych sekwencji trójnukleotydowych w kilku chorobach (red.).*

SUMMARY. *The nature of dynamic mutations, their presumable underlying mechanism, as well as their role in the pathogenesis of some degenerative diseases of the nervous system are discussed in the paper. More attention is devoted to amplification of selected trinucleotide sequences in several diseases (ed.).*

Słowa kluczowe: choroby zwyrodnieniowe o.u.n. / mutacje dynamiczne
Key words: degenerative diseases of the CNS / dynamic mutations

W ostatnich latach neurogenetyka molekularna rozwinęła się w jedną z bardziej aktywnych i obiecujących gałęzi neurobiologii. Jest to nowa dziedzina wykorzystująca techniki nowoczesnej genetyki molekularnej w badaniach klasycznych schorzeń neurologicznych o charakterze dziedzicznym, określanych mianem „chorób neurogenetycznych" i definiowanych jako kliniczne jednostki chorobowe, powodowane defektem jednego lub większej ilości genów, prowadzącym do zaburzenia różnicowania i funkcji neuroektodermy oraz jej pochodnych [Muller i wsp. 1994].

Choroby neurogenetyczne mogą być wynikiem zaburzenia prawidłowej ekspresji genu w neuroektodermie (typ I: wiele klasycznych dziedzicznych chorób zwyrodnieniowych, nerwowo-mięśniowych i zaburzeń rozwojowych mózgu), lub ich neurologiczny charakter może być powodowany pośrednio przez defekt genu nie ulegającego ekspresji w tkance nerwowej (typ II: choroby metaboliczne oraz dysplazje kostne z objawami neurologicznymi). Pod względem podłoża genetycznego można podzielić je na cztery grupy [Muller i wsp. 1994]:

(1) grupa chorób powodowanych przez tzw. mutacje dynamiczne, czyli zwielokrotnienie sekwencji trójnukleotydowych w obrębie genów (np. choroba Huntingtona, bezład rdzeniowo-móżdżkowy, dystrofia miotoniczna, zespół kruchego chromosomu X),
(2) choroby związane z wystąpieniem delecji lub disomiczności jednorodzicielskiej (np. dystrofia Duchenne'a-Beckera, zespół Pradera i Willego-Algemana, zespół Millera-Dieker),
(3) grupa chorób powodowanych głównie wystąpieniem mutacji punktowych (leukodystrofie sprzężone z chromosomem X, choroba Charcot-Marie-Tooth typ I i inne),
(4) choroby genetycznie heterogenne, jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona.

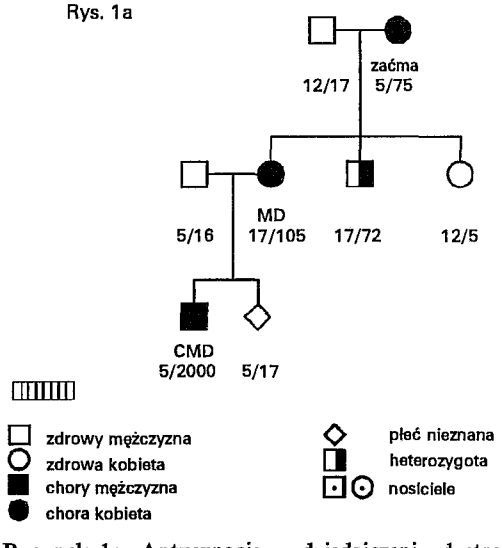
W niniejszej pracy omówione zostanie podłoże molekularne chorób należących do pierwszej z wymienionych grup, ze szczególnym zwróceniem uwagi na choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego.

ANTYCYPACJA W CHOROBACH UWARUNKOWANYCH GENETYCZNIE

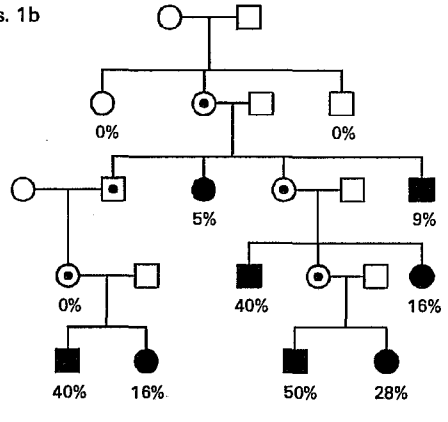
Antycypację definiuje się jako występowanie, w przypadku niektórych chorób dziedzicznych, zjawiska cięższego przebiegu choroby, której objawy występowały już w kolejnych, wcześniejszych pokoleniach. Pojęcie to wprowadzono na początku XX wieku w wyniku szczegółowych badań klinicznych rodzin dotkniętych dystrofią miotoniczną (*myotonic dystrophy*, MD), podczas których zaobserwowano wyraźną „ewolucję" tej choroby od formy łagodnej (zaćma) poprzez wystąpienie w następnych pokoleniach klasycznej formy MD (postępujące osłabienie i zanik mięśni), której często w tym samym lub następnym pokoleniu towarzyszyły bezpłodność, upośledzenie umysłowe i przedwczesna śmiertelność, aż do wystąpienia najostrzejszej, wrodzonej formy MD (*congenital MD*, CMD) z głębokim upośledzeniem umysłowym i zanikiem mięśni, która zawsze związana była z przekazywaniem choroby przez matkę (rys. 1a). Dalsze badania wykazały, że we wszystkich przypadkach wystąpiło dziedziczenie cechy w sposób autosomalny dominujący.

Szczególny przypadek antycypacji zaobserwowano w dziedziczeniu zespołu kruchego chromosomu X (*fragile X syndrom*, zespół fra-X), najczęstszej formy dziedzicznego upośledzenia umysłowego, przekazywanej jako cecha dominująca o niepełnej penetracji, sprzężona z chromosomem X. Charakterystyczne dla zespołu fra-X jest, że 20% mężczyzn będących nosicielami mutacji nie wykazuje objawów upośledzenia, podczas gdy 30% kobiet nosicielek opóźnionych jest w rozwoju umysłowym. Ponadto córki bezobjawowych nosicieli nigdy nie wykazują objawów choroby, które pojawiają się dopiero w następnym pokoleniu, tzn. u ich wnuków. Podobnie, jak w przypadku

Rys. 1a



Rys. 1b



Rysunek 1a. Antycypacja w dziedziczeniu dystrofii miotonicznej (MD – typowa forma dystrofii, CMD – wrodzona forma dystrofii), dla poszczególnych osób zaznaczono ilość powtórzeń CTG w obrębie genu DM-19 [wg Caskey i wsp. 1992]

Rysunek 1b. Paradoks Sherman, empirycznie wyznaczone ryzyko wystąpienia objawów zespołu fra-X w zależności od położenia w rodowodzie [wg Fu i wsp. 1991]

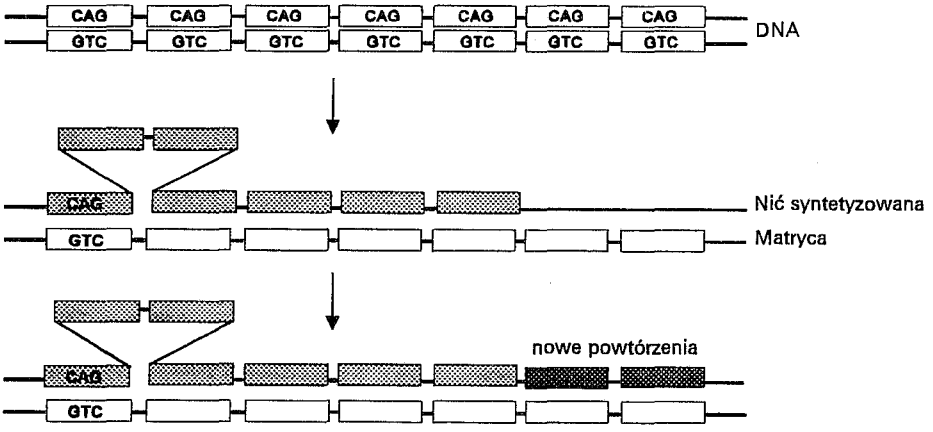
MD, występuje tu zaostrzenie objawów choroby w kolejnych generacjach z tym, że ryzyko zachorowania zależy od pozycji danej osoby w drzewie rodowym (rys. 1b). Jest to tzw. paradoks Sherman, który mówi, że prawdopodobieństwo wystąpienia choroby wśród rodzeństwa bezobjawowych nosicieli jest znacznie mniejsze (9%) niż wśród jego wnuków i prawnuków (40–50%) [Sherman i wsp. 1985].

W obu wymienionych przypadkach wytłumaczenie obserwowanych zjawisk było niezmiernie trudne w świetle założeń klasycznej genetyki mendlowskiej, definiującej geny jako stabilne elementy tylko rzadko zmieniane przez mutacje (częstość mutacji spontanicznych szacuje się na 1×10^{-9} na zasadę na pokolenie). Spowodowało to duży sceptycyzm w stosunku do obserwowanego zjawiska (pomimo, że antycypację opisano w kolejnych chorobach – np. w chorobie Huntingtona) i wreszcie uznanie go za wynik subiektywnego doboru danych klinicznych i statystycznych. Takie stwierdzenia można spotkać jeszcze w podręcznikach genetyki z lat osiemdziesiątych [Teisberg 1995]. Badania molekularne prowadzone w tych latach wykazały jednak, że materiał genetyczny nie jest aż tak stabilny, jak zakładano uprzednio, i doprowadziły do uznania antycypacji za zjawisko autentyczne, a nie fikcję.

MUTACJE DYNAMICZNE – MOLEKULARNE PODŁOŻE ANTYCYPACJI

Genetyka klasyczna definiowała mutacje jako dziedzicznie utrwalone zmiany w sekwencji DNA prowadzące do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania genów. Mutacje w takim ujęciu miały stabilny charakter, zarówno pod względem niezmienności przy przekazywaniu z pokolenia na pokolenie, jak również wpływu na prawdopodobieństwo zajścia kolejnych zmian w obrębie zmutowanej sekwencji DNA. Do weryfikacji tej definicji zmusiło odkrycie w genomach eukariotycznych obecności sekwencji mutujących z dużą częstością, niejednokrotnie przy każdorazowym przekazywaniu ich potomstwu. Sekwencje takie określono mianem niestabilnych sekwencji DNA.

Niestabilne sekwencje DNA należą do grupy sekwencji repetytywnych (powtarzających się) stanowiących znaczącą frakcję (u zwierząt do 50%) DNA genomowego. Jednym z rodzajów takich sekwencji są tzw. sekwencje mikrosatelitarne składające się z wielu następujących po sobie powtórzeń sekwencji 2–5 nukleotydowych [Charlesworth i wsp. 1994]. Sekwencje te charakteryzują się dużym polimorfizmem, co oznacza, że występują w genomie w wielu formach różniących się między sobą ilością



Rysunek 2. Schemat przedstawiający prawdopodobny mechanizm ślizgania się polimerazy (*polymerase slippage*) mogący prowadzić do zmiany ilości powtórzeń w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych

powtórzeń sekwencji podstawowej. Przyczyną tak znacznego polimorfizmu jest zapewne łatwość z jaką zachodzi w ich obrębie mutacja, polegająca na zmianie – amplifikacji (zwiększeniu) lub kontrakcji (zmniejszeniu) ilości jednostek podstawowych. Mechanizm powstawania tego typu mutacji nie jest obecnie wyjaśniony. Wydaje się jednak, że w przypadku sekwencji mikrosatelitarnych są one wynikiem tzw. ślizgania się polimerazy (*polymerase slippage*) – rys. 2 [Dover 1995], a prawdopodobieństwo ich zajścia zależy od długości niestabilnej sekwencji. Mutacje te określa się mianem mutacji dynamicznych.

Obecność niestabilnych sekwencji DNA, będących przyczyną mutacji dynamicznych nie tylko w obszarach niekodujących genomu, ale i w obrębie sekwencji kodujących, jest przyczyną występowania szeregu chorób genetycznie uwarunkowanych. We wszystkich opisanych do tej pory przypadkach chorób należących do tej grupy dochodzi do amplifikacji trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych (*trinucleotyde repeats*, TNRs), których liczba u osób zdrowych utrzymuje się w określonych granicach, a u osób chorych znacznie je przekracza. Stopień niestabilności sekwencji TNR zależy od ich długości (liczby już występujących powtórzeń), co tłumaczy zmienność fenotypową wywoływanych przez nie chorób, jak również zaostrzenie objawów w kolejnych pokoleniach, czyli obserwowane zjawisko antycypacji.

MUTACJE DYNAMICZNE JAKO PRZYCZYNA NIEKTÓRYCH CHORÓB GENETYCZNYCH CZŁOWIEKA

Jak już wspomniano powyżej, występowanie trójnukleotydowych sekwencji powtórzonych w rejonach kodujących niektórych genów jest przyczyną występowania chorób uwarunkowanych genetycznie.

Do tej pory opisano dziewięć takich jednostek chorobowych:

(1) zespół kruchego chromosomu X związany z obecnością kruchego miejsca FRAXA (*FRAXA mental retardation*),
(2) lekkie upośledzenie umysłowe związane z obecnością kruchego miejsca FRAXE (*FRAXE mental retardation*),
(3) dystrofia miotoniczna (*miotonic dystrophy – MD*),
(4) rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni typu Kennedy'ego (*spinobulbar muscular atrophy – SBMA*),
(5) choroba Huntingtona (*Huntington disease – HD*),
(6) ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typu 1 (*spinocerebellar ataxia type 1 – SCA1*),
(7) padaczka mioklioniczna z ruchami pląsawiczymi (*dentatorubral-pallidoluysian atrophy – DRPLA*) będąca alleliczną formą zespołu Haw River (*Haw River syndrome – HRS*),
(8) choroba Machado-Joseph (*Machado Joseph disease – MJD*) alleliczna z ataksją możdżkowo-rdzeniową typu 3 (*spinocerebellar ataxia typ 3 – SCA3*),
(9) ataksja Friedreicha (*Friedreich's ataxia – FRDA*).

Zestawienie danych dotyczących chorób związanych z amplifikacją powtórzonych sekwencji trójnukleotydowych, nazywanych niekiedy chorobami TNR (*TNR disorders*), przedstawiono w tabl. 1.

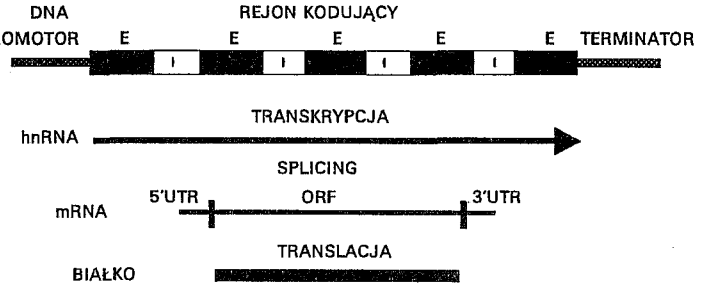
Wśród opisanych chorób związanych z amplifikacją sekwencji TNR na podstawie położenia w obrębie genu mutujących sekwencji oraz zakresu chorobotwórczego powtórzeń można wyróżnić dwie grupy (rys. 3).

Pierwsza z nich obejmuje cztery jednostki chorobowe: upośledzenia umysłowe związane z kruchymi miejscami FRAXA i FRAXE, MD i FRDA, gdzie mutacje dotyczą obszarów genów nie ulegających translacji, związane są z bardzo silną amplifikacją sekwencji podstawowych – powyżej 200 powtórzeń i prowadzą do obniżenia, czy wręcz zahamowania, ekspresji genów. W przypadku

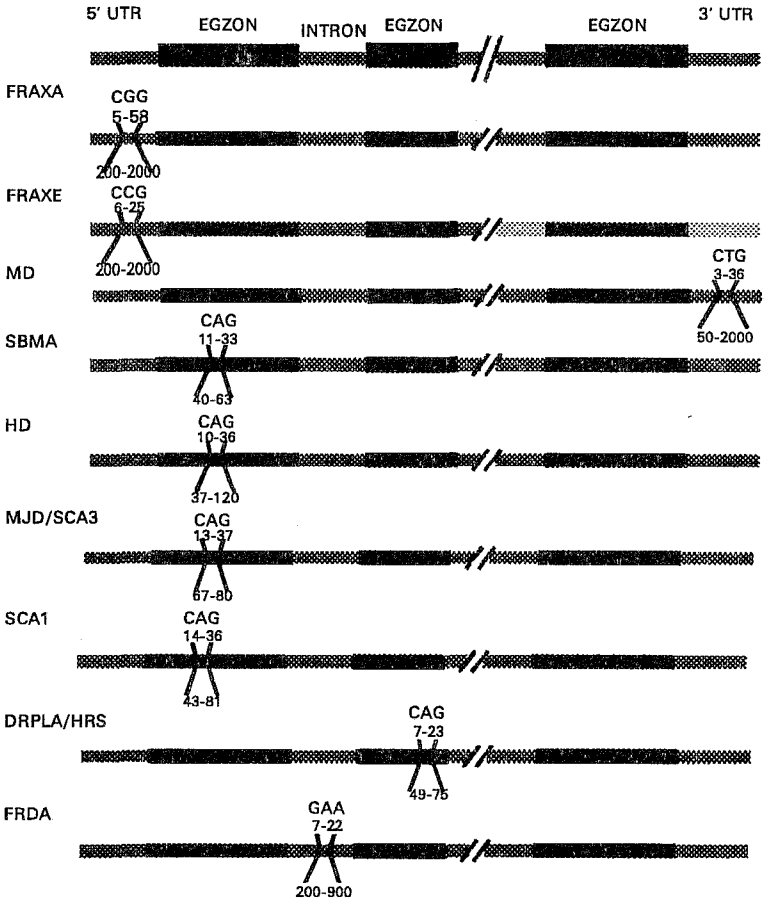
Tablica 1. Zestawienie chorób powodowanych amplifikacją sekwencji trójnukleotydowych (dziedziczenie: A – autosomalne, X – sprzężone z chromosomem X, D – dominujące, R – recesywne; antycypacja: mat., ojc. – występująca odpowiedź w dziedziczeniu mutacji od matki lub ojca; lok. powtórzeń: UTR – rejon genu nie ulegający translacji, ORF – otwarta ramka odczytu)

Choroba	Częstość występowania	Dziedziczenie	Antycypacja	Lokalizacja genu	Gen	Produkt genu	Powtórzenia	Ilość powtórzeń	Lokalizacja powtórzeń	Efekt mutacji
Zespół kruchego chromosomu X	mężczyźni: 1/1250 kobiety: 1/2000	X/D	+ (mat.)	Xq27.3	FMR-1	białko wiążące RNA	CGG	norm. 5–58 premut. 60–230 mut. 230–2000	5' UTR	inhibicja transkrypcji
Upośledzenie umysłowe związane z FRAXE	?	X/D (?)	?	Xq28	FMR-2	?	CCG	norm. 6–25 premut. ? mut. >200	5' UTR	? (inhibicja transkrypcji)
Dystrofia miotoniczna (MD)	1/8000	A/D	+ (mat.)	19q13.3	MT-PK	miotonina – kinaza białkowa	CTG	norm. 5–35 premut. 50–100 mut. 50–2000	3' UTR	inhibicja transkrypcji
Ataksja Friedreicha (FRDA)	1/50000	A/R	?	9q18–21.1	X-25	frataksyna – funkcja niezn.	GAA	norm. 7–22 premut. ? mut. 20–>1000	intron.	inhibicja transkrypcji
Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA)	?	X/R	+	Xq11–q12	AR	receptor androgenów – cz. transkryp.	CAG	norm. 11–36 premut. ? mut. 40–62	ORF	zmiana aktywności białka
Choroba Huntingtona (HD)	1/10000	A/D	+ (ojc.)	4p16.3	IT15	huntingtina – funkcja niezn.	CAG	norm. 10–36 premut. 34–36 mut. 37–120	ORF	? (zmiana aktywności białka)
Bezład rdzeniowo-móżdżkowy typu 1 (SCA1)	?	A/D	+ (ojc.)	6p22-p23	SCA1	ataksyna-1 – funkcja niezn.	CAG	norm. 14–36 premut. niezn. mut. 43–81	ORF	? (zmiana aktywności białka)
Ataksja Machado-Joseph (MJD/SCA3)	?	A/D	+ (ojc.)	14q32	MJD1		CAG	norm. 13–37 premut. niezn. mut. 67–80	ORF	? (zmiana aktywności białka)
Padaczka miokloniczna z ruchami pląsawiczymi (DRPLA/HRS)	?	A/D	+ (ojc.)	12p12	B37	atrofina-1 – funkcja niezn.	CAG	norm. 7–23 premut. niezn. mut. 49–75	ORF	? (zmiana aktywności białka)

Ryc. 3a



Ryc. 3b



Rysunek 3a. Schemat przedstawiający etapy ekspresji genu eukariotycznego. Sekwencja DNA zawierająca zarówno egzony (E), jak i introny (I) przepisywana jest na RNA w postaci pierwotnego transkryptu (hnRNA), z którego w procesie *splicing* wycinane są sekwencje niekodujące – introny. mRNA stanowi matrycę do syntezy białka, sekwencje UTR na 5' i 3' końcu cząsteczki przed kodonem AUG i za kodonem „stop" nie ulegają translacji

Rysunek 3b. Schemat przedstawiający rozmieszczenie sekwencji trójnukleotydowych w genach dla różnych chorób genetycznych powodowanych mutacjami dynamicznymi. W każdym przypadku podano rodzaj sekwencji, zakres powtórzeń u osób zdrowych (powyżej) i osób chorych. Objaśnienia skrótów nazw chorób znajdują się w tekście

FRAXA i FRAXE mamy do czynienia z amplifikacją odpowiednio sekwencji CGG i CCG, której towarzyszy wystąpienie łamliwych miejsc w chromosomie X. Zwielokrotnienie sekwencji zachodzi na 5' końcu genu. Interesujące jest, że za wystąpienie w genomie człowieka trzech innych miejsc łamliwych również odpowiedzialne są zwielokrotnione podobne sekwencje trójnukleotydowe – FRAXF (GCC), FRA16A (CCG) oraz FRA11B (CCG) [Parrish i wsp. 1994, Jones i wsp. 1995]. We wszystkich przypadkach sekwencje te sąsiadują z tzw. wyspami CpG (*CpG islands*). Sekwencje CpG u pacjentów z zespołem fra-X, u których w badaniu cytogenetycznym wykrywa się obecność miejsca FRAXA zawsze ulegają hipermetylacji. W przypadku MD amplifikowana jest sekwencja CTG w rejonie 3' UTR [Brook i wsp. 1992], a w FRDA sekwencja GAA w obszarze 1 intronu genu [Campuzano i wsp. 1996].

Druga grupa – to szereg chorób, w przypadku których mutacje obejmują obszary genów odczytywane w procesie translacji (otwarta ramka odczytu z ang. *open reading frame* – ORF), dotyczą one tylko sekwencji CAG (kodonu kodującego glutaminę) i prowadzą do wydłużenia ciągu glutamin w produkcie białkowym, zmieniając w ten sposób jego podstawową funkcję. Niestabilność sekwencji nie jest tu tak silna, a liczba powtórzeń trójnukleotydu CAG nigdy nie przekracza 150. Do grupy tych chorób należą: HD [Huntington Disease Collaborative Group 1993], SBMA [La Spada i wsp. 1991], SCA1 [Orr i wsp. 1994], MJD [Kawaguchi i wsp. 1994] i DRPLA [Koide i wsp. 1994] będące chorobami zwyrodnieniowymi układu nerwowego o charakterze postępującym, związanymi z selektywną utratą neuronów. Choroby te dziedziczone są w sposób dominujący (wyjątek stanowi SBMA), charakteryzują się późnym występowaniem objawów (po 30 roku życia) i antycypacją, związaną z ojcowskim przekazywaniem zmutowanego genu, prowadzącą do występowania form młodzieńczych (objawy przed 20 rokiem życia).

Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni typu Kennedy'ego

Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni – to choroba należąca do grupy chorób nerwowo-mięśniowych charakteryzująca się zanikiem neuronów ruchowych. Jest to choroba wieku średniego o charakterze postępującym, której główne objawy obejmują osłabienie i zanik mięśni. Choroba dziedziczona jest jako cecha recesywna sprzężona z płcią. Występuje tylko u mężczyzn, u których oprócz głównych objawów stwierdza się obniżoną płodność i ginekomastię. Przyczyną tej choroby jest mutacja w 1 egzonie genu AR – kodującego receptor androgenu. Mutacja polega na amplifikacji sekwencji CAG, co prowadzi do wydłużenia ciągu glutamin na N-końcu białka. Receptor androgenu pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego aktywowanego obecnością androgenów. Mutacja, która zaburza funkcję aktywującą białka, nie zachodzi jednak ani w domenie wiążącej hormon, ani w domenie oddziałującej z DNA. W chwili obecnej nie wiadomo, jaki jest związek pomiędzy amplifikacją sekwencji CAG a degeneracją neuronów ruchowych. Nie jest to najprawdopodobniej prosta utrata funkcji białka, gdyż u pacjentów z delecją genu AR nie obserwuje się objawów charakterystycznych dla SBMA, jedynie zespół jąder feminizujących [Bingham i wsp. 1995].

Choroba (pląsawica) Huntingtona

Choroba Huntingtona (HD) jest chorobą zwyrodnieniową mózgu charakteryzującą się zanikiem neuronów prążkowia i kory płatów czołowych. Podstawowymi jej objawami są mimowolne ruchy pląsawicze (początkowo ograniczonych grup mięśni z późniejszym stałym niepokojem ruchowym z zaburzeniami chodu) i postępujące otępienie.

Objawy chorobowe w 90% przypadków występują między 35 i 40 rokiem życia, w 10% w tzw. postaci młodzieńczej HD, przed 20 rokiem życia. Przeciętnie chorzy umierają po 15–20 latach od pojawienia się objawów choroby. Postaci młodzieńczej,

związanej zazwyczaj z dziedziczeniem ojcowskim, towarzyszą ostrzejsze objawy i szybszy przebieg choroby.

HD przekazywana jest jako cecha autosomalna dominująca o pełnej penetracji. Przyczyną tej choroby jest mutacja położonego na chromosomie 4 genu IT15 kodującego huntingtynę – białko o nieznanej funkcji, nie wykazujące istotnej homologii do żadnego innego znanego obecnie białka. Huntingtyna jest białkiem cytoplazmatycznym, którego ekspresja, zarówno u osób zdrowych, jak i chorych, zachodzi w większości tkanek – nie jest ograniczona do układu nerwowego.

Mutacja chorobotwórcza w tym przypadku związana jest również z niestabilnością sekwencji CAG znajdującej się na 5' końcu genu IT15. Ilość powtórzeń tej sekwencji w populacji osób zdrowych jest wysokozmienna – od 7 do 36, z tym, że w większości przypadków (>99%) nie przekracza 30. U osób dotkniętych HD spotyka się ilość powtórzeń CAG w zakresie od 37 do ponad 120 (najczęściej 42–44). Amplifikację tej sekwencji powyżej 37 powtórzeń stwierdza się niemal u wszystkich (99%) pacjentów, u których rozpoznano HD. Uznaje się więc, że jest to specyficzny marker pozwalający na weryfikację rozpoznania klinicznego, a u osób pochodzących z rodzin ryzyka HD nie wykazujących objawów – na stwierdzenie lub wykluczenie nosicielstwa mutacji związanej z tą chorobą.

Szereg badań wykazuje istnienie korelacji pomiędzy wiekiem zachorowania a wielkością rejonu powtórzeń CAG w obrębie genu IT15, tzn. im większa liczba powtórzeń tym wcześniej występują objawy choroby. Najwyraźniej zależność ta widoczna jest w przypadkach młodzieńczych, gdzie objawy występują przed 20 rokiem życia, a liczba powtórzeń przekracza 50. Liczba powtórzeń nie pozwala jednak przewidywać w konkretnym przypadku ani wieku zachorowania ani klinicznego przebiegu choroby.

Mechanizm patogenezy choroby Huntingtona nie został jeszcze poznany. Podobnie jak w przypadku SBMA, selektywna utrata neuronów nie jest wynikiem utraty aktywności jednego allelu IT15, lecz zmiany funkcji kodowanego przez niego białka, za czym przemawia fakt, że pacjenci z zespołem Wolf-Hirshorna, będący hemizygotami dla obszaru obejmującego gen IT15, na skutek częściowej delecji krótkiego ramienia chromosomu 4, nie wykazują objawów charakterystycznych dla HD.

Dziedziczne ataksje rdzeniowo-móżdżkowe

Dziedziczne ataksje rdzeniowo-móżdżkowe (*spinocerebellar ataxias – SCAs*) stanowią heterogenną grupę postępujących chorób zwyrodnieniowych związanych z degeneracją neuronów w móżdżku, rdzeniu kręgowym i pniu mózgu. Pod względem genetycznym choroby te można podzielić na autosomalne recesywne, autosomalne dominujące i przypadki izolowane. Dla ataksji o dziedziczeniu recesywnym opisano dwa *loci*, na chromosomie 8q (ataksja związana z niedoborem wit. E) i 9q (ataksja Friedreicha). Do chwili obecnej, zmapowano również siedem loci związanych z ataksjami o dziedziczeniu dominującym: SCA1 na chromosomie 6p, SCA2 na chromosomie 12q, choroba Machado-Joseph/SCA3 – 14q, SCA4 – 16q, SCA7 – 3p, SCA5 w centromerowym rejonie chromosomu 11 i DRPLA na chromosomie 12p – tabl. 2. W przypadku czterech z tych chorób uszkodzenia poszczególnych genów związane są z mutacjami dynamicznymi. W FRDA amplifikacji ulega trójnukleotyd GAA położony w obrębie intronu prowadząc do obniżenia poziomu mRNA, w SCA1, MJD oraz DRPLA amplifikacji ulega sekwencja CAG w otwartej ramce odczytu, prowadząc, podobnie jak w przypadku SBMA i HD, do powstania białka o zwiększonym ciągu glutamin.

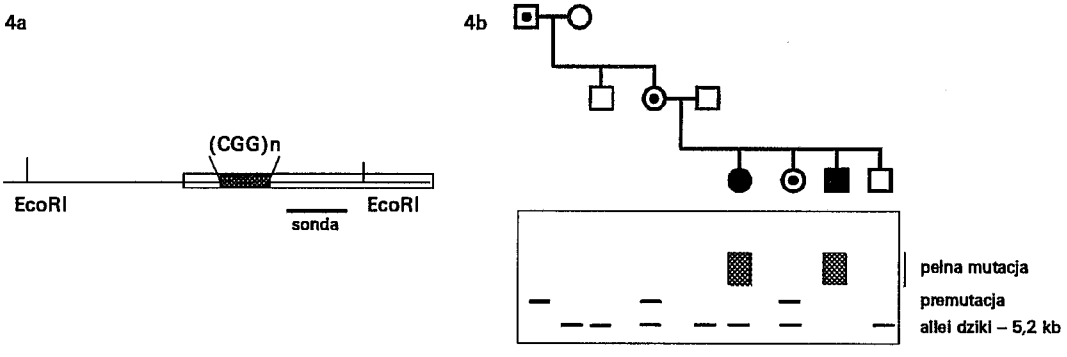
U chorych z SCA2 i SCA7 (ADCAII) również stwierdzono występowanie białek o dużych rejonach poliglutaminowych [Trottier i wsp. 1995], co, biorąc pod uwagę fakt występowania antycypacji w ich dziedziczeniu, może wskazywać na analogiczne podłoże molekularne mutacji.

Tablica 2. Zestawienie danych dotyczących ataksji o charakterze dziedzicznym [wg Harding 1995, Schols i wsp. 1995, Junck i Fink 1996]

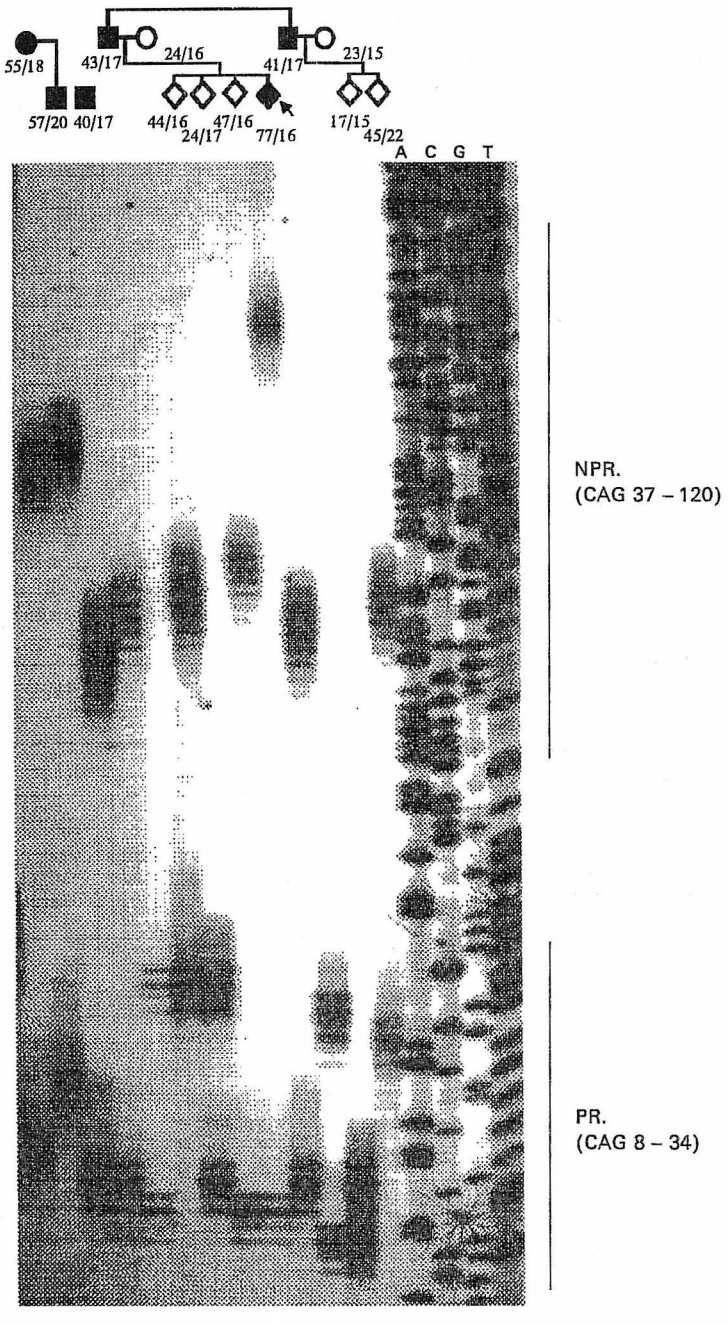
	Lokalizacja genu	Mutacja	Częstość występowania
1. Ataksje o dziedziczeniu recesywnym			
AVED	8q13	nieznana	nieznana
FRDA	9q18-q21.1	powt. GAA	cz. 1/50000 (nos. 1/120)
2. Ataksje o dziedziczeniu dominującym			
Autosomalne dominujące ataksje móżdżkowe typu I – ADCA I			
SCA1	6p22-23	powt. CAG	17%
SCA2	12p23-24	nieznana (CAG?)	nieznana SCA3/MJD
14q32		powt. CAG	18%
SCA4	16q24	nieznana	nieznana
Autosomalne dominujące ataksje móżdżkowe typu II – ADCA II			
SCA7	3p14-21.1	nieznana (CAG?)	nieznana
Autosomalne dominujące ataksje móżdżkowe typu III – ADCA III			
SCA5	11cent.	nieznana	nieznana
DRPLA/HRS – padaczka miokloniczna z ruchami pląsawiczymi			
	12p12	powt. CAG	3%
Autosomalne dominujące ataksje periodyczne			
	12p i 19p	nieznane	

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA MUTACJI DYNAMICZNYCH

Diagnostyka molekularna chorób wywoływanych przez mutacje dynamiczne opiera się w chwili obecnej na bezpośredniej analizie regionów ulegających mutacji. Sposób diagnostyki dla wszystkich chorób należących do tej grupy jest podobny i jego podstawą jest określenie wielkości fragmentu



Rysunek 4. Diagnostyka molekularna w zespole fra-X oparta na analizie restrykcyjnej DNA połączonej z hybrydyzacją. DNA cięty jest enzymem restrykcyjnym EcoRI, a następnie fragmenty DNA rozdzielane są w żelu agarozowym i po przeniesieniu na filtr hybrydyzowane z sondą. Niestabilne sekwencje $(CGG)_n$ położone są wewnątrz fragmentu EcoRI rozpoznawanego przez sondę (4a). Wielkości hybrydyzujących fragmentów odpowiadają stopniowi zwielokrotnienia tej sekwencji (4b)



Rysunek 5. Diagnostyka molekularna w chorobie Huntingtona. Na zdjęciu przedstawiona jest analiza produktów amplifikacji PCR rejonu obejmującego powtórzenia $(CAG)_n$ genu IT15. Produkty reakcji rozdzielone zostały w 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Wielkości poszczególnych fragmentów, na podstawie których wyliczono liczbę powtórzeń CAG, ustalono poprzez bezpośrednie ich porównanie ze standardem wielkości – w tym przypadku reakcja sekwencjonowania faga M13/mp18. Amplifikację DNA prowadzono przy zastosowaniu starterów HD1/HD3, liczbę powtórzeń CAG = (wielkość prod. PCR-47bp)/3 [Warner i wsp. 1993]

DNA obejmującego region niestabilny oraz ustalenie czy ilość powtórzeń sekwencji TNR znajduje się w zakresie patogennym dla danej choroby. W badaniach stosuje się dwie podstawowe metody: analizę restrykcyjną połączoną z hybrydyzacją oraz reakcję amplifikacji DNA metodą PCR (rys. 4, 5). Pierwsza z tych metod wykorzystywana jest w testach diagnostycznych chorób związanych z silną amplifikacją sekwencji TNR (MD, zespół fra-X), druga stosowana jest w diagnostyce wszystkich chorób, gdzie dochodzi do ograniczonej amplifikacji sekwencji CAG.

Bezpośrednia analiza molekularna niestabilnych rejonów DNA o znaczeniu chorobotwórczym pozwala na jednoznaczną klasyfikację jednostek chorobowych (co jest szczególnie istotne w przypadku HD i ataksji móżdżkowych o dziedziczeniu dominującym), a w praktyce może być wykorzystywana jako rutynowe badanie weryfikujące diagnozę kliniczną. Analiza DNA pozwala również na ustalenie nosicielstwa choroby u osób nie wykazujących objawów, a pochodzących z rodzin ryzyka genetycznego oraz w diagnostyce prenatalnej.

Badania tego typu powodują jednak szereg problemów etycznych, szczególnie w przypadku chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego o późnym wieku zachorowania. Doprowadziło to już do opracowania międzynarodowych zasad poradnictwa genetycznego dla rodzin dotkniętych HD [IHA, WFN 1994], które również powinny być stosowane w przypadku pozostałych chorób o podobnym przebiegu klinicznym i takim samym podłożu genetycznym.

PIŚMIENNICTWO

1. Bingham P.M., Scott M.O., Wang S.M., McPhaul M.J., Wilson E.M., Garbern J.Y., Merry D.E., Fischbeck K.H.: Stability of expanded trinucleotide repeat in the androgen receptor gene in transgenic mice. Nature Genetics 1995, 9, 191–196
2. Brook J.D., McCurrach M., Harley H.G.: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeart at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. Cell 1992, 68, 799–808
3. Campuzano V., Montermini L., Molto M.D., Pianese L., Cossee M., Cavalcanti F., Koenig M., Pandolfo: Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 1996, 271, 1423–1427
4. Caskey C.T., Pizzuti A., Fu Y-H., Fenwick R.G., Nelson D.L.: Triplet repeat mutations in human disease. Science 1992, 256, 784–789
5. Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W.: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 1994, 371, 215–220
6. Dover G. : Slippery DNA runs on and on and on .... Nature Genetics 1995, 10, 254–256
7. Fu Y-H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Richards S., Verkerk A.J.M., Warren S.T., Oostra B.A., Caskey C.T.: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991, 67, 1047–1058
8. Huntington Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. Cell 1993, 72, 971–983
9. International Huntington Association (IHA) and World Federation of Neurology (WFN): Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. Neurology 1994, 44, 1533–1536
10. Kawaguchi Y., Okamoto T., Tamiwaki M.: CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nature Genetics 1994, 8, 221–228
11. Koide R., Ikeuchi T., Onodera O., Tanaka H., Igarashi S., Miike T., Naito H., Ikuta F., Tsuji S.: Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) Nature Genetics 1994, 6, 9–13
12. La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K.H.: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 1992, 352, 77–79

13. Muller U., Graeber M.B., Haberhausen G., Kohler A.: Molecular basis and diagnosis of neurogenetic disorders. J. Neurol. Sciences 1994, 124, 119–140
14. Orr H.T., Chung M., Banfi S., (1993) Expansion of unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type I. Nature Genetics, 1993, 4, 221–226
15. Parrish J., Oostra B.A., Verkerk J.M.H., Richards C.S., Reynolds J., Spikes A.S., Shaffer L.G., Nelson D.L.: Isolation of GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. Nature Genetics 1994, 8, 229–235
16. Sherman S.L., Jacobs P.A., Morton N.E., Froster-Iskenius U., Howard-Peebles P.N., Nielsen K.B., Watson M.: Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmiting males. Hum. Genet. 1985, 69, 3289–3299
17. Teisberg P.: The genetic background of anticipation. J.Royal Society of Medicine 1995, 88, 185–187
18. Trottier Y., Lutz Y., Stevanin G., Imbert G., Devys D., Cancel G., Agid Y., Brice A., Mandel J-L.: Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntingtin's disease and four dominant cerebellar ataxias. Nature 1995, 378, 403–406
19. Warner J.P., Barron L.H., Brock J.H.: A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. Molecullar and Cellular Probes 1993, 7, 235–239

Adres: Dr Dorota Hoffman-Zacharska, Zakład Genetyki IPiN, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa