

Den molekylærgenetiske baggrund for spinal muskelatrofi

Diagnostik, prognose og fremtidig behandling

Adjungeret professor Marianne Schwartz

H:S Rigshospitalet, Klinisk Genetisk Afdeling

Resumé

Proksimal spinal muskelatrofi (SMA) er en af de hyppigst forekommende alvorlige genetiske sygdomme. Sygdommen skyldes mangel på genet *SMN1*. Kloning og karakterisering af *SMN1* og det næsten identiske nabogen *SMN2* har givet en forståelse af sygdomsmekanismen. Generne koder for det samme protein, men en enkelt baseforskel i generne medfører den forskel i splejsningen af præ-mRNA'et, at 90% af det modne *SMN2*-mRNA ikke indeholder exon 7-transkriptet. Det tilsvarende *SMN2*-protein er ustabil og ikke funktionelt. Det har vist sig, at stoffer som fenylbutyrat og valproat kan ændre denne splejsning in vivo.

Proksimal spinal muskelatrofi (SMA) er en af de hyppigst forekommende alvorlige genetiske sygdomme. Sygdommen nedarves autosomt recessivt, og med en incidens på omkring 1:6.000 [1] forekommer den næsten lige så hyppigt som cystisk fibrose. Anlægsbærrhyppigheden er 1:35. SMA er karakteriseret ved et fremadskridende tab af motoriske forhornsceller. Årsagen er en mangel på *SMN1*-genet, hvilket har ført til en enkel og sikker diagnostik. Den begyndende forståelse af patofysiologien har også givet håb om en mulig behandling af sygdommen. I denne artikel fokuseres der på vor viden om den molekylærgenetiske baggrund for SMA og dennes betydning for diagnostik, prognose og en evt. farmakologisk behandling.

Klinisk inddeling af SMA

Inddelingen af SMA i tre typer, I, II og III, er baseret på debutalder og kliniske færdigheder (Tabel 1) [2]. Hos patienter med type I (Werdnig-Hoffmanns sygdom) debuterer sygdommen inden seks månedersalderen, og patienterne kommer aldrig til at sidde selv, men dør ofte inden for de første to leveår. Hos patienter med type II (intermediær type) debuterer sygdommen før 18 månedersalderen, de sidder selv, men får aldrig gangfunktion. Den forventede livslængde for type II-patienter er nedsat. Patienter med type III (Kugelberg-Welanders sygdom) er en mere heterogen gruppe, hvor sygdommen debuterer senere end i toårsalderen, og patienterne lærer at gå uden støtte. De diagnostiske kriterier ændrer sig løbende, og der er et tydeligt overlap mellem grupperne, især hvad angår den forventede livslængde [3].

Tabel 1. Typeinddelingen af proksimal spinal muskelatrofi (SMA) på grundlag af [2].

Type	Navn	Debutalder	Udvikling	Levealder
I	Werdnig-Hoffmann	<6 mdr.	Sidder aldrig	<2 år
II	Intermediære form	>6 mdr.	Sidder, men ingen gangfunktion	>2 år
III	Kugelberg-Welander	>8 mdr.	Står/går	Når voksenalder

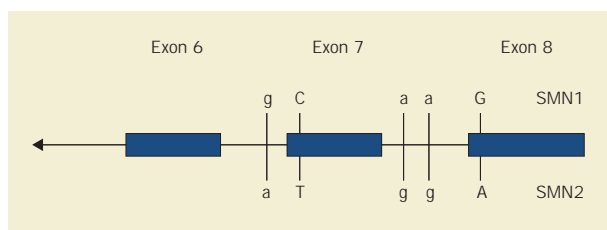
Genet

Ved hjælp af koblingsanalyser blev genet for SMA i 1990 lokaliseret til kromosom 5q13 [4-7], men det blev først isoleret og karakteriseret i 1995 [8] og fik betegnelsen *SMN1* (*survival motor neuron 1*). *SMN1* er en del af en dupliseret og inverteret region. I denne region findes en næsten identisk kopi af *SMN1* kaldet *SMN2* (Figur 1). Begge gener består af otte exoner og adskiller sig kun fra hinanden i fem ud af genernes ca. 28.000 basepar [9]. Genernes kodende dele er identiske på nær et basepar i exon 7 (Figur 1). Dette fører ikke til nogen forskel på de to proteiners aminosyresekvens, men giver anledning til betydelige forskelle i splejsningen af præ-mRNA (se senere).

Proteinet

SMN-proteinet findes i alle væv, dog mest i rygmarven [10]. Studier af cellekulturer og forsøg med transgene mus har vist, at SMN-proteinet er nødvendigt for overlevelse. Immunhistologisk farvning viser, at proteinet findes diffust i cytoplasma og i nukleære strukturer kaldet GEMs (*gemini of the coiled bodies*) [11]. Antallet af GEMs er korreleret til sygdommens sværhedsgrad [12].

SMN1 koder for et 294-aminosyrer-stort protein, der ikke har sekvenslighed med andre kendte proteiner. Proteinets indgår i splejsosomerne, som er komplekser af mange proteiner og små nukleære RNA-molekyler (snRNA), der er involveret i



Figur 1. Forskellen på *SMN1* og *SMN2* i den distale del af generne. Bogstaverne angiver de baser, der adskiller de to DNA-sekvenser fra hinanden.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

den korrekte splejsning af præ-mRNA til modent mRNA i kernen [11]. Forbindelsen mellem denne funktion og atrofi af de motoriske neuroner ved SMA er ikke klarlagt.

Diagnostik

Forskellen i de to *SMN*-geners DNA-sekvens gør det muligt at skelne mellem disse ved en polymerasekædereaktion (PCR)-baseret analyse, der er både enkel og hurtig [13]. Over 95% af alle patienter med SMA-type I og II og over 85% af patienterne med SMA-type III er homozygote for mangel på *SMN1*. Ganske få patienter er *compound* heterozygote med en deletion af *SMN1* på det ene kromosom og en punktmutation i *SMN1* på det andet kromosom [14, 15]. Mutationsanalyse af disse patienter er mere vanskelig og er ikke omfattet af en diagnostisk rutinetest.

Prænataldiagnostik og anlægsbærenderiagnostik

SMA nedarves autosomt recessivt, og begge forældre til en patient vil normalt være anlægsbærere. Ca. 2% af SMA-allelerne er de novo-mutationer [16]. Risikoen for at få endnu et barn med SMA er på 25%. Prænatal diagnostik er mulig ved en direkte test for *SMN1* på DNA isoleret fra en chorionvillusbiopti taget i tiende graviditetsuge.

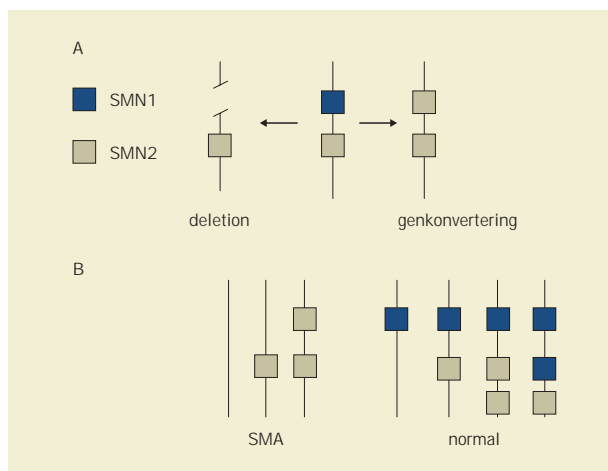
Raske søskende til en SMA-patient vil have ca. 67% risiko for at være anlægsbærere, og søskende til forældre til en SMA-patient vil have 50% risiko. Undersøgelse for mangel på *SMN1* er mulig ved en semikvantitativ PCR-baseret test, der danner grundlag for anlægsbærenderiagnostik af relevante familiemedlemmer. Hyppigheden af anlægsbærere er ca. 3% [13].

Mutationsmekanismer

Mangel på *SMN1* kan skyldes enten en deletion af *SMN1*, dvs. at DNA-sekvensen rent fysisk mangler, eller fænomenet genkonvertering, dvs. at *SMN1* er blevet ændret til *SMN2*, hvilket er muligt på grund af den store lighed mellem de to gener [17, 18] (Figur 2). Herved kan der opstå kromosomer med to kopier af *SMN2* og intet *SMN1*. Det omvendte er naturligvis også muligt. Undersøgelser har vist, at der eksisterer sygdomskromosomer med nul kopier af *SMN1* og 0, 1 eller 2 kopier af *SMN2*, og at der findes normale kromosomer med en eller to kopier af *SMN1*, og 0, 1 eller 2 kopier af *SMN2* [1, 19] (Figur 2). Homozygot mangel på *SMN2* giver ikke sygdom.

SMN2

Med udviklingen af nye molekylærgenetiske test er det nu muligt at bestemme det nøjagtige antal *SMN1*- og *SMN2*-kopier. Antallet af *SMN2*-kopier er direkte korreleret til typen af SMA [17, 18, 20]. I en større tysk undersøgelse af 375 patienter, der alle var homozygote for mangel på *SMN1*, fandt man, at 80% af alle patienterne med SMA-type I havde en eller to kopier af *SMN2*, 82% af dem med type II havde tre *SMN2*-kopier, og 96% af type III-patienterne havde tre eller fire



Figur 2. A. Skitse af de forskellige mutationsmekanismer ved proksimal spinal muskellatrofi (SMA). B. Illustration af de forskellige kombinationer af *SMN1* og *SMN2* for henholdsvis normale kromosomer og kromosomer hos SMA-patienter.

SMN2-kopier [1, 21]. Der er aldrig rapporteret om patienter, der var homozygot deleterede for både *SMN1* og *SMN2*, og man regner med, at denne genotype er letal. Antallet af *SMN2*-kopier er også korreleret til livslængden, der for type I-patienter med kun én *SMN2*-kopi var 0-11 mdr., og for patienter med to *SMN2*-kopier var <21 mdr. Antallet af *SMN2*-kopier er således prognostisk vejledende [1].

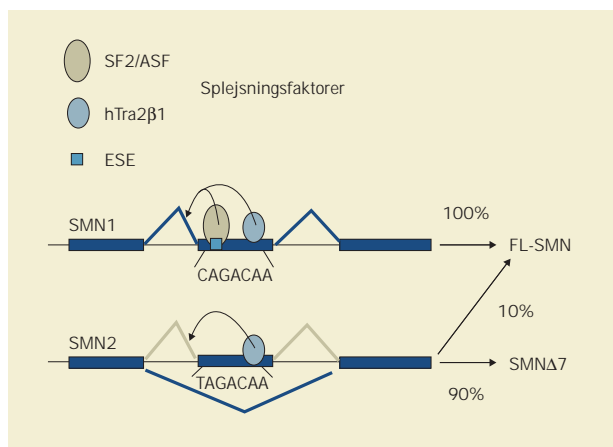
Musemodeller

Musens *survival motor neuron (Smn)*-gen er homologt til menneskets *SMN1*, men mus har kun *Smn* og ingen homolog til menneskets *SMN2*. Homozygot mangel på *Smn* er letalt i fosterstadiet. Knockoutmus, der er homozygote for deletion af *Smn* (-/-), men er gjort transgene for humane *SMN2*-kopier, har vist sig at overleve, og det kliniske billede hos disse mus er helt afhængigt af antallet af *SMN2*-kopier, i lighed med observationer hos mennesker. Mus med otte *SMN2*-kopier er symptomfri, hvilket har underbygget hypotesen om, at forøget ekspresion af *SMN2* kunne være et muligt mål for behandling af patienter med SMA [22].

Alternativ splejsning

Som ovenfor nævnt er de to *SMN*-geners DNA-sekvenser næsten identiske. Den eneste forskel i den del af generne, der oversættes til protein, er, at i en af positionerne i exon 7 har *SMN1* cytosin (C), hvor *SMN2* har thymin (T). De to involverede kodoner koder for samme aminosyre, men forskellen har stor betydning for splejsningen af genernes præ-mRNA. Det har således vist sig, at det pågældende basepar i *SMN1* indgår i en DNA-sekvens (*exonic splicing enhancer (ESE)*), der er nødvendig for bindingen af et af de proteiner, SF2/ASF, der er involveret i den korrekte splejsning af præ-mRNA'et. T i denne position i stedet for C medfører, at 90% af det modne *SMN2*-mRNA ikke indeholder exon 7-transkriptet ($\Delta 7$ mRNA) [23-25] (Figur 3). Det tilsvarende *SMN2*-protein er et ustabil, ikke

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL



Figur 3. Skitse af tredjedelen af SMN-genernes præ-mRNA'er og disses splejsning. SMN2 mangler *exonic splicing enhancer* (ESE)-sekvensen, der binder splejsningsfaktoren SF2/ASF. hTra2β1 er en svagere faktor, og kun ca. 10% af SMN2-mRNA'et vil splejse til fuldlængde-mRNA (FL-SMN). SMNΔ7 mangler exon 7-transkription.

funktionelt protein [26], der mangler den korrekte carboxy-terminale del.

Forklaringen på den observerede omvendte korrelation mellem sværhedsgraden af sygdommen og antallet af *SMN2*-kopier har vist sig at være, at noget af *SMN2*-genets præ-mRNA splejse korrekt, dvs. at det modne mRNA i nogle tilfælde beholder exon 7 (FL-mRNA, FL = fuldlængde) og dermed koder for et funktionelt *SMN*-protein. Det er således rimeligt at antage, at flere kopier af *SMN2* øger mængden af funktionelt protein hos patienterne, og det har da også vist sig, at antallet af *SMN2*-kopier er korreleret til antallet af GEMs i kernen. Fuldstændig mangel på *SMN* er letal for alle celler, og en nedsat mængde *SMN* berører selektivt de motoriske forhornsceller.

In vivo-eksperimenter med fibroblastkulturer fra patienter har vist, at korrekt splejsning af *SMN2* er afhængig af endnu en faktor, hTra2β1 (Figur 3). Transfektion med et plasmidkonstrukt, der indeholder genet for hTra2β1, gør det muligt at overeksprimere denne faktor, således at der sker en næsten normal splejsning (>80%) af *SMN2*-genets præ-mRNA [27, 28].

Behandling

Det faktum, at alle SMA-patienter har mindst én *SMN2*-kopi og dermed potentiale til at producere et korrekt *SMN*-protein, har initieret en række eksperimenter i forsøg på at finde en behandling for sygdommen. Rationalet har været at forøge mængden af korrekt *SMN*-protein ved at: 1) overeksprimere *SMN2*-mRNA og 2) øge andelen af korrekt splejset *SMN2*-mRNA (fuldlængde *SMN*-mRNA (FL-SMN)).

En lang række kemiske forbindelser har været afprøvet i både cellekulturer og musemodeller. Stoffer som interferon [29], natriumbutyrat [30], aclarubicin [31], valproat [32, 33] og fenylbutyrat [34] har været undersøgt for deres evne til in vivo både at opregulere mængden af *SMN2*-mRNA ved at aktivere promotoren og øge andelen af FL-mRNA.

Både aclarubicin, butyrat, valproat og fenylbutyrat har haft de ønskede virkninger. Aclarubicin er et kendt kemoterapeutisk middel, og dets toksicitet gør det uanvendeligt til behandling af børn med SMA.

Natriumbutyrat har vist sig at være mere lovende både i forsøg med cellekulturer og ved behandling af transgene mus, hvor det har bevirket en tydelig forøget produktion af *SMN*-proteinet i de motoriske forhornsceller og mildnet de kliniske symptomer hos musene [30]. Natriumbutyrat forøger forholdet mellem FL-SMN og Δ7mRNA mere effektivt end aclarubicin, samtidig med at det aktiverer transkriptionen af *SMN*. Imidlertid nedbrydes det meget hurtigt i organismen, og det er derfor ikke praktisk muligt at opnå en effekt in vivo. Fenylbutyrat har samme virkning som natriumbutyrat, men nedbrydes ikke så hurtigt. Fenylbutyrat har været anvendt i behandling af patienter med urinstofcyklusdefekter [35]. Behandling med fenylbutyrat af fibroblastkulturer fra 16 SMA-patienter viste en signifikant forøget mængde af FL-SMN, en forøget mængde af *SMN*-protein og et forøget antal GEMs [34]. Den samme forskergruppe har nu offentliggjort resultaterne fra det første kliniske studie [36]. Ti patienter med SMA-type II blev behandlet med fenylbutyrat i ni uger. Virkningen på muskelfunktionen (*the Hammersmith functional motor scale* [37]) og muskelstyrke blev evalueret efter tre og ni uger. På trods af det lille antal patienter gav resultaterne begrundet formodning om, at fenylbutyrat har en gavnlig virkning. Forfatterne gør dog opmærksom på, at en dobbeltblind undersøgelse er nødvendig, hvis man skal kunne dokumentere, at de øjensynligt positive præliminære resultater er reelle.

Behandling af fibroblastkulturer fra SMA-patienter med valproat har vist sig at forøge mængden af både *SMN2*-mRNA og hTra2β1-mRNA, der er nødvendig for den korrekte splejsning [32]. Valproat er velkendt fra behandling af epilepsi, det er meget lovende som en mulig behandling af SMA-patienter, og flere forsøg er i gang.

På trods af vor viden om de genetiske årsager til SMA er der stadig mange uløste spørgsmål. Der er ingen tvivl om, at SMA skyldes mangel på *SMN1*, men den fulde betydning af *SMN2* er ikke klar. Selv om der er en tydelig korrelation mellem antallet af *SMN2*-kopier og SMA-typen, er denne korrelation ikke entydig. Patienter med SMA-type I og tre *SMN2*-kopier er beskrevet, ligesom der findes søskende, med samme *SMN*-genotype, hvor den ene er syg, mens den anden er fuldstændig rask. Analyse af lymfoblastcellelinjer fra ni sådanne diskordante søskendepar viste, at den raske søskende producerede en signifikant højere mængde *SMN*-protein end den syge. Dette tyder på tilstedeværelsen af andre gener af betydning for SMA-fænotypen, såkaldte modificerende gener [38].

Korrespondance: Marianne Schwartz, Klinisk Genetisk Afdeling 4062, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: schwartz@rh.dk

Antaget: 24. marts 2004
Interessekonflikter: Ingen angivet

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Litteratur

- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70:358-68.
- Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. *Neuromuscul Disord* 1992;2:423-8.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 1995;52:518-23.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990;344:767-8.
- Melki J, Sheth P, Abdelhak S et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet* 1990;336:271-3.
- Wirth B, Voosen B, Rohrig D et al. Fine mapping and narrowing of the genetic interval of the spinal muscular atrophy region by linkage studies. *Genomics* 1993;15:113-8.
- Wirth B, Pick E, Leutner A et al. Large linkage analysis in 100 families with autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) and 11 CEPH families using 15 polymorphic loci in the region 5q11.2-q13.3. *Genomics* 1994;20:84-93.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155-65.
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O et al. Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 1996;32:479-82.
- Lefebvre S, Burret P, Liu Q et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 1997;16:265-9.
- Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996;15:3555-65.
- Coover DD, Le TT, McAndrew PE et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997;6:1205-14.
- Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G et al. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 2001;9:484-91.
- Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 2000;15:228-37.
- Wirth B, Herz M, Wetter A et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1999;64:1340-56.
- Wirth B, Schmidt T, Hahnen E et al. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1997;61:1102-11.
- Campbell L, Potter A, Ignatius J et al. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997;61:40-50.
- Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet* 1997;61:9-15.
- Schwartz M, Sorensen N, Hansen FJ et al. Quantification, by solid-phase minisequencing, of the telomeric and centromeric copies of the survival motor neuron gene in families with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997;6:99-104.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN1 and SMN2 gene copy number. *Am J Hum Genet* 1997;60:1411-22.
- Wirth B. Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002;3:87-95.
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:333-9.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6307-11.
- Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 2000;9:259-65.
- Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 2002;30:377-84.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 1998;19:63-6.
- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S et al. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9618-23.
- Hofmann Y, Wirth B, hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 2002;11:2037-49.
- Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A et al. Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med* 2000;6:957-68.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ et al. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9808-13.
- Andreassi C, Jarecki J, Zhou J et al. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 2001;10:2841-9.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2003;12:2481-9.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA et al. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 2003;54:647-54.
- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD et al. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 2004;12:59-65.
- Kleppe S, Mian A, Lee B. Urea cycle disorders. *Curr Treat Options Neurol* 2003;5:309-19.
- Mercuri E, Bertini E, Messina S et al. Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2004;14:130-5.
- Main M, Kairon H, Mercuri E et al. The Hammersmith functional motor scale for children with spinal muscular atrophy: a scale to test ability and monitor progress in children with limited ambulation. *Eur J Paediatr Neurol* 2003;7:155-9.
- Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F et al. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 2003;11:11-21.