

Diagnostyka preimplantacyjna w zapobieganiu chorobom o podłożu genetycznym – diagnostyka rdzeniowego zaniku mięśni (SMA – *spinal muscular atrophy*)

Preimplantation genetic diagnosis in prevention of genetic diseases – diagnostic of spinal muscular atrophy (SMA)

Liss Joanna¹, Bruszczyńska Anna¹, Łukaszuk Krzysztof^{1,2}

¹ Invicta, Kliniki i Laboratoria Medyczne, Gdańsk

² Klinika Położnictwa, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Streszczenie

Diagnostyka preimplantacyjna – PGD (preimplantation genetic diagnosis) jest metodą diagnostyczną pozwalającą na badanie genetyczne komórki jajowej przed jej zapłodnieniem lub zarodka przed wprowadzeniem go do macicy. Rdzeniowy zanik mięśni (SMA) jest drugą co do częstości występowania autosomalną recesywną chorobą letalną po mukowiscydozie. Genetycznym uwarunkowaniem choroby Werdniga-Hoffmana, która jest najczęstszym typem SMA, są homozygotyczne delecje zlokalizowane na chromosomie 5 (5q13.3), w obrębie genu SMN1. PGD pozwala na uniknięcie ryzyka wystąpienia wady genetycznej u przyszłego dziecka.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie diagnostyki preimplantacyjnej ukierunkowanej na zdiagnozowanie delecji w obrębie exonu 7, 8 SMN1 u 5 pacjentek z obciążonym wywiadem genetycznym.

Materiał i metody: Pary przystąpiły do zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego. Komórki jajowe zapładniano stosując metodę ICSI. W 3 dniu hodowli przeprowadzano biopsję blastomerów zarodków 6 i 8 komórkowych. Do identyfikacji mutacji w obrębie genu SMN1 wykorzystano reakcję nested PCR i analizę RFLP.

Wyniki: W przebiegu procedur *in vitro* oraz po przeprowadzeniu badań genetycznych zarodków u wszystkich par przeprowadzono transfer nieobciążonych delecją zarodków. Po 12 dniach od transferu stwierdzono pozytywny wynik HCG w surowicy krwi u czterech pacjentek. U jednej pacjentki wynik testu był negatywny.

Wnioski: Diagnostyka preimplantacyjna chorób jednogenowych jest skuteczną metodą, szczególnie w tych przypadkach, gdzie mutacje są wcześniej określone przez poradnie genetyczne, czyli tam, gdzie takie choroby w danej rodzinie już wystąpiły. Otwiera ona nowe horyzonty leczenia osób obciążonych nosicielstwem chorób genetycznych.

Słowa kluczowe: **diagnostyka preimplantacyjna / choroba Werdniga-Hoffmana / choroby genetyczne / choroby autosomalne recesywne / rdzeniowy zanik mięśni – SMA /**

Adres do korespondencji:

Joanna Liss
Invicta
ul. Rajska 10, 80-850 Gdańsk
tel. 58 7635262, fax. 58 7631476
e-mail: Joanna.Liss@invicta.pl

Otrzymano: 10.01.2010
Zaakceptowano do druku: 20.11.2010

Summary

Introduction: Preimplantation genetic diagnosis, PGD, is an established procedure allowing genetic research of the oocyte or embryo before implantation to the uterus.

A neurodegenerative disorder known as spinal muscular atrophy (SMA) is the second most common lethal autosomal recessive disease in Caucasians, after cystic fibrosis. There are three clinically different types of the disease, with type I (Werdnig-Hoffman Disease) being the most severe. Around 98% of clinical cases of SMA are caused by the homozygous absence of a region of exons 7 and 8 of the telomeric copy of the SMN gene (SMN1) on chromosome 5 (5q13.3).

Objectives: The aim of the present work was to performed PGD for SMA in 5 couples who had already had a child affected with SMA.

Material and Methods: All patients underwent a standard IVF procedure associated with intracytoplasmic sperm injection. 6-8 cell embryos were biopsied on day 3 of culture. Single cell nested PCR-RFLP protocol for PGD of SMA was used for the detection of the mutation.

Results: In the course of IVF-PGD procedures all patients had a transfer of embryos without SMN1 deletions. Four out of the five couples delivered healthy babies.

Conclusions: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of monogenic disorders is a very efficient method, especially for patients whose previous child is homozygous for genetic disorders. It offers new possibilities for the treatment for genetic disease carriers.

Key words: **preimplantation genetic diagnosis / Werdnig-Hoffman syndrome / genetic disease / recessive autosomal disease / spinal muscular atrophy – SMA /**

Wstęp

Diagnostyka preimplantacyjna jest metodą diagnostyczną pozwalającą na badanie genetyczne komórki jajowej przed jej zapłodnieniem lub zarodka przed wprowadzeniem go do macicy. Pozostaje ona w ścisłym związku z technikami wspomaganego rozrodu.

Po raz pierwszy diagnostykę preimplantacyjną zastosowano w przypadkach diagnostyki chorób dziedzicznych zgodnie z prawem Mendla: w przypadku mukowiscydozy oraz chorób sprzężonych z chromosomem X. Miało to miejsce w 1990 roku [1].

Obecnie zakres badań w ramach PGD jest bardzo szeroki, a nowoczesne metody diagnostyczne pozwalają wykluczyć wady genetyczne związane z nieprawidłową ilością i budową chromosomów, a także pozwalają wyeliminować ryzyko urodzenia chorego dziecka w rodzinach z pozytywnym wywiadem genetycznym.

Diagnostyka preimplantacyjna w porównaniu do diagnostyki prenatalnej pozwala na uniknięcie terminacji ciąży, szczególnie, gdy ryzyko wad genetycznych może być uwarunkowane nosicielstwem ze strony rodziców, np. translokacje, choroby genetyczne dziedziczone w sposób autosomalny dominujący lub recesywny.

Rdzeniowy zanik mięśni (*spinal muscular atrophy* – SMA) jest drugą, co do częstości występowania autosomalną recesywną chorobą letalną po mukowiscydozie. W około 95% przypadków za wystąpienie choroby odpowiedzialne są mutacje genu *SMN* (*survival of motoneuron*), a ściślej kopii telomerowej tego genu, określanej jako *SMN1*. Gen ten zlokalizowany jest w locus SMA umiejscowionym na długim ramieniu chromosomu 5 (5q13) [2, 3].

Wyróżnia się trzy typy SMA:

1. Typu I – choroba Werdniga-Hoffmana – o najgorszym rokowaniu, objawy widoczne są już przy urodzeniu lub

w pierwszych miesiącach życia, okres przeżycia to średnio 2-4 lata, jedynie w około 10% kilkunastoletni.

2. Typu II – choroba Dubowitza – osłabienie mięśni rozwija się między 6 a 12 miesiącem życia.
3. Typu III – choroba Kugelberga-Welander – początek choroby przypada na 18 miesiąc życia, chorzy mogą stać, chodzić, a śmierć następuje w dorosłości.

W najczęstszej postaci SMA (choroba Werdniga-Hoffmana) objawy kliniczne występują już w okresie życia płodowego.

Podstawę rozpoznania rdzeniowego zaniku mięśni stanowią wyniki badań: elektromiograficznego, histopatologicznego mięśnia i molekularnego. We wszystkich typach SMA (I-III) defekt molekularny polega na delecji eksonu 7 kopii telomerowej i jest odpowiedzialny za około 95% przypadków SMA. W pozostałych 5% przypadków wykazano występowanie mutacji o charakterze substytucji lub małych delecji, położonych w różnych częściach genu, zaburzających prawidłową ekspresję genu. Delecje w obrębie kopii centromerowej nie wywołują objawów klinicznych i występują u około 5% zdrowej populacji [2].

Obecnie najwcześniej diagnostyka molekularna SMA stosowana jest w badaniach prenatalnych, w rodzinach, w których wcześniej potwierdzono rozpoznanie SMA na poziomie molekularnym.

W Polsce jak dotąd nie było możliwe wykluczenie ryzyka urodzenia chorego dziecka u rodziców nosicieli wadliwego genu. INVICTA jako pierwsza i jedyna w Polsce klinika leczenia niepłodności wprowadziła taką możliwość. Na świecie diagnostyka preimplantacyjna w kierunku SMA stosowana jest od kilku lat.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było opracowanie testów diagnostycznych pozwalających na badanie pojedynczej komórki zarodka w kierunku delecji genu *SMN1* oraz zastosowanie ich w praktyce klinicznej.

Materiał i metody

W latach 2005-2009 do Kliniki Leczenia Niepłodności INVICTA w Gdańsku zgłosiło się 5 par, u których w wywiadzie stwierdzono przypadki urodzeń dzieci ze zdiagnozowaną i potwierdzoną badaniami molekularnymi chorobą Werdniga-Hoffmana. U 3 par miały miejsce zgony dzieci do 2 roku życia, natomiast 2 pary posiadają chore dziecko. U pacjentów nie stwierdzono problemów z płodnością. Ze względu na pozytywny wywiad genetyczny przystąpiono do leczenia z zastosowaniem technik wspomaganego rozrodu z diagnostyką preimplantacyjną w kierunku SMA typu I.

Stymulację hormonalną do zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego przeprowadzano z wykorzystaniem długiego protokołu [4]. Ocenę ultrasonograficzną wzrostu pęcherzyków i poziomu estradiolu w surowicy krwi przeprowadzano w 8 i 10 dniu stymulacji. Zabieg pobrania komórek jajowych wykonywano po 36 godzinach od podania 10 000 IU hCG. Komórki jajowe zapładniano stosując metodę docytoplazmatycznego podania plemnika do komórki jajowej – ICSI (*intracytoplazmic sperm injection*). Po 18 godzinach od ICSI oceniano zapłodnienia komórek jajowych.

Biopsję blastomerów przeprowadzono w 3 dobie hodowli, do biopsji kwalifikowano zarodki 6-8 komórkowe. Transfer zarodków nieobciążonych genetycznie przeprowadzono w 5 dobie hodowli.

Analiza delecji genu *SMN1*

Do identyfikacji mutacji w obrębie genu *SMN1* wykorzystano reakcję PCR z zastosowaniem dwóch par starterów – nested PCR i analizy RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) z udziałem enzymu Hinf I [3].

Pojedyncze komórki po biopsji umieszczano w buforze lizującym zawierającym proteinazę K i SDS.

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler ep gradient S (Eppendorff, Niemcy) stosując następujący program: wstępna denaturacja – 96°C, 5 min., następnie 10 cykli: 96°C – 45s, 56°C – 45s, 72°C – 1 min., a następnie 20 cykli: 94°C – 45s, 56°C – 45s, 72°C – 1 min., 72°C – 7 min. – końcowe wydłużanie. Kolejny PCR prowadzono przez 35 cykli stosując następujący program: 94°C – 45s, 56°C – 45s, 72°C – 1 min., 72°C – 7 min. – końcowe wydłużanie.

Po zakończonej amplifikacji do każdej z badanych prób dodano 10 U enzymu Hinf I i inkubowano w temp. 37°C przez 2 godz.

W celu zidentyfikowania produktów reakcji przeprowadzono ich rozdzielanie elektroforetyczne w 10% żelu poliakrylamidowym.

W wyniku amplifikacji fragmentu genu *SMN1* uzyskiwano produkt wielkości 262 bp. Produkt ten posiada w swej sekwencji dwa miejsca cięcia rozpoznawane przez enzym restrykcyjny HinfI. Jedno miejsce jest miejscem naturalnym, drugie obecne było w sekwencji startera używanego do amplifikacji badanego fragmentu genu, obejmujące miejsce delecji.

W przypadku prawidłowego wzoru uzyskiwano 3 produkty analizy RFLP. Obecność delecji w obrębie genu *SMN1* pozwalała uzyskać tylko dwa produkty cięcia (tylko z naturalnego miejsca w sekwencji), ze względu na brak (delecję) nukleotydu rozpoznawanego przez HinfI.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono szczegółowe dane dotyczące przebiegu programu zapłodnienia pozaustrojowego u poszczególnych pacjentek.

Po 12 dniach od transferu nieobciążonych delecją zarodków stwierdzono pozytywny wynik HCG w surowicy u czterech pacjentek. U jednej pacjentki wynik testu był negatywny. W trzech przypadkach po kolejnych dwóch tygodniach potwierdzono obecność pojedynczej ciąży, natomiast w jednym przypadku stwierdzono ciążę bliźniaczą.

U dwóch pacjentek przeprowadzono w xx tygodniu ciąży amniopunkcję w celu oceny kariotypu płodu oraz zweryfikowania wyniku diagnostyki preimplantacyjnej. Wskazaniem do wykonania w/w zabiegu był wiek pacjentek. Na podstawie badań molekularnych wyizolowanych komórek płodu potwierdzono wynik diagnostyki PGD, kariotypy płodów były prawidłowe.

Wszystkie ciąży zakończyły się urodzeniem zdrowych dzieci. Badania postnatalne wykluczyły jednoznacznie chorobę Werdniga-Hoffmana u wszystkich dzieci.

Dyskusja

Diagnostyka preimplantacyjna, wśród wielu innych możliwości, otwiera nowe horyzonty leczenia osób obciążonych nosicielstwem chorób genetycznych.

Przedstawiane w niniejszej pracy wyniki prezentują pierwsze w Polsce badania preimplantacyjne w zakresie chorób jednogenowych u pacjentów z obciążonym wywiadem genetycznym.

Diagnostyka preimplantacyjna chorób jednogenowych jest wysoce skuteczną metodą w sytuacjach, gdzie mutacje są wcześniej określone przez poradnie genetyczne, a więc w przypadkach, kiedy takie choroby w danej rodzinie już wystąpiły. Ułatwia to postępowanie diagnostyczne i ogranicza koszty przygotowywania metody badania komórek dla wskazanych pacjentów. Takim przypadkiem może być diagnostyka preimplantacyjna rdzeniowego zaniku mięśni, gdzie można przeprowadzać powtarzalną procedurę dla większości zdiagnozowanych rodzin.

Metoda diagnostyczna oparta jest o powszechnie obowiązującą procedurę z zakresu biologii molekularnej, diagnozującą przypadki SMA u dzieci i dorosłych. Jest ona dodatkowo zmodyfikowana, tak aby mogła mieć swoje zastosowanie w analizie pojedynczych komórek pochodzących z zarodków [3, 5, 6].

W przypadku diagnostyki preimplantacyjnej materiałem do analizy DNA jest pojedyncza komórka i jest to poza tym materiałem unikalny. Raz pobrana komórka musi służyć za matrycę DNA do całego badania. Nie można pobrać więcej komórek do analizy z zarodka 6-8 komórkowego.

Diagnostyka preimplantacyjna musi być przeprowadzona w trakcie całego procesu hodowli zarodka, który trwa maksymalnie 5 dni. Komórki do badań pobierane są w 3 dniu hodowli, tak więc na analizę i uzyskanie wyniku pozostają tylko 2 dni.

Metoda diagnostyczna musi być tak dopracowana, aby wszystkie powyżej wymienione kryteria były spełnione. Problemem, z którym można się spotkać podczas PGD jest utrata jednego z badanych alleli (*ADO – allele drop out*). Jest to zjawisko, które może mieć miejsce w przypadku amplifikacji bardzo małej ilości materiału genetycznego [7].

Tabela I. Dane embriologiczne przeprowadzonych programów zapłodnienia pozaustrojowego.

pacjent	wiek	Data programu	Ilość pęcherzyków uzyskanych podczas stymulacji	Ilość pobranych komórek jajowych (%)	Ilość dojrzałych komórek jajowych (%)	Ilość zapłodnionych komórek jajowych (%)	Ilość zarodków 6-8 komórkowych w 3 dobie hodowli (%)	Ilość zarodków do embriotransferu	Uzyskane ciąży
1	37	11.2005	20	15 (75)	14 (93)	10 (72)	10 (100)	3 (30)	nie
	38	05.2006	15	10 (67)	7 (70)	6 (86)	5 (83)	1 (20)	tak
2	36	03.2007	19	18 (95)	9 (50)	6 (67)	6 (100)	2 (33)	tak
3	29	08.2008	18	18 (100)	17 (94)	12 (71)	10 (83)	1 (10)	tak
4	35	11.2007	25	22 (88)	19 (86,4)	12 (63)	10 (83)	1 (10)	nie
	36	08.2008	30	27 (90)	24 (89)	17 (71)	14 (82)	2 (14)	nie
	37	01.2009	27	26 (96)	20 (77)	9 (45)	6 (67)	2 (33)	tak
5	30	04.2009	16	16 (100)	16 (100)	10 (63)	10 (100)	2 (20)	nie

Tabela II. Wyniki diagnostyki preimplantacyjnej badanych zarodków u poszczególnych pacjentek.

pacjent	Data programu	Ilość zarodków do biopsji	Ilość zarodków, u których uzyskano amplifikację DNA (%)	Częstość występowania delecji w genie SMN1 w układzie homozygotycznym	Brak delecji w genie SMN1 w układzie homozygotycznym	Mrożenie zarodków
1	11.2005	10	8 (80)	5 (63)	3 (37)	0
	05.2006	5	5 (100)	4 (80)	1 (20)	0
2	03.2007	6	6 (100)	2 (33)	4 (67)	2
3	08.2008	10	9 (90)	5 (56)	4 (44)	2
4	11.2007	10	9 (90)	6 (67)	3 (33)	2
	08.2008	14	12 (86)	6 (50)	6 (50)	0
	01.2009	6	5 (83)	3 (60)	2 (40)	0
5	04.2009	10	9 (90)	3 (33)	6 (67)	4

Metoda diagnostyczna musi być wobec tego tak dopracowana, aby ryzyko wystąpienia tego zjawiska było jak najmniejsze. Niemniej jednak może ono mieć miejsce. Jest to związane ze sposobem przygotowania komórki do bezpośredniej analizy PCR. Metody diagnostyczne stosowane w PGD muszą więc spełniać bardzo restrykcyjne kryteria [8, 9].

Przedstawiane w niniejszej pracy przypadki pacjentów wskazują potrzebę stosowania tego typu diagnostyki w rodzinach obciążonych chorobą genetyczną. PGD pozwala zminimalizować ryzyko urodzenia się dziecka z chorobą genetyczną.

Wnioski

Diagnostyka preimplantacyjna chorób jednogenowych jest skuteczną metodą, szczególnie w tych przypadkach, gdzie mutacje są wcześniej określone przez poradnie genetyczne, czyli tam, gdzie takie choroby w danej rodzinie już wystąpiły. Otwiera ona nowe horyzonty leczenia osób obciążonych nosicielstwem chorób genetycznych.

Zastosowanie PGD w przebiegu technik wspomaganego rozrodu pozwala wyeliminować konieczność przedterminowego zakończenia ciąży, związanego z występowaniem wady genetycznej płodu.

Piśmiennictwo

- Kuliev A, Verlinsky Y. An Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. New York: *The Parthenon Publishing Group*. 2000.
- Mazurczak T, Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J, [i wsp.]. Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce rdzeniowego zaniku mięśni (SMA). Ekspertyza naukowa wykonana na zlecenie Ministerstwa Zdrowia, Warszawa. 2003.
- Daniels G, Pettigrew R, Thornhill A, [et al.]. Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy. *Mol Hum Reprod*. 2001, 7, 995-1000.
- Lukaszuk K, Liss J, Lukaszuk M, [et al.]. Optimization of estradiol supplementation during the luteal phase improves the pregnancy rate in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2005, 83, 1372-1376.
- Burlet P, Frydman N, Gigarel N, [et al.]. Improved single-cell protocol for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Fertil Steril*. 2005, 84, 734-739.
- Girardet A, Fernandez C, Claustres M. Efficient strategies for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Fertil Steril*. 2008, 90, 443.e7-12.
- Spits C, Sermon K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn*. 2009, 29, 50-56.
- Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications. *Reprod Biomed Online*. 2008, 16, 532-538.
- Renwick P, Ogilvie C. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007, 7, 33-43.