

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN

Jakub P. Fichna

**Identyfikacja i kompleksowa charakterystyka
podłoża genetycznego rzadkich miopatii
i dystrofii mięśniowych w populacji polskiej**

Praca doktorska wykonana w Pracowni Neurogenetyki IMDiK PAN

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Cezary Żekanowski

Warszawa 2017

Panu Profesorowi Cezaremu Żekanowskiemu - promotorowi mojej pracy wyrażam wielką wdzięczność za wszystkie uwagi, pomoc w realizacji badań i cierpliwość w dyskusjach nad ich opisem.

Zespołowi Kliniki Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego - Pani Profesor Annie Kamińskiej, Pani Profesor Annie Kosterze-Pruszczyk, Pani Doktor Annie Macias i Pani Doktor Annie Potulskiej-Chromik - dziękuję za udział w doborze pacjentów i wspólną ocenę kliniczno-genetyczną.

Pani Profesor Jolancie Rędowicz i współpracownikom z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, oraz Panu Profesorowi Sławomirowi Filipkowi i współpracownikom z Uniwersytetu Warszawskiego bardzo dziękuję za nieocenioną pomoc w analizach histochemicznych i modelowaniu struktur białek.

Pani Profesor Marii Barcikowskiej oraz pracownikom Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, a zwłaszcza Koleżankom i Kolegom z Zespołu Kliniczno-Badawczego Chorób Zwyrodnieniowych CUN dziękuję za stałą życzliwość i wsparcie mojej pracy.

Osobom mi najbliższym jestem wdzięczny za znoszenie ograniczeń mojego czasu i za codzienne wsparcie.

Badania przedstawione w rozprawie były finansowane z:

- projektu KNOW “The search for new biomarkers of civilization diseases using high-throughput techniques and modern diagnostic imaging”,
- grantu NCN, 2013/09/B/NZ4/03258,
- grantu NCN, 2015/19/N/NZ2/02915.

Wyniki zamieszczone w rozprawie zostały częściowo opublikowane w następujących artykułach:

- Fichna JP et al.: Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families. PLoS One. 2014 Dec 26;9(12):e115470.
- Fichna JP et al.: A novel dominant D109A CRYAB mutation in a family with myofibrillar myopathy affects α B-crystallin structure. BBA Clin. 2016 Nov 11;7:1-7.
- Fichna JP et al.: Whole-exome sequencing identifies novel pathogenic mutations and putative phenotype-modifying variants in Polish limb-girdle muscular dystrophy patients. (*wysłane do redakcji*)

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1 Wstęp	7
1.1 Dystrofie obręczowo-kończynowe i miopatie miofibrylarne	7
1.2 Diagnostyka różnicowa	11
1.3 Sekwencjonowanie nowej generacji	12
2 Cele pracy	14
3 Pacjenci, materiały oraz metody	15
3.1 Pacjenci	15
3.2 Izolacja DNA genomowego	16
3.3 Sekwencjonowanie eksomowe oraz podstawowa analiza bioinformatyczna	16
3.4 Bioinformatyczna analiza wyników sekwencjonowania eksomowego	17
3.4.1 Analiza korelacji genotypu z fenotypem	19
3.4.2 Poszukiwanie genów kandydujących	19
3.4.3 Analiza wariantów zmiany liczby kopii	20
3.5 Procedura oceny patogenności wstępnie przefiltrowanych wariantów	20
3.5.1 Sekwencjonowanie metodą Sanger	21
3.5.2 Określanie wpływu mutacji na strukturę białka	22
3.5.3 Ocena zmiany rozmieszczenia zmutowanych białek w strukturze mięśnia	22
3.6 Poszukiwanie mutacji w genie <i>DES</i> oraz identyfikowanie sekwencji mikrosatelitarnych	23
4 Wyniki	24
4.1 Mutacje w genie <i>DES</i> : identyfikacja i kompleksowa charakterystyka	24
4.2 Zastosowanie sekwencjonowania eksomowego do określania genetycznego podłoża LGMD i MFM	24

4.2.1	Wyniki analizy korelacji genotypu z fenotypem	24
4.2.2	Wyniki wyszukiwania wariantów w genach z ekspresją w mięśniach	35
4.2.3	Wyniki analizy wariantów zmiany liczby kopii	37
5	Dyskusja	39
5.1	Charakterystyka podłoża genetycznego LGMD i MFM w populacji polskiej	39
5.2	Algorytmy poszukiwania mutacji sprawczych i modyfikujących fenotyp kliniczny	45
5.3	Oligogenowe choroby mendlowskie	49
6	Podsumowanie	50
7	Wnioski	52
8	Streszczenie	53
9	Abstract	55
10	Spis rycin i tabel	57
11	Uzupełnienie	58
12	Piśmiennictwo	64

Wykaz skrótów:

AD	dziedziczenie autosomalne dominujące	autosomal dominant inheritance
AR	dziedziczenie autosomalne recesywne	autosomal recessive inheritance
CK	kinaza fosfokreatynowa	creatine phosphokinase
CM	miopatie wrodzone	congenital myopathies
CMT	choroba Charcot-Marie-Tooth	Charcot-Marie-Tooth disease
CNV	wariant zmiany liczby kopii	copy number variant
CPPC	wrodzona zaćma biegunowa tylna	congenital posterior pole cataract
DAPC	kompleks białek związanych z dystrofiną	dystrophin-associated protein complex
EDMD	dystrofia Emery-Dreifussa	Emery-Dreifuss muscular dystrophy
EMG	elektromiografia	electromyography
ExAC		the Exome Aggregation Consortium
FSHD	dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramieniowa	facioscapulohumeral muscular dystrophy
HPO		the Human Phenotype Ontology
KEGG		Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LGMD	dystrofie obręczowo-kończynowe	limb-girdle muscular dystrophies
LOVD		Leiden Open Variation Database
MAF	częstość występowania rzadszego allelu	minor allele frequency
MDDGA	dystroglikanopatia typu A	muscular dystrophy-dystroglycanopathy , type A
MDDGB	dystroglikanopatia typu B	muscular dystrophy-dystroglycanopathy , type B
MFM	miopatie miofibrilarne	myofibrillar myopathies
NGS	sekwencjonowanie nowej generacji	next generation sequencing
OMIM		Online Mendelian Inheritance in Man
SCPNK	miopatia łopatkowo-strzałkowa typu Kaisera	scapuloperoneal syndrome neurogenic Kaiser-type
SNV	wariant pojedynczego nukleotydu	single nucleotide variant
STR	krótkie powtórzenia tandemowe	short tandem repeats
WES	sekwencjonowanie całego eksomu	whole exome sequencing
WGS	sekwencjonowanie całego genomu	whole genome sequencing

1 Wstęp:

1.1 Dystrofie obręczowo-kończynowe i miopatie miofibrylarne

Miopatie to grupa chorób pierwotnie mięśniowych, charakteryzująca się nieprawidłowym funkcjonowaniem włókien mięśniowych i w konsekwencji osłabieniem siły mięśni. Należące do miopatii dystrofie obręczowo-kończynowe (ang. *limb girdle muscular dystrophies*, LGMD) oraz miopatie miofibrylarne (ang. *myofibrillar myopathies*, MFM) stanowią heterogenne grupy rzadkich schorzeń o nakładających się fenotypach klinicznych.

Badania w Wielkiej Brytanii i Holandii szacują częstość występowania LGMD na 1/44000 – 1/123000 [1–3]. Częstość zachorowań na MFM jest jeszcze mniejsza, ale nie była dotąd dokładnie określona [4]. Klasyfikacja podtypów LGMD wynika bezpośrednio z określenia genetycznej przyczyny choroby. Podgrupa LGMD1 obejmuje postaci dziedziczone autosomalnie dominująco i składa się z ośmiu podtypów, każdy powodowany mutacją innego genu. Zachorowania w podgrupie LGMD2 dziedziczone są autosomalnie recesywnie i obejmują 26 podtypów, wyróżnianych na podstawie mutacji przyczynowych w różnych genach. Analogicznie, MFM dzielone są na 6 podtypów. Opisana klasyfikacja jest klasyfikacją otwartą, i wraz z identyfikowaniem kolejnych genów sprawczych jest powiększana o nowe podtypy.

Różnicowanie pomiędzy wyżej wymienionymi jednostkami chorobowymi, a zwłaszcza między ich podtypami, jedynie na podstawie cech kliniczno-patologicznych, jest niezwykle trudne. Wszystkie podtypy posiadają cechy wspólne, choć niektóre objawy są charakterystyczne dla tylko kilku z nich. Ponadto zmienność fenotypów obserwuje się nie tylko w obrębie poszczególnych podtypów, ale również w przypadkach z tą samą mutacją przyczynową, a czasem nawet w obrębie tej samej rodziny. Ponadto mutacje w niektórych genach mogą stanowić przyczynę różnych jednostek klinicznych [5]. Na przykład mutacje *DES* czy *MYOT*, mogą być przyczyną LGMD lub MFM, a mutacje *TRIM23* oraz *TTN* są związane zarówno z LGMD, jak i z miopatiami wrodzonymi (ang. *congenital myopathies*, CM). Niemniej, identyfikacja mutacji związanych przyczynowo z chorobą (mutacji sprawczych) jest uznawana za najbardziej precyzyjną metodę diagnostyczną, sugerującą molekularny mechanizm patologii.

Pomimo badań trwających od blisko dwóch dekad, podłoże genetyczne wspomnianych miopatii znane jest jedynie dla części przypadków. Wraz z wprowadzeniem metod sekwencjonowania nowej generacji, udział przypadków ze zidentyfikowaną prawdopodobną

mutacją sprawczą wzrósł z około 20-40% do 40-60% [6]. Oprócz mutacji typowo sprawczych u pacjentów znajduje się także zmiany modyfikujące fenotyp kliniczny. Na przykład, w dystrofinopatii (chorobie zbliżonej fenotypowo do LGMD) powszechny polimorfizm genu *LTPB4* jest czynnikiem wpływającym na wiek zachorowania [7]. Co więcej, w niektórych przypadkach chorób mięśni, w tym w kalpainopatii (LGMD2A), przyjmuje się istnienie dziedziczenia dwugennowego [8].

Zidentyfikowanie mutacji sprawczej może być niezwykle istotne dla zastosowania odpowiednich procedur kontroli stanu zdrowia pacjenta. W niektórych podtypach chorób mięśni możliwy jest rozwój kardiomiopatii, wystąpienie zaburzeń połykania, czy niewydolności oddechowej. Chociaż dotychczas nie opracowano skutecznej terapii, ani LGMD, ani MFM, to stosowane są terapie objawowe, paliatywne, dostosowane do obserwowanych jak i mogących się pojawić w danym podtypie choroby, objawów. Przy kwalifikowaniu do badań klinicznych nowych celowanych terapii wymagana jest jak najdokładniejsza informacja o konkretnym podtypie choroby i zidentyfikowanych przyczynach genetycznych [9–12]. Poznanie mutacji sprawczych oraz zmienności genetycznej modulującej przebieg choroby, a zwłaszcza wariantów zlokalizowanych w genach dotychczas nie związanych z LGMD, MFM i szerzej - miopatiami, będzie zapewne kluczowe dla wyjaśnienia patomechanizmu tej klasy schorzeń mięśni. Określenie funkcjonalnego znaczenia produktów białkowych czy efektorowych RNA powstających na matrycach zmutowanych genów wskaże na ulegające dysfunkcji szlaki biochemiczne i sygnałowe, czy struktury komórkowe, uczestniczące w tworzeniu fenotypu klinicznego. Tym samym stałoby się możliwe zaproponowanie "przyczynowej" klasyfikacji miopatii i dystrofii, odwołującej się do zmian na poziomie biochemicznym i komórkowym, odmiennie od obecnej, opartej na rodzaju uszkodzonego genu oraz na ogólnym obrazie klinicznym. Rezultatem badań podstawowych może być też zaproponowanie nowych kierunków badań zmierzających do opracowania przyczynowych sposobów leczenia, nakierowanych na konkretne, dysfunkcyjne mechanizmy molekularne.

W rozdziale "Uzupełnienie" przedstawiono klasyfikację dystrofii obręczowo-konieczynowych oraz miopatii miofibrilarnych, wraz z krótką charakterystyką kliniczną poszczególnych podtypów. Aktualna klasyfikacja LGMD, z podanymi sposobem dziedziczenia oraz mutacjami sprawczymi konkretnych genów przedstawiona jest skrótowo w Tabeli 1. Analogicznie poszczególne podtypy MFM przedstawione są w Tabeli 2.

Tabela 1. Klasyfikacja dystrofii obręczowo-kończynowych. Dodatkowo podano możliwe warianty fenotypowe związane z mutacjami konkretnego genu.

podtyp	gen	białko	fenotypy alternatywne
LGMD1A	MYOT	miotylina	MFM
LGMD1B	LMNA	lamina A/C	kardiomiopatia, CMT2B1, EDMD2, EDMD3, lipodystrofia progeria
LGMD1C	CAV3	kaweolina 3	kardiomiopatia. Miopatia Tateyama, miopatia z falowaniem mięśni, zespół długiego QT 9
LGMD1D	DES	desmina	MFM, LGMD2R, kardiomiopatia
LGMD1E	DNAJB6	homolog DNAJ/HSP40, podrodzina B, 6. członek podrodziny	
LGMD1F	TNPO3	transportyna 3	
LGMD1G	HNRPDL	białko podobne do heterogenicznej jądrowej rybonukleiny D	
LGMD1H	nieznany		
LGMD2A	CAPN3	kalpaina 3	
LGMD2B	DYSF	dysferlina	miopatia Miyoshi
LGMD2C	SGCG	sarkoglikan gamma	
LGMD2D	SGCA	sarkoglikan alfa	
LGMD2E	SGCB	sarkoglikan beta	
LGMD2F	SGCD	sarkoglikan delta	kardiomiopatia rozstrzeniowa
LGMD2G	TCAP	teletonina	kardiomiopatia rozstrzeniowa
LGMD2H	TRIM32	białko genu 32 z motywem receptora TRIM	zespół Bardeta i Biedla

LGMD2I	FKRP	białko podobne do fukutyny	dystrofia wrodzona z przerostem mięśni
LGMD2J	TTN	tytyna	kardiomiopatia rozstrzeniowa / przerostowa, dystrofia mięśniowa piszczelowa
LGMD2K	POMT1	białkowa o -mannozylotransferaza 1	MDDGA1, MDDGB1, zespół Walkera-Warburga
LGMD2L	ANO5	anoktamina 5	miopatia Miyoshi
LGMD2M	FKTN	fukutyna	kardiomiopatia, MDDGA4, MDDGB4
LGMD2N	POMT2	białkowa o -mannozylotransferaza 2	MDDGA2, MDDGB2
LGMD2O	POMGNT1	białkowa o-mannozylo beta-1,2-N-acetyloglukosaminylotransferaza	
LGMD2P	DAG1	destroglikan	
LGMD2Q	PLEC1	plektyna 1	pęcherzowe oddzielenie się naskórka
LGMD2R	DES	desmina	MFM, LGMD1D, kardiomiopatia
LGMD2S	TRAPPC11	białkowy kompleks transportujący / segregujący, podjednostka 11	
LGMD2T	GMPPB	beta transferaza guanylylo-mannozylo-1-fosforanowa	MDDGA14, MDDGB14
LGMD2U	ISPD	białko obejmujące domenę syntazy izoprenoidowej	MDDGA7
LGMD2V	GAA	glukozydaza alfa 1-4	choroba spichrzeniowa glikogenu II
LGMD2W	LIMS2	LIM i białko podobne do antygeny komórek starzejących się 2	
LGMD2X	BVES	białko nasierdziowych naczyń krwionośnych	
LGMD2Y	TOR1AIP1	białko 1 oddziałujące z torsyną A	

LGMD2Z	POGLUT1	o-glukozylotransferaza białkowa	choroba Dowlinga - Degosa 4
--------	---------	---------------------------------	-----------------------------

Tabela 2. Klasyfikacja miopatii miofibrylarnych.

podtyp	gen	białko	Inne fenotypy
MFM1	DES	desmina	LGMD1D, LGMD2R, kardiomiopatia rozstrzeniowa
MFM2	CRYAB	krystalina Alfa-B	kardiomiopatia rozstrzeniowa, zaćma, EDMD, lipodystrofia
MFM3	MYOT	miotylina	LGMD1A, miopatia ciał sferoidalnych
MFM4	DES	desmina	MFM, LGMD2R, kardiomiopatia, SCPNK
MFM5	FLNC	filamina C	kardiomiopatia przerostowa, kardiomiopatia restrykcyjna, miopatia dystalna
MFM6	BAG3	białko BAG3, atanogen związany z BCL2	kardiomiopatia rozstrzeniowa
MFM-like	DNAJB6	homolog DNAJ/HSP40, podrodzina B, 6. członek podrodziny	LGMD1E
MFM-like	FHL1	białko czterech i pół domeny LIM	EDMD6, miopatia ciał zredukowanych, miopatia łopatkowo-strzałkowa

LGMD: dystrofia obręczowo-kończynowa, MFM: miopatia miofibrylarna, CMT: Choroba Charcot-Marie-Tooth, MDDGA: dystroglikanopatia typu A, MDDGB: dystroglikanopatia typu B, EDMD: dystrofia Emery-Dreifussa, SCPNK: miopatia łopatkowo-strzałkowa typu Kaisera; dodatkowe litery i cyfry oznaczają konkretny podtyp choroby

1.2 Diagnostyka różnicowa

Precyzyjne diagnozowanie LGMD jest często trudne ze względu na heterogenność fenotypową tej klasy chorób. Wstępna ocena opiera się na analizie historii choroby oraz wywiadu rodzinnego, klinicznym badaniu przedmiotowym, a także na badaniu elektromiograficznym. Przydatne bywa oznaczenie poziomu kinazy kreatynowej (CK) w surowicy. Określenie konkretnego podtypu choroby wymaga badań biochemicznych skrawków mięśni chorego oraz identyfikowania zmienionych wzorów lokalizacji, masy molekularnej lub ilości białek (histopatologia, immunohistochemia, Western blot), z ostatecznym potwierdzeniem rozpoznania poprzez identyfikację mutacji sprawczej.

W badaniach histopatologicznych oraz immunohistochemicznych można określić brak, nadmiar lub nieprawidłową lokalizację charakterystycznych białek mięśniowych, takich jak dystrofina, dysferlina czy sarkoglikany, co umożliwia wytypowanie genu lub genów należących do tego samego szlaku biochemicznego lub struktury, których mutacja mogła być przyczyną zachorowania [13]. Mimo to u większości pacjentów z klinicznie zdiagnozowanym LGMD nie udaje się określić genetycznej przyczyny choroby, przede wszystkim ze względu na stosowanie w dotychczasowej diagnostyce genetycznej metod klasycznego, sekwencjonowania sangerowskiego. Techniczne, ale także czasowe i finansowe ograniczenia wspomnianego podejścia powodują, że sekwencjonowanych jest jeden lub maksymalnie kilka wybranych genów lub wręcz tylko te ich fragmenty, w których lokują się najbardziej powszechnie występujące mutacje. Taki algorytm diagnostyczny wyklucza poszukiwanie zmian w wielu genach równocześnie, czy też w genach wiązanych dotychczas z podobnymi fenotypami klinicznymi. Tym samym niemożliwe staje się wykrywanie mutacji w genach nie wiązanych dotychczas z daną jednostką chorobową, a tym mniej ukazanie pełniejszego podłoża genetycznego konkretnego schorzenia.

1.3 Sekwencjonowanie nowej generacji

Coraz szersze stosowanie wielkoskalowych metod wysokoprzepustowych zmienia skuteczność diagnostyki molekularnej. Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji, chociażby poprzez analizę panelu genów wiązanych z różnymi miopatiami, umożliwia postawienie diagnozy i określenie mutacji sprawczej u 40-60% pacjentów [6]. Stosunkowo duża liczba chorych bez określonej mutacji sprawczej, wskazuje jednak na istnienie nierozpoznanych dotychczas genetycznych i być może pozagenetycznych przyczyn miopatii, które nie mogą być wyjaśnione metodami standardowego poszukiwania mutacji znanych i sekwencjonowania pojedynczych genów, czy nawet zestawów genów [14]. Dotyczy to zwłaszcza fenotypów łagodnych oraz przypadków o pośrednim, niejednoznacznym obrazie klinicznym.

Sekwencjonowanie nowej generacji polega na masowym, równoległym sekwencjonowaniu pofragmentowanego genomowego DNA, generując setki milionów odczytów. Aktualnie na rynku dostępnych jest wiele platform sekwencjonowania nowej generacji opartych na różnych technologiach, takich jak pirosekwencjonowanie (Roche-454), sekwencjonowanie przez ligację (AB SOLiD), sekwencjonowanie z detekcją jonów (Ion Torrent), sekwencjonowanie w nanoporach (Nanopore), sekwencjonowanie przez syntezę (Illumina i PacBio) [15–17]. Metoda sekwencjonowania przez syntezę na platformie Illumina

jest w ostatnich latach wykorzystywana najpowszechniej, ze względu na wysoką wiarygodność oraz wydajność i stosunkowo niskie koszty badania. Sekwencjonowanie nowej generacji umożliwia wykrywanie wariantów genetycznych w skali całego eksomu lub genomu, w wyniku zastosowania sekwencjonowania całego eksomu (ang. *whole exome sequencing*, WES) lub genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS).

Wspomniane metody wielkoskalowe wraz z zaawansowaną analizą bioinformatyczną przyczyniają się do powolnych, ale zasadniczych zmian koncepcji chorób uwarunkowanych genetycznie i - szerzej - klasycznej definicji przyczynowości genetycznej. Dotychczas w przypadkach chorób rzadkich, z założenia uznawanych za monogenowe, poszukiwane były rzadkie mutacje w konkretnym genie sprawczym, lub kandydującym do tego miana [18]. Przekształcanie paradygmatu redukcjonistycznego, w kierunku bardziej pełnego rozumienia wpływu mutacji na fenotyp rozpoczęło się jeszcze w "erze sangerowskiej", wraz z identyfikowaniem coraz większej liczby mutacji tego samego genu powodujących rozbieżne fenotypy kliniczne [19–21]. Mechanizmy tego zjawiska mogą być różne, od wpływu różnych mutacji tego samego genu na różne funkcjonalne domeny kodowanego przezeń białka, zmiany profili izoform mRNA (powodowane przez zmiany składania genowego –ang. *splicingu*), po szeroki kontekst genomowy modulujący wpływ konkretnych mutacji. Wykorzystanie metod sekwencjonowania nowej generacji potwierdza skomplikowaną zależność między genotypem a fenotypem klinicznym. Niektóre przypadki badane takimi metodami prezentują rozszerzone spektrum objawów mutacji danego genu, ale są też takie pokazujące, że nawet znane patogenne mutacje mogą dawać bardzo łagodny, wręcz subkliniczny fenotyp [22–24]. Można oczekiwać, że mutacje "dodatkowe", towarzyszące mutacjom uznawanym dotąd za sprawcze, możliwe do zidentyfikowania metodami wielkoskalowymi, są zlokalizowane w genach kodujących elementy funkcjonalne tego samego procesu biochemicznego lub tej samej struktury komórkowej. Mutacje "dodatkowe" należałoby zatem traktować jako składniki większych całości genetycznych, tworzących podstawy cech fenotypowych, odpowiedzialnych m.in. za heterogenność objawów klinicznych czy zmienną penetrację. W najprostszym ujęciu choroby monogenowe można zapewne uznać za choroby oligogenowe lub wręcz poligenowe, z zasadniczą mutacją ukierunkowującą oraz zmienną osobniczo konstelacją wariantów genetycznych modyfikujących lub wręcz zmieniających fenotyp kliniczny.

2 Cele pracy:

Określenie podłoża genetycznego, a w szczególności mutacji sprawczych, w grupie chorych z rozpoznaniem MFM, LGMD i klinicznych fenotypów pokrewnych, z populacji polskiej.

Określenie możliwego znaczenia funkcjonalnego zidentyfikowanych wariantów genomowych.

Określenie możliwych korelacji między genotypem, a fenotypem klinicznym.

Wytypowanie genów kandydujących, których mutacje mogą wpływać na wystąpienie i stopień nasilenia objawów choroby (geny sprawcze, współsprawcze i modyfikujące fenotyp).

Oszacowanie udziału podtypów LGMD i MFM wśród chorych z miopatiami w populacji polskiej.

Zaproponowanie podstaw nowego podziału MFM i LGMD, opartego na wskazaniu nowych elementów biochemicznych i strukturalnych, mogących leżeć u podłoża tych chorób.

3 Pacjenci, materiały oraz metody:

3.1 Pacjenci

Badania prowadzono w grupie chorych z klinicznym rozpoznaniem LGMD i MFM, bez wcześniej wykrytych mutacji sprawczych. Pacjenci, pochodzący z całej Polski, zostali zdiagnozowani w Klinice Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pełniącej rolę nieformalnego krajowego centrum referencyjnego (do roku 2016 Klinika kierowana była przez prof. dr hab. Annę Kamińską, a obecnie przez prof. dr hab. Annę Kosterę-Pruszczyk). Dzięki uprzejmości prof. Anny Kamińskiej oraz prof. Anny Kostery-Pruszczyk, we współpracy z dr Anną Macias oraz dr hab. Anną Potulską-Chromik uzyskano próbki krwi do izolacji DNA od 85 pacjentów z 84 rodzin z klinicznym rozpoznaniem dystrofii mięśniowej, oraz od 20 pacjentów z 11 rodzin z kliniczną diagnozą desminopatii (podtyp MFM). Dodatkowo zebrano 16 próbek od zdrowych członków rodzin ryzyka LGMD, oraz 8 próbek od zdrowych członków rodzin ryzyka MFM. Jako formę kontroli przy ocenie wyników sekwencjonowania wykorzystano wyniki z innych badań sekwencjonowania eksomowego i genomowego 16 pacjentów bez objawów mięśniowych z chorobą Alzheimera i zespołem Gillesa de la Tourette'a. Pacjenci ci zostali zdiagnozowani w Klinice Neurologii szpitala MSWiA, oraz Klinice Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszyscy wyrazili pisemną zgodę na pobranie materiału genetycznego i przeprowadzanie na nim badań naukowych, a badania uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Bioetycznej.

Diagnozę kliniczną przeprowadzono w Klinice Neurologii WUM na podstawie objawów i oceny biopsji mięśni. LGMD zdefiniowano jako postępujące osłabienie mięśni z zanikiem mięśni obręczy barkowej i miednicznej oraz mięśni proksymalnych kończyn, bez zajęcia mięśni twarzy. Dołączono dziecięce przypadki asymptomatyczne trwałej hiperCK-emii (podwyższonego poziomu kinazy kreatynowej w surowicy) w przypadku, gdy biopsja mięśnia wykazywała wyraźne histopatologiczne cechy dystrofii mięśni. Dwa przypadki miopatii Miyoshi zostały dołączone ze względu na ich znaczne genetyczne i kliniczne podobieństwo do podtypów LGMD2B i 2L. W grupie badanej znalazło się też 12 przypadków z nieklasyczną manifestacją choroby mięśni, gdzie LGMD było jednym z rozważanych rozpoznań. Rozpoznanie MFM przeprowadzono głównie na podstawie wyników elektromiografii (EMG), a ostatecznym potwierdzeniem było wykrycie charakterystycznych ektopowych agregacji białkowych w biopsji mięśni. Wśród przypadków z rozpoznaniem MFM do analizy WES zakwalifikowano jedynie siedmiu pacjentów: czterech bez wykrytej we wstępnej analizie

mutacji w genie kodującym desminę i trzech, u których pomimo wykrycia prawdopodobnie sprawczej mutacji w genie *DES* fenotyp sugerował dodatkowe mutacje modyfikujące.

3.2 Izolacja DNA genomowego

W celu izolacji DNA z krwi obwodowej pobierano około 10 ml krwi do probówek z 0,5 ml 0.5M roztworu EDTA. Izolację genomowego DNA wykonano standardową metodą stopniowego wysalania białek komórkowych (6M NaCl) z enzymatycznym usunięciem zanieczyszczeń białkowych proteinazą K [25]. Uzyskany DNA wytrącano i wstępnie przechowywano w 96% alkoholu etylowym, a następnie przed pierwszym użyciem rozpuszczano w wodzie podwójnie destylowanej i dejonizowanej (DirectQ, Millipore) oraz przechowywano w -20°C. Stężenie oraz stopień czystości wyizolowanego DNA określano spektrofotometrycznie (NanoDrop2000, Thermo Scientific). Stężenie DNA w roztworze oznaczano zgodnie z prawem Lamberta-Beera, mierząc absorbancję przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Stopień zanieczyszczenia preparatu białkami oceniano poprzez porównanie absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm, a stopień zanieczyszczenia rozpuszczalnikami organicznymi oceniano poprzez porównanie absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 230$ nm [26]. Integralność DNA określano oceniając uzyskany prążek po elektroforezie w 1.5% żelu agarozowym.

3.3 Sekwencjonowanie eksomowe oraz podstawowa analiza bioinformatyczna

Sekwencjonowanie eksomowe (WES) wykonano w ramach usługi obcej w BGI Tech Solutions (Hong Kong; większość analiz) oraz w Oxford Gene Technologies (Wielka Brytania; 24 próbki) z wykorzystaniem zestawu do wzbogacania sekwencji eksomowej SureSelect Human All Exon v5+UTR (Agilent) na platformie Illumina HiSeq2000. Uzyskane surowe dane, to sparowane odczyty 100-nukleotydowe zapisane w postaci plików Fastq. Z surowych danych usunięto sekwencje adaptorowe oraz te 100-nukleotydowe pary sekwencji które nie przeszły weryfikacji jakości. Średnio uzyskano 240.451.900 sparowanych odczytów o dobrej jakości (dla których oceniający jakość współczynnik *phred score* miał wynik równy lub wyższy od 30) na jedną próbkę, które następnie uliniowano (ang. *alignment*) uporządkowując względem genomu referencyjnego hg19 za pomocą programu Burrows-Wheeler Alignment (BWA). Średnio 15 Gb uliniowanej sekwencji miało pokrycie 99 odczytów (99x), a 99.6% eksomu miało pokrycie przynajmniej 10 odczytów. Pokrycie przynajmniej 10 odczytów

w ponad 90% eksonów kończyło się 20 par zasad za sekwencją kodującą, umożliwiając wykrycie wariantów intronowych wpływających na splicing. Wyniki były przeglądane z wykorzystaniem oprogramowania Integrative Genomics Viewer [27]. Warianty jednonukleotydomowe (SNP), oraz małe insercje i delecje (in/del) wykrywano za pomocą programu GATK Unified Genotyper. Do wstępnej anotacji stosowano program Annovar [28], a dla dalszego anotowania, filtrowania oraz analizy wyników (z wykorzystaniem wielu programów np. SNPsift, SNPeff) stosowano oprogramowanie dostępne na platformie Galaxy (na infrastrukturze PL-Grid) i GeneTraps (Intelliseq).

3.4 Bioinformatyczna analiza wyników sekwencjonowania eksomowego

Zidentyfikowane podstawową analizą bioinformatyczną (ang. *variant calling*) listy wariantów w eksomach poszczególnych pacjentów analizowano *in silico* (z wykorzystaniem wielu programów i platform, np. SNPsift, SNPeff, Galaxy, Genetraps), eliminując warianty najprawdopodobniej niewpływające na fenotyp. Filtrowanie wariantów zostało przeprowadzone z zastosowaniem następujących kryteriów:

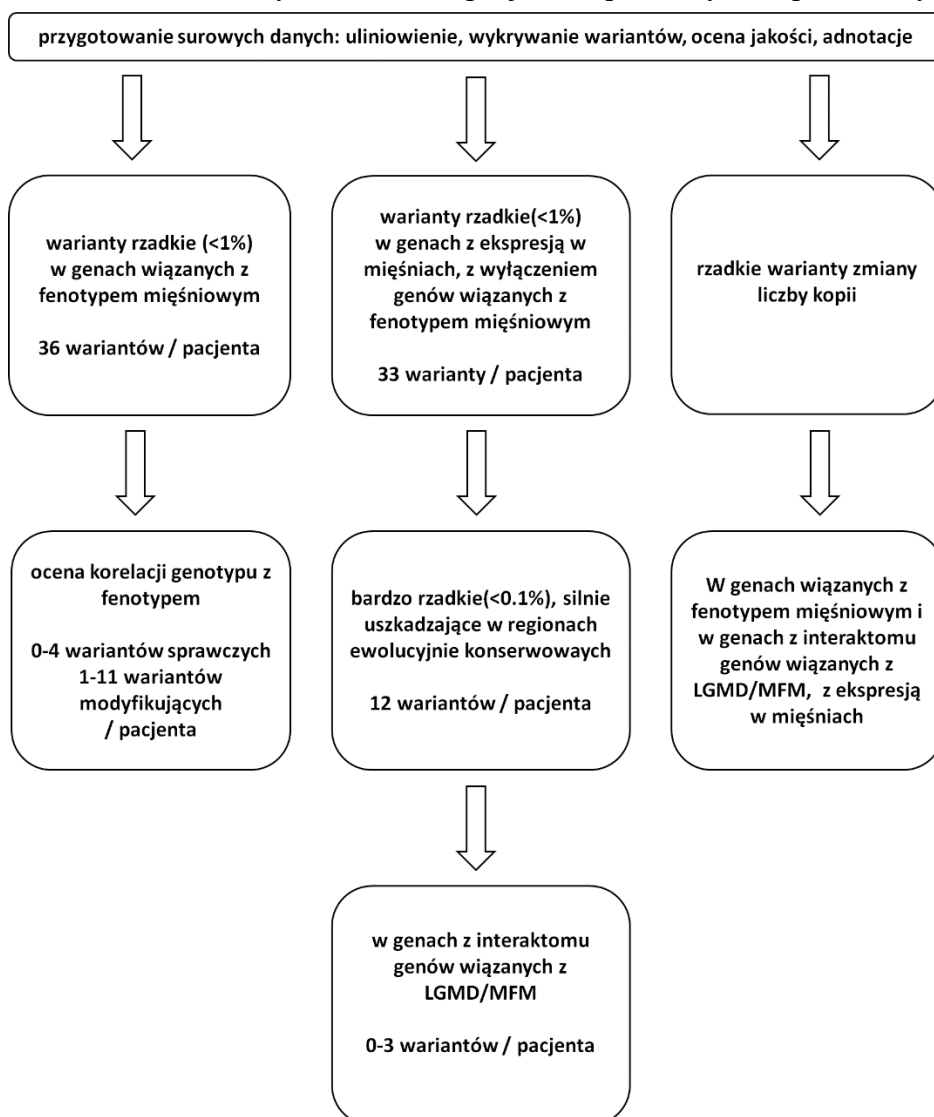
- możliwy wpływ wariantu genetycznego na białko. Poszukiwano mutacji zakłócających składanie transkryptów (ang. *splicing*) oraz mutacji zmieniających sekwencje aminokwasów, ze szczególnym uwzględnieniem mutacji skracających sekwencje kodowanego białka. Ograniczono się zatem do potencjalnie silnie uszkodzających mutacji (typu *missense*, *nonsense*, *frameshift* i *splice site mutations*). Mutacje intronowe niemające wpływu na splicing, oraz mutacje synonimiczne odrzucono z dalszych analiz w celu znacznego ograniczenia liczby analizowanych wariantów. Do oceny wariantów synonimicznych i intronowych, które przecież również mogą wpływać na fenotyp [29] powrócono w przypadkach pacjentów z rodzin z dziedziczeniem recesywnym. Poszukiwano w tych przypadkach rzadkich wariantów synonimicznych bądź intronowych, zlokalizowanych w genach, w których uprzednio wyszukano pojedyncze mutacje zmieniające sekwencję aminokwasową.

- częstość występowania zmiany w populacji ogólnej wg ogólnie dostępnych baz danych, takich jak dbSNP i ExAC. Do dalszej analizy wyznaczano mutacje nie występujące we wspomnianych bazach oraz te, których częstość allelu rzadziej występującego (ang. *minor allele frequency*, MAF) wynosiła mniej niż 1%, ze szczególnym uwzględnieniem mutacji bardzo rzadkich (MAF<0,1%).

- częstość występowania zmiany we wszystkich badanych eksomach. Przyjęto założenie, że mutacje występujące u zbyt wielu (arbitralnie przyjęto próg ponad 25%) badanych pacjentów są najprawdopodobniej bez znaczenia fenotypowego.

Zastosowano trzy strategie wyszukiwania wariantów potencjalnie związanych z chorobą (Ryc. 1). Pierwsza polegała na wyszukiwaniu wariantów punktowych (ang. *single nucleotide variant*, SNV) i małych insercji / delecji (ang. *indels*) na podstawie znanego powiązania genów z fenotypem. Druga strategia polegała na wyszukiwaniu wariantów w genach ulegających ekspresji w mięśniach, ale nie związanych dotychczas z fenotypem osłabienia mięśni. Trzecia - na analizowaniu wariantów zmiany liczby kopii (ang. *copy number variant*, CNV), czyli większych insercji, delecji i duplikacji, które mogłyby wpływać lub być powiązane z pojawieniem się choroby.

Ryc. 1 Procedura analizowania wyników sekwencjonowania całego eksomu. Podano średnie liczby wariantów u pacjentów po każdym etapie analizy.



3.4.1 Analiza korelacji genotypu z fenotypem

Potencjalny wpływ mutacji konkretnego genu na fenotyp był wstępnie oceniany z wykorzystaniem danych z bazy Human Phenotype Ontology. Wyszukiwano mutacje w genach wiązanych z takimi fenotypami jak „muscular dystrophy” (dystrofia mięśniowa), „myopathy” (miopatia), „muscle weakness” (osłabienie mięśni), „muscle atrophy” (atrofia mięśni), „muscular atrophy” (atrofia mięśniowa) i „elevated serum creatine phosphokinase” (podwyższone stężenie kinazy fosfokreatynowej w surowicy krwi).

Uzyskane listy mutacji analizowano indywidualnie dla każdego pacjenta, we współpracy z lekarzem prowadzącym, porównując możliwy efekt wyselekcjonowanych mutacji z objawami klinicznymi. Dodatkowo brano pod uwagę sposób dziedziczenia, ocenę stopnia patogenności (z wykorzystaniem programów SIFT, PolyPhen, PhastCons, Mutation Taster, MutPred i podobnych), częstość występowania mutacji w różnych populacjach (z wykorzystaniem różnych baz danych), a także w innych próbkach z grupy badanej. Szczególną uwagę przykładano do oceny wariantów w genach już wiązanych z LGMD, MFM, bądź innymi, podobnymi chorobami mięśniowymi (np. miopatiami wrodzonymi).

Równolegle, mutacje potencjalnie sprawcze wyszukiwano za pomocą programów priorytuzujących Exomiser i PhenIX, które wskazują, które warianty mogą być potencjalnie związane z badanym fenotypem, lub które geny (z wykrytymi zmianami) należą do interaktomu wspólnego z genami już wiazanymi z danym fenotypem.

3.4.2 Poszukiwanie genów kandydujących

W celu wytypowania nowych genów potencjalnie wpływających na zachorowania wyszukiwano zmiany w genach ulegających ekspresji w mięśniach, a które nie były jeszcze wiązane z miopatiami i dystrofiami mięśniowymi. Wykorzystano dane z bazy GeneAtlas pozostawiając do dalszej analizy warianty w genach ulegających ekspresji w mięśniach u ludzi oraz w genach, których mysie ortologi ulegają ekspresji w mięśniach. W celu ograniczenia liczby wariantów wyszukiwano jedynie bardzo rzadko występujące warianty (MAF <0,1%). Dalsze ograniczenie liczby zmian polegało na wyszukaniu zmian jedynie w tych genach, których produkty białkowe są powiązane z produktami białkowymi genów występujących w szlakach i strukturach, które mogą odgrywać rolę w patogenezie miopatii. Wybrano warianty genów, których produkty białkowe albo oddziałują ze znanymi genami związanymi z LGMD i/lub MFM, albo uczestniczą w tych samych szlakach (wg danych

z baz BioGrid oraz KEGG). Ponownie, uzyskane wyniki oceniano w kontekście fenotypu klinicznego konkretnych pacjentów. Równolegle, wyszukiwano mutacje w genach powiązanych z genami uznawanymi za przyczynowe dla LGMD i/lub MFM za pomocą programu priorytyzującego Exome Walker. Program ten ocenia warianty eksomowe na podstawie uczestnictwa produktów białkowych w możliwych do powiązania z podanymi genami szlakach biochemicznych, sygnałowych, czy elementach strukturalnych (w przypadku badanych chorób – zlokalizowanych w tkance mięśniowej). Typując geny kandydujące wyszukiwano geny, bądź grupy genów (reprezentujących wspólne szlaki biochemiczne bądź powiązane elementy strukturalne), w których potencjalnie patogeniczne mutacje są nadreprezentowane wśród chorych, zwłaszcza w grupie w której nie znaleziono znanych mutacji przyczynowych.

3.4.3 Analiza wariantów zmiany liczby kopii.

W surowych wynikach WES wykrywano warianty liczby kopii (CNV) posługując się programem CODEX w wersji 1.8 [30]. Wykryte CNV scharakteryzowano posługując się częstościami najlepiej dopasowanych CNV z bazy tysiąca genomów [31]. Geny, objęte wykrytymi CNV zostały zidentyfikowane przy użyciu danych z bazy Ensembl z wersji 86. Geny na które nakładały się zidentyfikowane CNV opisywano przy użyciu terminów odnoszących się do chorób i fenotypów z bazy HPO, a także wyników ekspresji tkankowo-specyficznego posługując się bazą danych GeneAtlas, w celu najpełniejszej oceny i wytypowania wariantów, które mogą mieć wpływ na fenotyp kliniczny.

3.5 Procedura oceny patogenności wstępnie przefiltrowanych wariantów

Ocena patogenności mutacji to zadanie złożone, polegające na łączeniu wyników uzyskanych dzięki stosowaniu różnorodnych, przedstawionych pokrótce metod badawczych, w kontekście aktualnej wiedzy o produktach białkowych zmutowanych genów, ich interaktomów, a także biochemii i fizjologii mięśni.

W celu stwierdzenia czy mutacje zidentyfikowane w badanej grupie są charakterystyczne dla osób chorych (a zatem są najprawdopodobniej sprawcze), sprawdzano czy są one obecne w wynikach sekwencjonowania eksomowego i genomowego pacjentów z innymi schorzeniami (choroba Alzheimera, zespół Gillesa de la Tourette'a), badanymi uprzednio w Pracowni Neurogenetyki IMDiK PAN, a także porównując z danymi

zgrupowanymi w ogólnodostępnych bazach (np. ExAC, w której znajdują się dane z około 60 tysięcy eksomów).

Dodatkowo brano pod uwagę wyniki analizy znaczenia fenotypowego poszczególnych mutacji z wykorzystaniem programów predykcyjnych. Ponieważ specyficzność i czułość konkretnych programów tego typu nie jest absolutna [32,33], w analizach wykorzystywano co najmniej kilka programów, zarówno tych przeznaczonych bardziej do oceny konserwatywności ewolucyjnej sekwencji (ConSurf i Phastcons), jak i tych oceniających przede wszystkim charakterystykę zmienionych aminokwasów (SIFT, PolyPhen-2, Mutation Taster). Do analizy wpływu mutacji na składanie pre-mRNA (ang. *splicing*) stosowano program Human Splicing Finder.

Zidentyfikowane poprzez WES warianty genomowe, uznane następnie za mutacje sprawcze, każdorazowo potwierdzano sekwencjonowaniem sangerowskim, a w przypadku posiadania materiału genetycznego osób z rodziny ryzyka analizowano także kosegregację mutacji z fenotypem klinicznym.

Patogenność wybranych wykrytych mutacji uznanych za potencjalnie sprawcze sprawdzano za pomocą analiz funkcjonalnych *in silico* i *in vitro*, oceniających wpływ mutacji na strukturę produktu białkowego oraz jego rozmieszczenie w tkance mięśniowej.

3.5.1 Sekwencjonowanie metodą Sanger

Reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*, PCR) prowadzono w termocyklerze Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems), w objętości 10 µl, stosując zestaw Taq PCR Core Kit (Qiagen). Startery projektowano za pomocą programu Primer 3, wykorzystując sekwencje genów dostępne w bazie GeneBank. Produkty PCR oczyszczano od niewłączonych starterów oligonukleotydowych stosując mieszaninę enzymów Exonuclease I i FastAP (Fermentas). Reakcję sekwencjonowania prowadzono w objętości 10 µl, stosując zestawy BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems), stosując jako matryce oczyszczone produkty PCR. W reakcji sekwencjonowania stosowano jeden ze starterów wykorzystywanych w pierwszej reakcji PCR. Produkty sekwencjonowania oczyszczano przez wytrącanie z roztworu wodnego mieszaniną alkoholu etylowego i octanu sodu (95% EtOH, 3M NaOAc pH 4,6) i liofilizowanie, a następnie dodawano dejonizowany formamid i denaturowano w 95°C. Tak przygotowane produkty sekwencjonowania rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej w analizatorze Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Analizę wyników bezpośredniego sekwencjonowania fluorescencyjnego prowadzono z wykorzystaniem programów DNA Sequencing Analysis Software v5.1 (Applied Biosystems), oraz SeqMan (DNASStar).

3.5.2 Określanie wpływu mutacji na strukturę białka

Analizę struktur trzeciorzędowych wybranych zmutowanych białek (desmina, krystalina alfa-B) oraz określenie wpływu wykrytych mutacji na ich własności wykonano w Laboratorium BioModelowania Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego we współpracy z zespołem prof. Sławomira Filipka. Wyboru tak analizowanych przypadków dokonano ze względu na dostępność struktur wyjściowych i potrzebę pełniejszego uprawdopodobnienia wpływu wykrytych mutacji na fenotyp kliniczny. Punktem wyjścia modelowania były struktury białek uzyskane z bazy Protein Data Bank (PDB). Określenia wpływu mutacji dokonano z wykorzystaniem programu Yasara (Yasara Biosciences GmbH), wykonując symulacje dynamiki molekularnej.

3.5.3 Ocena zmiany rozmieszczenia zmutowanych białek w strukturze mięśnia

W wybranych przypadkach do oceny wpływu mutacji na białko wykorzystano wyniki analiz immunohistochemicznych wykonanych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, we współpracy z zespołem prof. Marii Jolanty Rędownicz. Wyboru tak analizowanych przypadków dokonano ze względu na dostępność bioptatów mięśni, na dostępność przeciwciał do białek kodowanych przez geny z wykrytymi mutacjami i potrzebę pełniejszego uprawdopodobnienia wpływu wykrytych mutacji na fenotyp kliniczny. W badaniach wykorzystywano przeciwciała skierowane przeciw wybranym białkom związanym z badaną jednostką chorobową (LGMD lub MFM), w których wykryto mutacje (desmina, kalpaina 3, anoktamina 5, dysferlina, krystalina alfa-B), a także przeciw markerom poszczególnych kompartmentów włókna mięśniowego (m-kadheryna, ciężki łańcuch miozyny, alfa aktynina 1, dystrofina). Analizy immunohistochemiczne wykonano z użyciem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej (Leica TCS SP8), a półilościową ocenę ekspresji genów na poziomie białkowym przeprowadzono z wykorzystaniem homogenatów mięśni, rozdzielonych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym metodą Western blot.

Dokładny opis powyższych metod znajduje się w artykułach: Fichna JP et al.: Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families [34], oraz Fichna JP et al.: A novel dominant D109A CRYAB mutation in a family with myofibrillar myopathy affects α B-crystallin structure [35].

3.6 Poszukiwanie mutacji w genie *DES* i identyfikowanie sekwencji mikrosatelitarnych.

Niezależnie od przeprowadzonego dla wszystkich pacjentów sekwencjonowania eksomowego, w początkowym etapie analiz, w podgrupie chorych z rozpoznaniem MFM poszukiwano mutacji w genie kodującym desminę (*DES*) metodą sekwencjonowania sangerowskiego.

W celu potwierdzenia wspólnego pochodzenia mutacji wykrytych w kilku rodzinach przeprowadzono analizę długości krótkich tandemowych powtórzeń (ang. *short tandem repeats*, STR) markerów mikrosatelitarnych zlokalizowanych w rejonie genu *DES*. Sekwencje STR wykazują duży polimorfizm umożliwiający wskazanie możliwego pochodzenia zmutowanego allelu, sprzężonego z konkretną sekwencją STR. Za pomocą PCR z wyznakowanymi fluorescencyjnie starterami, analizowano długości poszczególnych STR stosując elektroforezę kapilarną. Określenie długości kilku STR w okolicy badanego fragmentu genomu może potwierdzić (w przypadku takich samych długości) lub wykluczyć pochodzenie badanego fragmentu od wspólnego przodka. Genotypowanie *locus DES* prowadzono analizując siedem sekwencji mikrosatelitarnych (D2S2382, D2S2248, D2S1338, D2S163, D2S126, D2S133, D2S2354) otaczających gen *DES*. Sekwencje amplifikowano z wykorzystaniem par starterów, z których jeden był znakowany fluorescencyjnie, rozdzielano stosując elektroforezę kapilarną (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems), a następnie wyniki interpretowano za pomocą programu Gene Mapper (Applied Biosystems).

Dokładny opis stosowanych metod znajduje się w artykułach: Fichna JP et al.: Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families [34].

4 Wyniki:

4.1 Mutacje w genie DES: identyfikacja i kompleksowa charakterystyka

Analizując sekwencje nukleotydowe genu *DES* u 24 członków 7 rodzin z klinicznym rozpoznaniem miopatii miofibrylarniej zidentyfikowano dwie mutacje: znaną A357_E359del (u dwóch rodzin) oraz nieopisaną dotychczas Q348P. Analiza markerów mikrosatelitarnych potwierdziła przypuszczenie, że wykryta już u trzech polskich rodzin mutacja A357_E359del pochodzi od wspólnego przodka. Ze względu na brak dostępu do odpowiedniej liczby członków rodzin nie było możliwe określenie punktu czasowego zdarzenia mutacyjnego. Pełne wyniki zostały przedstawione w artykule: Fichna JP et al.: Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families [34].

4.2 Zastosowanie sekwencjonowania eksomowego do określania genetycznego podłoża LGMD i MFM

4.2.1 Wyniki analizy korelacji genotypu z fenotypem

We wszystkich badanych wynikach sekwencjonowania eksomowego wykryto 1984 rzadkie warianty w genach łączonych poprzednio z różnymi objawami mięśniowymi. Średnio zidentyfikowano 35,6 takich wariantów w poszczególnych przypadkach oraz 36,7 rzadkich wariantów w poszczególnych przypadkach MFM, tymczasem w eksomach kontrolnych zidentyfikowano większą liczbę średnio 43,2 takich wariantów. Łącznie u wszystkich 85 pacjentów z LGMD wyszukano 1880 takich wariantów, i wykrywano je też w pozostałych grupach: średnio 20,1 wariantu u poszczególnych pacjentów z MFM i 14,3 wariantu u kontroli. Analogicznie u wszystkich 7 pacjentów z MFM wyszukano 164 takie warianty, które identyfikowano również wśród pacjentów z LGMD – średnio 6,75 wariantu u pacjenta – i wśród kontroli – średnio 4,62 wariantu na kontrolę.

Wśród wyników dla poszczególnych pacjentów (Tabela 3.) po analizie genetyczno-klinicznej wytypowano prawdopodobne mutacje sprawcze, współsprawcze i te które potencjalnie mogły modyfikować fenotyp pacjenta (Tabela 4 i Tabela 5.)

Tabela 3. Wyniki wyszukiwania wariantów w genach związanych z objawami osłabienia mięśnia. Przykład pokazuje wyniki u wybranego pacjenta.

(tabela na następnej stronie)

CHR	POS	ID	REF	ALT	EFF	GENE	HGVS.p	AC	CTRL	OM	HGMD	CLINVAR	EX_NFE	EXAC	INH	HP_PHEN
chr5	151666362	rs41290587	C	T	missense&splice	SPARC	p.Gly245Arg	4	0				0,00589	4,51E-03	AR	muscle weakness
chr21	46122138	rs141166141	C	T	missense	COL6A2	p.Pro518Ser	4	0			likely benign	0,014855	8,79E-03	AR/AD	muscular dystrophy
chr13	100368479	rs61749895	G	T	missense	PCCA	p.Val437Phe	3	0		CM	likely benign	0,010621	7,69E-03	AR	myopathy
chr11	121162110	rs142948530	C	T	missense	TECTA	p.Ser1671Leu	5	0			likely benign	0,007555	5,05E-03	AD/AR	myopathy
chr17	21703084	.	G	A	missense	KCNJ18	p.Val100Ile	6	0							muscle weakness
chr13	20189473	rs72474224	C	T	missense	GJB2	p.Val37Ile	2	0	OM	CM	pathogenic	0,001935	6,58E-03	AD/AR	myopathy
chr4	113145905	rs55847200	G	T	missense	ANK2	p.Asp13Tyr	2	2				0,005287	3,71E-03	AD	myopathy
chr11	77199663	rs41298747	C	T	missense	MYO7A	p.Thr709Met	11	2		CM	likely benign	0,007561	4,55E-03	AD/AR	myopathy
chr8	101664510	.	C	A	missense	GRHL2	p.Ser569Arg	16	0						AD/AR	myopathy
chr8	101664509	.	G	A	missense	GRHL2	p.Ser569Asn	13	1						AD/AR	myopathy
chr20	58854572	rs61749698	C	A	missense	GNAS	p.Pro373Thr	3	1				0,018288	9,57E-03	AD	myopathy
chr2	71602794	rs121908954	A	G	missense	DYSF	p.Ile1316Val	5	0	OM	CM	pathogenic	0,007054	4,51E-03	AR	muscular dystrophy
chr1	1049591	rs111818381	G	A	missense	AGRN	p.Ala1376Thr	2	0				0,019069	6,60E-03	AR	myopathy
chr2	178746240	rs72648913	C	T	missense	TTN	p.Cys538Tyr	2	0			likely benign	0,004439	2,91E-03	AD/AR	muscular dystrophy
chr2	178539771	rs72648273	G	C	missense	TTN	p.Ala23825Gly	2	0			likely benign	0,004213	2,83E-03	AD/AR	muscular dystrophy
chr2	178589803	rs199895260	C	T	missense	TTN	p.Arg11701Gln	2	0			likely benign	0,004197	2,72E-03	AD/AR	muscular dystrophy
chr2	219497059	rs528548877	ATCAACG	A	inframe_del	SPEG	p.Asn128_Val129del	1	0				0,011389	8,20E-03	AR	myopathy
chr3	191380871	rs114502673	A	G	missense	CCDC50	p.Lys218Arg	1	0			benign	0,005004	6,39E-03	AD	myopathy
chr1	235414500	rs143886167	A	G	missense	TBCE	p.Ile85Val	1	1				0,001102	9,31E-04	AR	myopathy
chr14	45159275	rs144215747	C	G	missense	FANCM	p.Leu111Val	1	0				0,001147	8,90E-04	AR	myopathy
chr1	114684234	rs142582318	C	T	missense	AMPD1	p.Gly172Asp	2	0				0,001229	8,40E-04	AR	myopathy
chr5	132370006	rs139203363	G	A	missense	SLC22A5	p.Gly12Ser	1	0	OM			0,000796	6,10E-04	AR	myopathy
chr1	183222127	rs181894078	C	T	missense	LAMC2	p.Pro227Ser	1	0				0,00057	5,27E-04	AR	myopathy
chr18	45901098	rs199811412	G	A	missense	EPG5	p.Thr1515Met	1	0				0,000465	3,31E-04	AR	myopathy
chr17	4901545	rs146931108	A	G	missense	CHRNE	p.Ile194Thr	1	0				0,000451	2,88E-04	AD/AR	myopathy
chr19	38506525	rs146793133	A	C	missense	RYR1	p.Lys2891Gln	1	0				0,000031	1,81E-04	AD/AR	muscular dystrophy
chr4	54270646	rs199827643	T	G	missense	PDGFRA	p.Leu379Val	1	0				0,000255	1,48E-04	AD	myopathy
chr5	173232601	rs201249977	C	A	missense	NKX2-5	p.Val315Leu	1	0				0,00017	1,07E-04	AD/AR	muscle weakness
chr2	151696656	rs199710125	T	C	missense	NEB	p.Asn517Ser	1	0				0,000166	9,93E-05	AR	myopathy
chr7	16258392	rs587777798	AAAC	A	inframe_del	ISPD	p.	1	0	OM		pathogenic	0,000113	8,29E-05	AR	muscular dystrophy
chr16	56501370	rs192007013	C	T	missense	BBS2	p.Arg403His	1	0				0,00012	6,59E-05	AR	myopathy
chr20	45420639	rs117616742	A	C	missense	PIGT	p.Asn3His	1	0				0,00009	5,77E-05	AD/AR	myopathy
chr10	98429792	rs200119414	G	A	missense&splice	HPS1	p.Thr289Met	1	0				0,000046	4,12E-05	AR	myopathy
chr7	157366556	rs372973038	G	A	missense	DNAJB6	p.Gly77Glu	1	0				0,000015	8,24E-06	AD	muscular dystrophy
chr3	49531747	.	G	C	missense	DAG1	p.Glu412Asp	1	0						AR	muscular dystrophy
chr18	21847111	.	T	A	missense	MIB1	p.His793Gln	1	0						AD	myopathy
chr6	152284076	.	G	C	missense	SYNE1	p.Pro5632Ala	1	0						AD/AR	muscular dystrophy
chr8	101664501	.	C	A	stop_gained	GRHL2	p.Tyr566*	7	1						AD/AR	myopathy

CHROM - chromosom, POS - pozycja nukleotydowa, ID - numer z bazy dbSNP, REF - nukleotyd referencyjny, ALT - nukleotyd alternatywny, EFF - typ mutacji, GENE - gen w którym wykryto wariant, HGVS.p - zmiana sekwencji aminokwasowej, AC - liczba alleli z danym wariantem wśród grupy badanej, CTRL - liczba alleli z danym wariantem wśród kontroli, CLINVAR - ocena danego wariantu wg bazy clinvar, EX_NFE - częstość danego wariantu w bazie ExAC dla populacji Europejskiej, EXAC - częstość danego wariantu w bazie ExAC dla populacji ogólnej, INH - możliwe dziedziczenie, HP_PHEN - fenotyp, ze względu na brak miejsca podano tylko czy występuje któreś z haseł związanych z chorobami mięśni

W grupie 85 przypadków (86 pacjentów z 85 rodzin) z rozpoznaniem LGMD i 6 przypadków (7 pacjentów z 6 rodzin) z rozpoznaniem MFM, metodą sekwencjonowania całego eksomu (WES) i po analizie kliniczno-genetycznej zidentyfikowano mutacje prawdopodobnie sprawcze w 54 przypadkach z grupy LGMD (63,5%) i 5 przypadkach z grupy MFM (83%). Wśród przypadków LGMD 60 różnych mutacji sprawczych wykryto w genach *ANO5*, *BAG3*, *BVES*, *CAPN3*, *CAV3*, *COL6A3*, *DMD*, *DYSF*, *FKRP*, *FLNC*, *LDB3/ZASP*, *LMNA*, *PLEC1*, *SGCA*, *SGCB*, *TCAP* oraz *TRAPPC11*. Spośród nich 35 mutacji zidentyfikowano po raz pierwszy, a 19 mutacji nie widnieje w bazach danych zbierających wyniki sekwencjonowań eksomowych (ExAC) i genomowych (1000 genomes). Większość znanych mutacji opisywano jako sprawcze, natomiast nowo wykryte mutacje w większości skracają długość kodowanego białka, co wyraźnie sugeruje ich sprawczy charakter. Wykryto również inne mutacje w genach związanych z LGMD, MFM, bądź innymi miopatiami (*ANO5*, *BAG3*, *CAPN3*, *DYSF*, *PLEC1*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT2*, *FKTN*, *IMS2*, *ISPD*, *DES*, *FLNC*, *LDB3/ZASP*, *TTN*, *TMPO*, *TPM1*, *SGCA*, *SGCB*, *SGCD*, *SGCG*, *RYR1*, *SEPNI*, *B3GALNT2*, *BIN1*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*, *HNRPD*, *ITGA7*, *PTPRN*, *TRAPPC11*, *OBSCN*, *LARGE*, *NEB*, *NEBL*, *DMD*, *DMN*, *MYBPC1*, *MYBPC3*, *MYL5*, *SYNE1*, *SYNE2*, *LAMA2*, *MYH6*, *MYH3*), które mogą wpływać modyfikująco na fenotyp kliniczny.

Tabela 4. Zidentyfikowane mutacje sprawcze oraz mutacje mogące przyczyniać się do powstania fenotypu klinicznego lub modyfikować jego charakter, w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem LGMD.

pacjent	pleć	wiek	początek choroby	CK (x UNL)	historia rodzinna	dodatkowe cechy kliniczne	gen sprawczy	genotyp	inne geny z mutacjami prawdopodobnie wpływającymi na fenotyp
20	M	22	wczesna dorosłość	23	przypadek sporadyczny		<i>ANO5</i>	p.D81G / p.R758C	<i>NEB</i> , <i>DES</i> , <i>TTN</i>
10	M	54	wczesna dorosłość	19	AR		<i>ANO5</i>	p.D81G / p.W401X*	<i>BAG3</i> , <i>FLNC</i> , <i>CHRNE</i> , <i>CACNA1S</i> , <i>TTN</i> x2

173a	M	14	dzieciństwo	94	AR			c.1193+1G>A (miejsce splicingu) / c.598-612delGTTCTGGAGTGCTCT	NEB x2, DNM2, TTN x2, CACNA1S
424	F	51	wiek dorastania	1,7	przypadek sporadyczny			c.598-612delGTTCTGGAGTGCTCT / p.G221S*	COL12A1, PLEC, DNM2TTN
186a	M	40	wczesna dorosłość	28	AR	-		c.550delA / p.A609E	LDB3/ZASP x2, COL6A2, COL6A3, SGCD, POMT1, DYSF, SYNE2, MYH6, B3GALNT2
175d	M	12	wczesne dzieciństwo	27	AR	łagodne osłabienie mięśni twarzy		c.550delA / c.598-612delGTTCTGGAGTGCTCT	MYOT, SGCB, RYR1, NEB, SYNE2, TTN
12	M	4	dzieciństwo	12	przypadek sporadyczny			c.550delA / c.550delA	COL6A3, FLNC, NEB, TTN x2
144	F	18	wiek dorastania	8	AR			c.550delA / c.550delA	DNM2, , TMEM5, TTN x2
212	F	28	wiek dorastania	4	AR			c.550delA / c.550delA	DYSF, TTN x6
127	F	12	wiek dorastania	35	przypadek sporadyczny			c.550delA / c.550delA	RYR1, FLNC, -
184a	M	13	wiek dorastania	16	AR			c.550delA / c.550delA	HSPG2, TTN
6	F	15	wiek dorastania	31	AR			c.550delA / c.550delA	TRAPPC11, RYR1, LAMA2, FLNC, NEB, PPARGC, TTN, MYF6
764	F	10	dzieciństwo	77	AR			c.550delA / c.1722delC	LDB3/ZASP x2, POMT1, TMEM43
18	M	20	wczesne dzieciństwo	26	przypadek sporadyczny	wczesne zachorowanie, opadanie stóp		c.550delA / p.E566K p.R204H	LDB3/ZASP x2, GBE1, TTN x4,
TO	M	14	dzieciństwo	22	AR			c.550delA / p.G221S*	TRAPPC11, LIPE, GBE1, HSPG2, TTN x3
8	M	13	wczesne dzieciństwo	29	przypadek sporadyczny; wysokie CK u ojca			c.550delA / p.P82L	NEB x2, COL6A3, SYNE1 x2, TTN x5, LDB3/ZASP, HSPG2
13	F	4	dzieciństwo	37	AR			c.550delA / p.R147X	COL12A1, NEB
4	F	11	dzieciństwo	42	AR	-		c.550delA / p.R355W	FLNC, SYNE1, DCTN1, TTN x3
433	F	13	dzieciństwo	9	AR			c.550delA / p.R448C	COL6A3, TARDBP, TTN x2
668	M	38	dorosłość	4	AR	podostry początek zachorowania z lekkim		c.550delA / p.T560A	PLEC x 3, SYNE1 x2, CCDC78, COL9A3, HSPG2

						osłabieniem mięśni kończyn górnych			
193a	M	10	dzieciństwo	23	AR		CAPN3	c.550delA / p.W130R*	COL6A3, NEB, HSPG2, TTN x2, GNE
113	M	32	dzieciństwo	2	AR	znaczne przykurcze	CAPN3	p.R748X / c.1722delC	COL6A3, RYR1, HSPG2, SYNE1, DCTN1, TTN x2
144a	F	18	wiek dorastania	No data	AR		CAPN3	p.R748X / c.598-612delGTTCTGGAGTGCTCT	COL6A1, COL6A3, HNRNPDL, RYR1 x2, SYNE1, MYH7, TTN x5
225	F	12	wczesna dorosłość	42	przypadek sporadyczny		CAPN3	p.P102L / p.S606L	MYH3, SYNE1, SYNE2, TTN
196	M	14	wczesne dzieciństwo	3	przypadek sporadyczny	wrodzone przykurcze kolan, opóźniony rozwój ruchowy, upośledzenie słuchu	COL6A2	p.G277E*	CAV3, LAMA2, ANO5 ITGA7, RYR1, SYNE2, TTN x3
901	M	41	dorosłość	1,9	przypadek sporadyczny	łagodne osłabienie mięśni zewnętrznych gałki ocznej, osłabienie mięśni dystalnych kończyn górnych	COL6A3 CACNA1S	p.E1386K / p.R2420W p.T349I*	NEB), TTN
7	F	14	dzieciństwo	7	przypadek sporadyczny		COL6A3	p.R2142X* / p.K2483E	FLNC
275	M	16	wiek dorastania	6	przypadek sporadyczny, wysokie CK u ojca	opóźnienie rozwoju ruchowego	COL6A3	p.T1368M / p.V2398I	DAG1, NEB, SYNE1, TTN
135	M	32	dzieciństwo	17	przypadek sporadyczny	zespół preekscytacji serca	DMD	c.678-681delCTT*	RYR1, ITGA7, DYSF, CCDC78, COL9A3
275B	M	48	dorosłość	5	przypadek sporadyczny	podostry początek, przejściowa poprawa po podaniu kortykosteroidów „ osłabienie mięśni dystalnych	DNAJB6	p.G77E	COL6A2, DAG1, DYSF, ISPD, NEB, RYR1, SYNE1, CHRNE, TTN x3
192	M	35	wczesna dorosłość	20	AR; miopatia u kilku dalszych krewnych	powysiłkowe osłabienie mięśni, osłabienie mięśni dystalnych kończyn dolnych	DYSF	c.4821delG* / c.5058-1G>T (miejsce splicingu)	LDB3/ZASP, ANO5, PLEC, SYNE1, TTN
16	M	25	wczesna dorosłość	24	przypadek sporadyczny	osłabienie mięśni dystalnych kończyn dolnych	DYSF	p.D1876N / p.D1876N / c.5179delA* / c.5179delA*	FLNC, DMD, MYH6, COL9A3, NIPA1, HSPG2, TTN x2

219	M	28	wczesna dorosłość	42	AR	zanik mięśni tydek			p.D1876N / p.E1763D / c.5179delA*	PLEC x2, LDB3/ZASP x2, COL6A2, FKRP, COL12A1, TTN x3
24	M	27	wczesna dorosłość	54	AR, brat pacjentki nr 3	fenotyp miopatii Miyoshi		DYSF	p.Q1323E / c.5237delG*	COL6A3, MYH3, LDB3/ZASP
3	F	39	wczesna dorosłość	22	AR, siostra pacjenta nr 24			DYSF	p.Q1323E / c.5237delG*	PLEC, COL6A3
407	M	14	wczesne dzieciństwo	4,5	AD ?			DYSF MYH7	p.V374I / c.5946G>A (miejsce splicingu) p.A1487T	ANOS, NEB
15	M	15	dzieciństwo	18	przypadek sporadyczny	opóźnienia rozwojowe; znaczna atrofia mięśni i silne przykurcze		FKRP	p.L276I / c.253+2T>C (miejsce splicingu)	PLEC x2, LARGE, KBTBD13, DCTN1, MYPN, TTN x2
198	F	11	dzieciństwo	37	przypadek sporadyczny			FKRP	p.L276I / c.975-882delCGCCCGCTATGTGGT GGG*	COL6A3, COL4A1, NEB x2, TTN
KW	F	4	wczesne dzieciństwo	39	przypadek sporadyczny	przejściowe osłabienia już w wieku niemowlęcym		FKRP	p.L276I / p.L276I	ISPD, DYSF, ITGA7, SYNE1, TTN x2
5	F	11	dzieciństwo	30	AR			FKRP	p.L276I / p.L276I	PLEC x2, COL6A3 x2, DYSF, POMGNT2, FLNC, TTN x3
102	F	13	wiek dorastania	33	AR; spokrewnieni rodzice	-		FKRP	p.L276I / p.L276I	COL12A1, MYH2, SYNE2, TTN
84e	F	24	wczesne dzieciństwo	b.d.	AR	-		FKRP	p.L276I / p.P217Q*	TCAP, COL6A2, TTN x2
CM	F	10	wczesne dzieciństwo	27	AR	opóźnienie ruchowe, utrata zdolności chodzenia w pierwszej dekadzie życia		FKRP	p.L93P / p.R270C	CAPN3, DMD, NEB, SYNE1 x2, CCDC78, TTN x4
19	M	76	wiek dorastania	7	AR	kardiomiopatia z arytmia		LMNA	p.G523R	CAPN3, COL6A3, PLEC x3, RYR1, HSPG2, SYNE1, MYH3, LMOD3, RBM20, TNNI3K
21	F	10	dzieciństwo	15	AR			SGCA	p.V247M / p.V250L* (miejsce splicingu)	COL6A1, COL6A2, MYH2, LDB3/ZASP, POMT1
84a	F	52	wiek dorastania	2	AR	-		SGCA	p.V250L* (miejsce splicingu) / p.R284C	LDB3/ZASP x2, RYR1, COL6A2, COL6A3, SYNE1

157	F	9	dzieciństwo	20	przypadek sporadyczny	kardiomiopatia		SGCB	p.S114F / p.I119N*	PLEC x2, TRAPPC11, HSPG2 x2, TTN
201	F	12	dzieciństwo	36	przypadek sporadyczny; spokrewnieni rodzice			SGCB	p.S114F / p.S114F	PLEC x2, TRAPPC11, B3GALNT2, HSPG2, SYNE1
270a	F	17	wczesne dzieciństwo	1,4	przypadek sporadyczny; spokrewnieni rodzice			TCAP	c. 358-359delGA* / c. 358-359delGA*	NEB X3, SYNE1, BVES, TTN x2
229a	F	6	dzieciństwo	19	przypadek sporadyczny; spokrewnieni rodzice			TRAPPC11	p.D26G* / p.D26G*	NEB, ITGA7, POMGNT1
448a	F	56	dorosłość	2,5	AR					CAPN3, TTN (frameshift)
179	F	57	wiek dorastania	6	AR					CAPN3, COL6A2, DNMT2, -BVES, TTN x4
214	F	41	dorosłość	22	AR					CAPN3, COL6A3, POMT2, COL12A1, TTN x2
191	M	35	dorosłość	1,5	AR					CAPN3, FKRP, TTN x3
658	F	31	wiek dorastania	3	AR					CAPN3, MYPN, TARDBP, TTN x2
752	F	56	dorosłość	2,5	AR					CAPN3, POMT2, FLNC x5, NEB, HSPG2, SYNE2, TTN
128a	F	10	dzieciństwo	81	AR	szybki postęp choroby, znaczna atrofia mięśni				CAPN3, RYR1 x2, FLNC
170	M	42	dorosłość	4	AR					CAPN3, SGCA, RYR1, CACNA1S, LDB3/ZASP,
130a	M	15	wiek dorastania	27	AR	-				CAPN3, PLEC x2, SYNE1 x2, SYNE2, CACNA1S, TTN
250a	M	44	dorosłość	12	AR	zajęte szczególnie mięśnie kończyn górnych; przerost mięśni				CAPN3, SGCD, HSPG2, TTN
160a	F	16	wiek dorastania	36	AR	-				CAPN3, BAG3, DES, NEB x2, TTN x2, CACNA1S
592	F	36	wiek dorastania	1,4	przypadek sporadyczny					BAG3, TMEM43, TTN x3, HSPG2

243	F	41	dorosłość	2,4	AD ?	osłabienie mięśni dystalnych; łagodna dysfagia			<i>BVES x2, SYNE1, TTN, HSPG2, HACD1</i>
197	F	9	wczesna dorosłość	20	przypadek sporadyczny				<i>COL6A3, ANO5, NEB, COL12A1, MYH3, SYNE1, TTN x2, SCN4A, LMNB2</i>
17	M	34	wczesna dorosłość	24	przypadek sporadyczny	fenotyp miopatii Miyoshi			<i>DMD, PLEC x2, LAMA2, ITGA7, MYH6, SYNE2, CACNA1S, NEB</i>
195	M	17	wiek dorastania	47	przypadek sporadyczny	silne przykurcze, znaczna atrofia mięśni			<i>DNM2, TRIM32, POMGNT1, FLNC, NEB, ,</i>
14	F	8	dzieciństwo	80	przypadek sporadyczny				<i>FLNC x2, TTN x2</i>
1038	F	77	późna dorosłość	30	przypadek sporadyczny	przewaga zajęcia mięśni kończyn górnych; poprawa po podaniu kortykosteroidów			<i>DYSF, PLEC, SYNE1, SYNE2, TTN x2</i>
9	F	14	wczesne dzieciństwo	9	przypadek sporadyczny	Bardzo silne przykurcze			<i>RYR1 x2, NEB, MYH7, FLNC, TTNx2</i>
155	F	3	wczesne dzieciństwo	18	przypadek sporadyczny	opóźnienie rozwoju ruchowego			<i>RYR1, ISPD, POMGNT2, COL6A2, DYSF, NEB, MYH3, TTN x3</i>
11	M	53	późna dorosłość	44	przypadek sporadyczny	dysfagia, dysfonia; podostry początek			<i>TRAPPC11, NEB, HSPG2</i>
194	F	77	późna dorosłość	<1	przypadek sporadyczny	dysfagia pierwszym objawem			<i>HSPG2, TTN</i>
859	F	78	późna dorosłość	<1	przypadek sporadyczny	osłabienie mięśni dystalnych			<i>CACNA1S</i>
901B	F	62	dorosłość	<1	przypadek sporadyczny	dysfagia, osłabienie mięśni dystalnych, zwłaszcza dłoni			<i>SGCG, NEB, CACNA1S, HSPG2, SCN4A, MYH14, TTN X4</i>
161	F	41	dorosłość	3	przypadek sporadyczny	miopatyczna twarz, ptoza, w biopsji wakuole autofagiczne			<i>NEB, ALG1, AGL, TTN</i>
667	F	48	dzieciństwo	15	AD ? z niepełną penetracją	osłabienie mięśni dystalnych; w biopsji niespecyficzne zmiany miopatyczne, dużo włókien z centralnie	<i>CCDC78</i>	<i>p.R103Q</i>	<i>SYNE1, MTM, NEB x2, TTN x2</i>

						zlokalizowanymi jądrami komórkowymi			
711	M	20	dzieciństwo	6	dziedziczenie związane z chromosomem X	mialgia i przykurcze, nieznaczne osłabienie mięśni	DMD	c.1601delA	DYSF, RYR1, PLEC x2, COL6A2, SCN4A, TTN x2
202	M	36	dorosłość	<1	przypadek sporadyczny	epizody rabdomiolizy bez stałego osłabienia mięśni			DES, TTN x2, LDB3/ZASP, ANO5, PLEC, COL6A1, COL4A1, AMPD1
849	F	57	późna dorosłość	2	przypadek sporadyczny	ostry początek z bólem lędźwi, osłabienie mięśni dystalnych kończyn dolnych			SYNE2, PLEC LARGE, GAA, SCN4A, ALDOA
456	M	18	wiek dojrzewania	14	przypadek sporadyczny	wewnątrzjądrowe wtręty widoczne w biopsji sugerujące miopatię wtrętową	SMCHD1	p.R630S*	PLEC, TTN x2
205	F	41	dorosłość	4	przypadek sporadyczny	przejęciowe problemy z oddychaniem po znieczuleniu ogólnym, bez jednoznacznych cech dystrofii w biopsji	PHKB CHRND	p.Q657K / N732S p.E24K	MYF6, MYH2 POMT1
200a	F	6	dzieciństwo	33	przypadek sporadyczny	poprawa po podaniu kortykosteroidów ; przeciwciała anti-Mi2	FLNC	p.G54D	DCTN1, NEB x2, TTN x2
362	F	37	wczesne dzieciństwo	<1	przypadek sporadyczny	jaskra i zaćma, leukoencefalopatia, przewaga zajęcia kończyn górnych			PLEC, SYNE2, LARGE, TTN, SCN4A
233	M	58	późna dorosłość	1,5	AD ?	początek choroby z objawem opadania stóp			ITGA7, SYNE2, ANG, LDHA, MYH3
277	F	56	wiek dojrzewania	<1	przypadek sporadyczny	początkowa długotrwała poprawa po podaniu kortykosteroidów			PLEC, DNM2, LDB3/ZASP, SYNE1, SCN4A, DMD X2

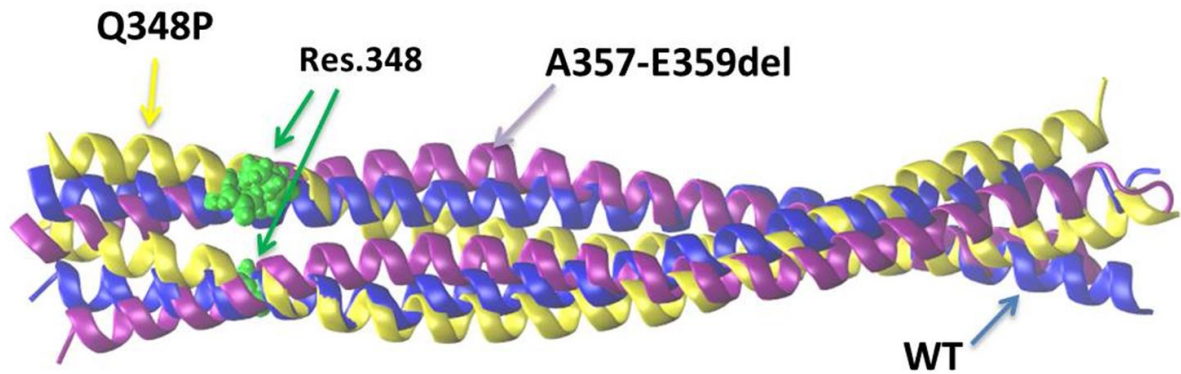
AR: dziedziczenie autosomalne recesywne, AD: dziedziczenie autosomalne dominujące, dzieciństwo <4 r.ż., dzieciństwo 4-11 r.ż., wiek dorastania 12-18 r.ż., wczesna dorosłość 19-29 r.ż., dorosłość 30-50 r.ż., późna dorosłość 51-65 r.ż., nazwy mutacji dla transkryptów kanonicznych, * oznacza mutację dotąd nie opisywaną

Tabela 5. Zidentyfikowane mutacje sprawcze oraz mutacje mogące przyczyniać się do powstania fenotypu klinicznego lub modyfikować jego charakter, w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem MFM.

pacjent	pleć	wiek	początek choroby	CK (x UNL)	historia rodzinna	dodatkowe cechy kliniczne	gen sprawczy	genotyp	inne geny z mutacjami prawdopodobnie wpływającymi na fenotyp
BS	M	14	wczesne dzieciństwo	5	przypadek sporadyczny	niewydolność oddechowa, mikrogyria	BAG3	p.R284L	CHRNE, LMOD3, RYR1, PLEC, SYNE2, MAMLD1, COQ4, TTN X2
2	F	50	dorość	2	AD, rodzina pacjentki nr 22		DES	c.1069_1077delGCCAGTGAG	FKRP, COL6A3, ITGA7, HSPG2 X3, CHKB, FLNC, RBM20, TTN x3
22	F	56	dorość	3	AD, rodzina pacjentki nr 2		DES	c.1069_1077delGCCAGTGAG	NEB, RYR1, MYH3, COL6A3, HSPG2 X4, FLNC, RBM20, TTN
23	M	28	wczesna dorość	7	AD, matka zachorowała w starszym wieku		DES	p.Q348P*	DNAJB6, DYSF, SYNE1, TMEM43, HSPG2 x2, FLNC, TTN x2
827a	F	33	wczesna dorość	3	przypadek sporadyczny		FLNC	p.R1241C	COL6A2, KBTBD13, SYNE2, POMGNT2, SEP1, SCN4A, TTN x3
931a	F	40	wczesna dorość	2,5	AD	zaćma, kardiomiopatia	CRYAB	p.D109A*	SYNE1 x2, HSPG2, TTN x2
940	M	17	wczesne dzieciństwo	2	przypadek sporadyczny				NEB, POMGNT2, DMD x2, TMPO

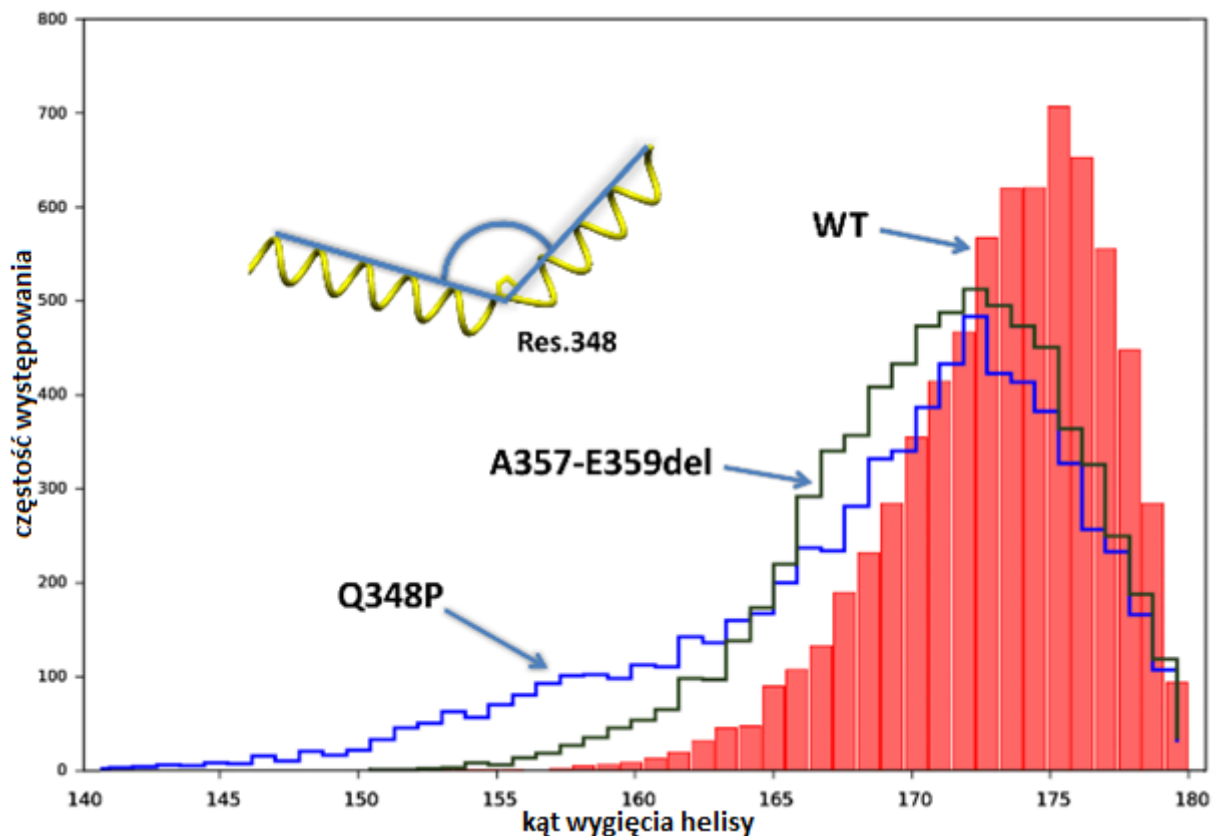
AR: dziedziczenie autosomalne recesywne, AD: dziedziczenie autosomalne dominujące, dzieciństwo <4 r.ż., dzieciństwo 4-11 r.ż., wiek dorastania 12-18 r.ż., wczesna dorość 19-29 r.ż., dorość 30-50 r.ż., późna dorość 51-65 r.ż., nazwy mutacji dla transkryptów kanonicznych, * oznacza mutację dotąd nie opisywaną

W wybranych przypadkach ocena wpływu mutacji uznanej za sprawczą nie ograniczała się do korelacji z fenotypem, a została poparta wynikami analiz *in silico* oraz *in vitro*. Modelowanie komputerowe zmutowanej desminy i krystaliny alfa-B wykonane w Laboratorium BioModelowania Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego we współpracy z zespołem prof. Sławomira Filipka wykazało zmiany w strukturze trzeciorzędowej tych białek (przykładowy wynik, Ryc. 2 i Ryc. 3). Natomiast w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego we współpracy z zespołem prof. Marii Jolanty Rędownicz analizowano obecność, a także rozmieszczenie wybranych zmutowanych białek (desmina, kalpaina 3, anoktamina 5, dysferlina, krystalina alfa-B) w strukturze mięśnia, wykazując zmiany rozmieszczenia i ilości analizowanych białek (przykładowy wynik, Ryc. 4).



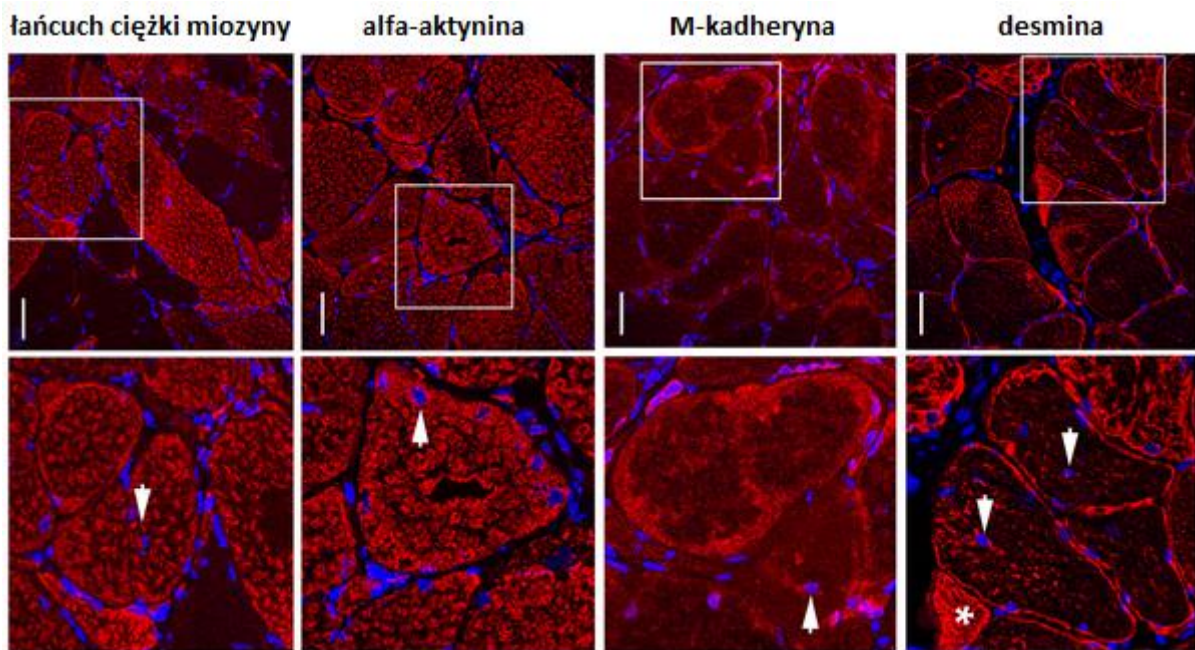
Ryc. 2 Modelowanie trzeciorzędowej struktury dimeru desminy.

Na niebiesko zaznaczono strukturę bez mutacji (WT), na fioletowo strukturę z mutacją A357-E359del (c.1069_1077delGCCAGTGAG), a na żółto strukturę z mutacją Q348P.



Ryc. 3 Histogram możliwego wygięcia helisy w punkcie aminokwasu 348 białka desminy.

Na czerwono zaznaczono przyjmowane wygięcie dla cząsteczki bez mutacji (WT), na ciemnozielono zaznaczono wyniki dla struktury z mutacją A357-E359del (c.1069_1077delGCCAGTGAG), a na niebiesko zaznaczono wyniki dla struktury z mutacją Q348P. Helisa bez mutacji jest minimalnie zgięta (175°). W przypadku modelu z mutacją Q348P zgięcie jest minimalnie większe z maksimum około 172° i większą możliwością dalszego wygięcia cząsteczki. Podobną elastyczność struktury wykazuje cząsteczka z mutacją A357-E359del. Zmiany te wpływają na zdolność desminy do dimeryzacji i tworzenia włókien.



Ryc. 4 Rozmieszczenie desminy w mięśniach z mutacją Q348P.

Przekroje poprzeczne mięśnia pacjenta wyznakowano przeciwciałami przeciw desminie, M-kadherynie, α -aktyninie 1 i przeciw łańcuchowi ciężkiemu miozyny (MHC). Odcinek oznacza długość 50 μ m. W dolnym panelu, dwukrotne powiększenie obszarów zaznaczonych w panelu górnym. Strzałki wskazują centralnie zlokalizowane jądra; gwiazdka - zanikające włókno. Widoczna jest ektopowa lokalizacja desminy z charakterystycznymi dla miopatii miofibrilarnej punktami agregacji tego białka. Wyniki porównano do wyznakowania tymi samymi przeciwciałami mięśni kontrolnych. Pełne wyniki zostały przedstawione w artykule: Fichna JP et al.: Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families [34].

4.2.2 Wyniki wyszukiwania wariantów w genach z ekspresją w mięśniach

Wyodrębniono 1329 wariantów ultra-rzadkich ($<0,1\%$ MAF), silnie uszkodzających (wg programów predykcyjnych), w konserwowanych regionach genów, które wg bazy GeneAtlas ulegają ekspresji w mięśniach, lub których mysie ortologi ulegają ekspresji w mięśniach. Wyłączono z analizy warianty w genach wiązanych z klinicznym fenotypem miopatii (warianty te zidentyfikowano i oceniono wcześniej). Warianty poddano następnie dalszej analizie w oparciu o ich powiązania z genami związanymi z LGMD i MFM wyszukując warianty w genach, których produkty białkowe występują w szlakach biochemicznych, w których uczestniczą białkowe produkty genów wiązanych z LGMD i MFM. W ten sposób zidentyfikowano 106 mutacji występujących w 27 genach (Tabela 6.). Średnio u poszczególnego pacjenta występuje od zera do trzech takich mutacji.

Tabela 6. Ulegające ekspresji w mięśniach geny, których produkty białkowe są w interakcji z produktami genów wiązanych uprzednio z LGMD i MFM, i w których znaleziono rzadkie warianty potencjalnie patogenne.

gen	białko	interakcja z produktami białkowymi genów
<i>AMOT</i>	angiomotina	<i>BAG3</i>
<i>ANK1</i>	ankrina 1	<i>TTN, RYR1</i>
<i>ANKRD2</i>	ankyrin repeat domain 2	<i>TCAP, TTN</i>
<i>ANKRD23</i>	ankyrin repeat domain 23	<i>TTN</i>
<i>ASB5</i>	arginine repeat and SOCS box containing 5	<i>CRYAB</i>
<i>ATP1B4</i>	polipeptyd 4 ATPazy beta	<i>POMT1, POMT2</i>
<i>C1QTNF9</i>	C1q and tumor necrosis factor protein 9	<i>COL6A1, COL6A2</i>
<i>CASP12</i>	kaspaza 12	<i>CRYAB</i>
<i>EVC2</i>	Ellis van Creveld gen 2	<i>TOR1AIP1</i>
<i>FYCO1</i>	FYVE and coiled-coil containing 1	<i>LMNA</i>
<i>HECW2</i>	ubikwityna E3 – białkowa ligaza 2, zawierająca domeny HECT, C2 i WW	<i>DYSF</i>
<i>HSPB2</i>	białko szoku cieplnego 2	<i>CRYAB, BAG3, FLNC, TCAP, TTN</i>
<i>MLIP</i>	białko mięśniowe w interakcji z LMNA	<i>LMNA</i>
<i>MYOZ1</i>	miozenina 1	<i>FLNC, TCAP</i>
<i>MYOZ3</i>	miozenina 3	<i>FLNC, TCAP</i>
<i>OPRM1</i>	receptor opioidowy mu-1	<i>TNPO3</i>
<i>PDLIM7</i>	PDZ and LIM domain 7	<i>BAG3, PLEC</i>
<i>RXRA</i>	retinoid x receptor alpha	<i>TRIM32</i>
<i>S100A1</i>	S 100 calcium binding protein a1	<i>BAG3, DES, RYR1</i>
<i>SIRT2</i>	sirtuin 2	<i>DMD, DNAJB6</i>
<i>SRRM2</i>	serine/arginine repetitive matrix 2	<i>PLEC, LMNA</i>
<i>SVIL</i>	supervillin	<i>LMNA</i>
<i>SYNM</i>	synemin	<i>DES</i>
<i>SYNPO2</i>	synaptopodin 2	<i>FLNC, BAG3</i>
<i>UBQLN4</i>	ubiquilin 4	<i>TRIM32</i>
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor a	<i>CRYAB, VHL</i>
<i>XIRP1</i>	xin actin-binding repeat containing 1	<i>FLNC</i>

4.2.3 Wyniki analizy wariantów zmiany liczby kopii

Rzadkie warianty liczby kopii w genach związanych z chorobą stwierdzono u osiemnastu pacjentów (Tabela 7.). Spośród nich w dziewięciu przypadkach za mutacje sprawcze uznano mutacje punktowe znalezione w innych genach związanych z LGMD. W jednym przypadku z uprzednio wykrytą mutacją punktową genu *COL6A3* dodatkowo wykryto delecję w obrębie tego genu, jednakże w przypadku tym mutacje punktowe genu *DYSF* dobrze wyjaśniają objawy i zostały ocenione jako główna przyczyna zachorowania. Warianty zmiany liczby kopii znajdowano najczęściej w genie kodującym tytynę i często towarzyszyły im mutacje punktowe, jednakże nadreprezentacja mutacji *TTN* jest powszechna, ze względu na rozmiar genu (powyżej 300 tysięcy par zasad). Należy w tym miejscu podkreślić, że wykrywanie wariantów zmiany liczby kopii z wykorzystaniem danych WES nie jest uznawane za w pełni wiarygodne i powinny być potwierdzane metodami cytogenetycznymi lub sekwencjonowaniem genomowym.

Tabela 7. Wykryte warianty zmiany liczby kopii (CNV) obejmujące geny związane z LGMD i MFM.

pacjent	typ wykrytych wariantów zmiany liczby kopii w obrębie następujących genów	gen sprawczy	inne geny z mutacjami prawdopodobnie wpływającymi na fenotyp
160a	duplikacje TTN		<i>CAPN3, BAG3, DES, NEB x2, TTN x2, CACNA1S</i>
127	duplikacja TTN	<i>CAPN3</i>	<i>RYR1, FLNC, –</i>
13	duplikacje TTN	<i>CAPN3</i>	<i>COL12A1, NEB</i>
4	duplikacje TTN	<i>CAPN3</i>	<i>FLNC, SYNE1, DCTN1, TTN x3</i>
144a	delecje TTN	<i>CAPN3</i>	<i>COL6A1, COL6A3, HNRNPDL, RYR1 x2, SYNE1, MYH7, TTN x5</i>
7	duplikacje TTN	<i>COL6A3</i>	<i>FLNC</i>
3	duplikacja TTN delecja COL6A3 duplikacja <i>DYSF</i> duplikacja <i>MYOT</i> delecja <i>LDB3</i>	<i>DYSF</i>	<i>PLEC, COL6A3</i>
84e	duplikacje i delecje TTN	<i>FKRP</i>	<i>TCAP, COL6A2, TTN x2</i>
21	delecje TTN	<i>SGCA</i>	<i>COL6A1, COL6A2, MYH2, LDB3/ZASP, POMT1</i>
270a	duplikacja <i>POMGNT1</i>	<i>TCAP</i>	<i>NEB X3, SYNE1, BVES, TTN x2</i>

	delecja TTN duplikacje DYSF duplikacja CAV3 duplikacje FLNC duplikacja RYR1		
179	delecje TTN		<i>CAPN3, COL6A2, DNM2, BVES, TTN x4</i>
214	duplikacje i delecje TTN duplikacja BVES		<i>CAPN3, COL6A3, POMT2, COL12A1, TTN x2</i>
191	duplikacja TTN		<i>CAPN3, FKR1, TTN x3</i>
170	duplikacje TTN		<i>CAPN3, SGCA, RYR1, CACNA1S, LDB3/ZASP,</i>
250a	duplikacje i delecje TTN delecja ISPD delecja FKTN delecja ANO5		<i>CAPN3, SGCD, HSPG2, TTN</i>
17	duplikacja i delecje TTN		<i>DMD, PLEC x2, LAMA2, ITGA7, MYH6, SYNE2, CACNA1S, NEB</i>
14	delecje TTN		<i>FLNC x2, TTN x2</i>
9	delecje TTN		<i>RYR1 x2, NEB, MYH7, FLNC, TTNx2</i>

5 Dyskusja:

5.1 Charakterystyka podłoża genetycznego LGMD i MFM w populacji polskiej

Przeprowadzone badania są pierwszą kompleksową analizą genetyczną należących do populacji polskiej pacjentów z rzadkimi miopatiami i dystrofiami mięśniowymi.

Wielostronna analiza bioinformatyczna umożliwiła identyfikację średnio 35,6 rzadkich wariantów w genach powiązanych z fenotypem osłabienia mięśni u każdego z pacjentów z LGMD. Wspomniane warianty znaleziono w genach wiązanych dotychczas z wieloma chorobami, nie tylko z dystrofiami obręczowo-kończynowymi, miopatiami miofibrylarnymi, czy miopatiami wrodzonymi.

Mutacje wykryto w genach, które można pogrupować ze względu na funkcjonalne lub strukturalne powiązania kodowanych przez nie produktów na wiązane (i) z kompleksem glikoprotein związanych z dystrofiną - DAPC (*SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, DAG1*), (ii) ze strukturą sarkomerów (*TCAP, TTN, PLEC, DES, MYOT*) lub ich powstawaniem (*CAPN3, DNAJB6*), (iii) z glikozylacją (*FKRP, POMT1, POMT2, POMGNT1, ISPD*), (iv) z transdukcją sygnału (*CAV3, DAG1, BVES*), (v) z transportem i segregacją białek (*TRAPPC11, CAV3, DYSF, BVES*), oraz (vi) ze splicingiem (*TNPO3, HNRPDL*).

Powyżej zaproponowany podział może stanowić początek próby ustalenia nowego sposobu wyróżniania i nowej klasyfikacji podtypów fenotypów obręczowo-kończynowych, wskazując nie tyle na uszkodzone mutacją białka, co na defektywne procesy i struktury. Klasyfikacja łącząca różnorodnie zmutowane geny umożliwi klasyfikowanie przypadków o dziedziczeniu wielogenowym.

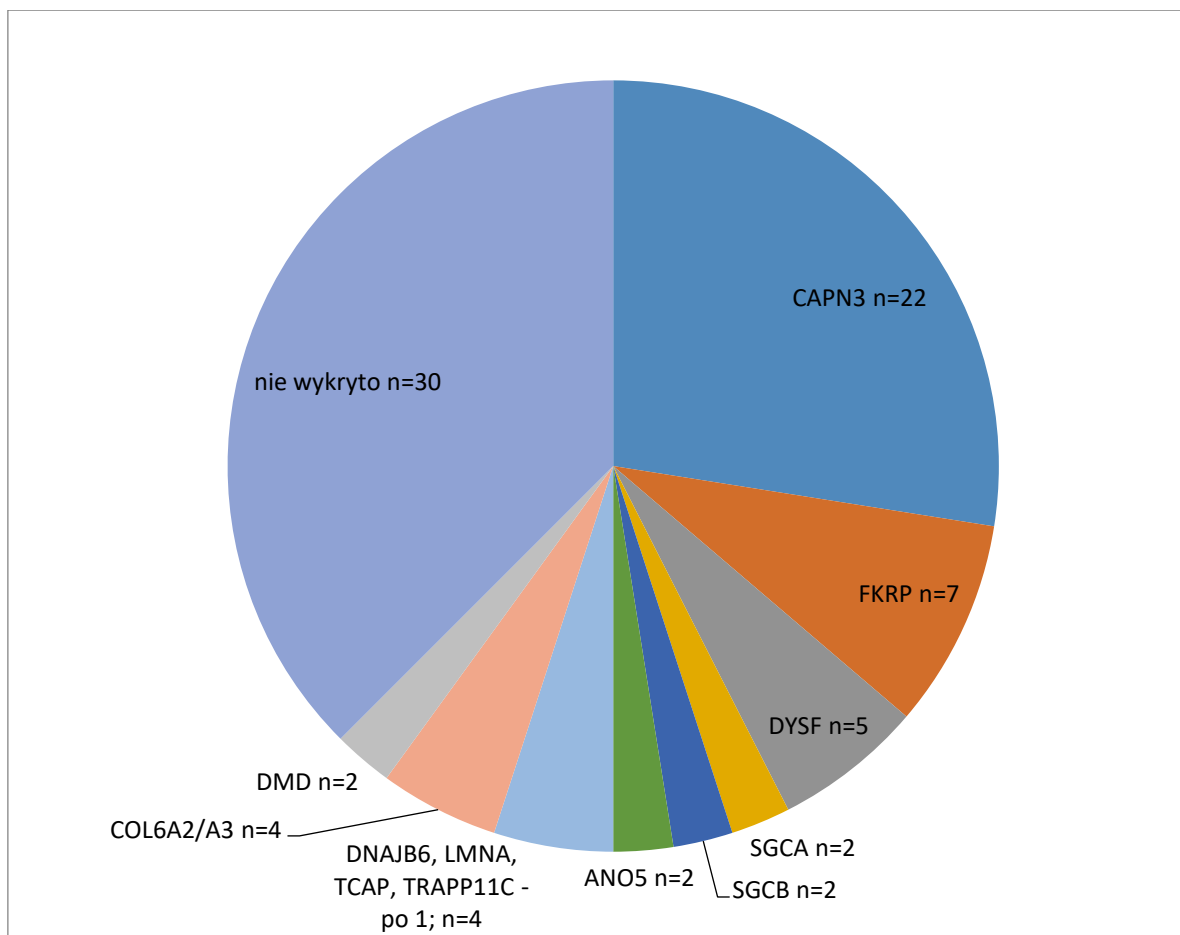
Po zestawieniu uzyskanych wyników genetycznych z cechami klinicznymi w 63,5% przypadków LGMD zidentyfikowano mutacje, które (na podstawie możliwego wpływu na produkty białkowe powiązane z fenotypami klinicznymi) można uznać za główne mutacje sprawcze. Uzyskane wyniki pokazują podobną skuteczność diagnostyczną do opublikowanych w ostatnich latach wyników badań z zastosowaniem NGS w grupach pacjentów z chorobami mięśniowymi, nie badanych wcześniej genetycznie. Na przykład u pacjentów z populacji czeskiej zidentyfikowano mutacje uznawane za sprawcze w 47%, w populacji chińskiej w 62%, a u pacjentów z Arabii Saudyjskiej w 76% [36–38]. Niższy udział zdiagnozowanych przypadków odnotowano w badaniach obejmujących wyłącznie pacjentów nie zdiagnozowanych we wstępnych, przesiewowych badaniach genetycznych: 33% w Niemczech, 40% w USA i 45% w Australii [39–41].

Wyniki sekwencjonowania eksomowego przeprowadzonego dla 85 pacjentów umożliwiły wstępne określenie częstości występowania mutacji poszczególnych genów. Częstość występowania poszczególnych podtypów LGMD była podobna do obserwowanej w Niemczech czy we Włoszech [39,42]. Można ocenić, że populacja polska nie odbiega znacząco od innych populacji środkowoeuropejskich, charakteryzujących się najpowszechniejszymi mutacjami w genie *CAPN3* oraz względnie częstymi przypadkami występowania mutacji genów *FKRP* i *DYSF*.

Mutacje genu *CAPN3* w układzie homozygotycznym, bądź heterozygoty złożonej wykryto w 22 rodzinach (26% przypadków LGMD). Dodatkowo w 13 przypadkach wykryto jedynie pojedynczą mutację w *CAPN3*, z tego w trzech przypadkach wykryto mutacje prawdopodobnie sprawcze w innych genach, a 10 przypadków pozostawało bez ustalonego genu sprawczego. Nadreprezentacja pojedynczych heterozygot genu *CAPN3*, w porównaniu do populacji ogólnej (w której przy 15% nosicieli udział homozygot i heterozygot złożonych musiałby wynosić aż 0,6%) oraz w porównaniu z grupą kontrolną w postaci 15 eksomów z populacji polskiej, sugeruje związek wspomnianych mutacji z fenotypem. Mutacje *CAPN3* mogą powodować zachorowanie wraz z wykrytymi mutacjami innych genów, lub też w połączeniu z drugą niewykrytą mutacją niewykrywalną metodą WES, wpływającą jakościowo lub ilościowo na ekspresję *CAPN3* (większa delekcja nie wykrywana metodą WES lub mutacja zlokalizowana poza eksomem, np. w obrębie promotora wpływająca na ekspresję białka). Pod względem oceny populacyjnej polskich nosicieli mutacji genu *CAPN3* warto odnotować duży udział mutacji c.500delA (26/170 alleli) będącej najpowszechniejszą mutacją genu *CAPN3* w Polsce [43], ale także w innych populacjach zachodniej i środkowej Europy. Znacznie bardziej interesująca jest natomiast powszechność występowania mutacji c.598-612delGTTCTGGAGTGCTCT (8/170 alleli), do tej pory wykrywanej rzadko (jeden przypadek w populacji bułgarskiej i jeden w chorwackiej) poza populacją rosyjską [44], co wskazuje na efekt założyciela i gradient występowania tej mutacji ze wschodu na zachód Europy.

Drugą najpowszechniejszą przyczyną zachorowań były mutacje genu *FKRP*, które są najpowszechniejszą przyczyną zachorowania w przypadkach dystrofii obręczowo-kończynowych w krajach Europy północnej (Wielka Brytania, Norwegia), wraz z wykrywaną często w innych populacjach mutacją L276I. Mutacje *FKRP* były uznane za przyczynowe w grupie siedmiu rodzin (8%), a mutacja L276I była wykryta w 10 z 170 analizowanych chromosomów u 85 pacjentów z LGMD.

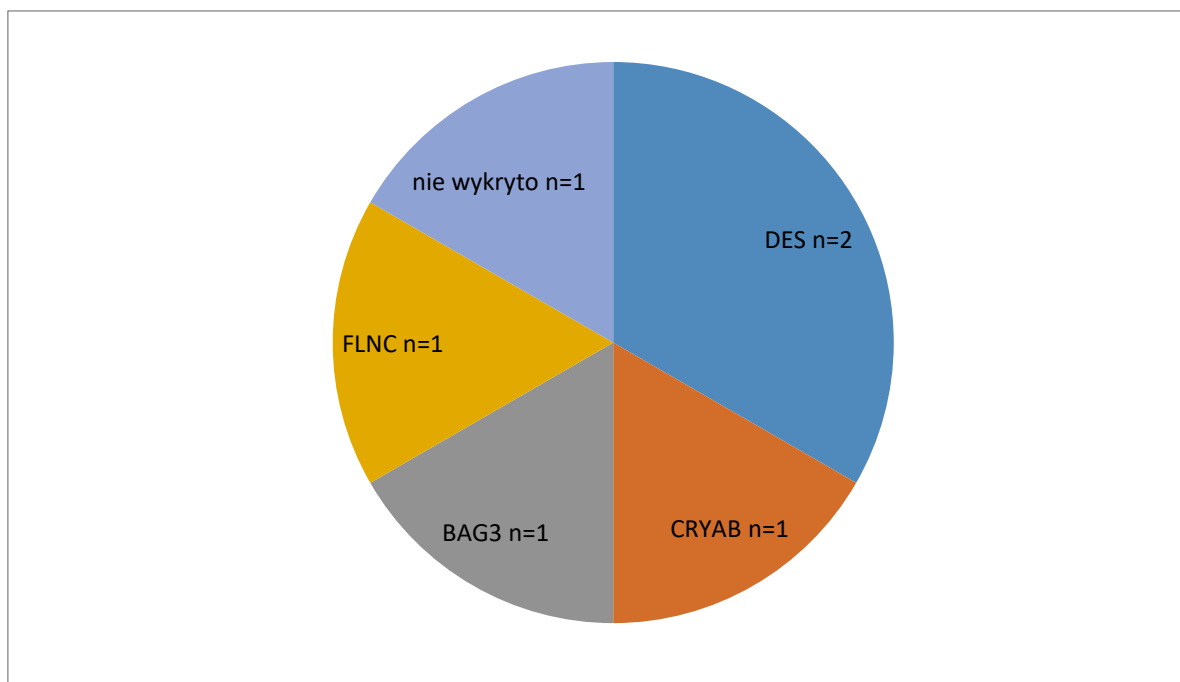
Pozostałe geny sprawcze w grupie LGMD (Ryc. 5) to: *DYSF* (5 przypadków), *COL6A3* (3), *SGCA* (2), *SGCB* (2), *DMD* (2), *ANO5* (2) oraz , *CAV3*, *CCDC78*, *COL6A2*, *DNAJB6*, *FLNC*, *LDB3/ZASP*, *LMNA*, *PHKB*, *SMCHD*, *TCAP*, *TRAPPC11*, (po jednym przypadku).



Ryc. 5 Wykryte mutacje uznane za sprawcze w przypadkach LGMD

Należy zwrócić uwagę na aż 11 przypadków z mutacjami w genach nie włączonych do aktualnej klasyfikacji LGMD, choć powiązanych z podobnymi chorobami mięśniowymi (*CCDC78*, *COL6A2*, *COL6A3*, *DMD*, *FLNC*, *LDB3/ZASP*, *PHKB*, *SMCHD*). Wskazuje to zarówno na rozszerzające się spektrum fenotypowe mutacji poszczególnych genów, jak na przykład w przypadku mutacji *COL6A3* opisywanych już w grupach pacjentów z rozpoznaniem LGMD, jak i na problemy z jednoznacznym diagnozowaniem miopatii na podstawie objawów klinicznych. Nietypowe i niejednoznaczne z punktu klinicznego fenotypy mogą być też wynikiem oddziaływań tła genetycznego w postaci mutacji i wariantów modyfikujących.

W grupie MFM mutacje sprawcze zidentyfikowano w 83% przypadków, z mutacjami w genie *DES* wykrytymi w dwóch przypadkach, oraz pojedynczymi przypadkami z mutacjami w genach *CRYAB*, *FLNC* i *BAG3* (Ryc. 6)



Ryc. 6 Wykryte mutacje uznane za sprawcze w przypadkach MFH

Wykryte mutacje w poszczególnych podgrupach klinicznych określonych jako spełniające pełne kryteria LGMD oraz te z nietypowym fenotypem, w którym jednakże głównym objawem było osłabienie mięśni obręczy i kończyn, pokazują trudność w klinicznej ocenie podtypu choroby (Tabela 8). Pierwszą różnicą była większa wykrywalność zmian prawdopodobnie sprawczych w grupie pacjentów o bardziej typowym obrazie klinicznym. Ważniejszą obserwacją był jednak brak w grupie fenotypów nietypowych mutacji genów związanych z LGMD, które można by uznać za sprawcze.

Tabela 8. Mutacje wykryte w grupach różnego szczegółowego rozpoznania klinicznego wśród pacjentów z LGMD

	pełne kryteria LGMD	niepełne kryteria LGMD
liczebność	73 pacjentów z 72 rodzin	12 pacjentów
udział wykrytych mutacji sprawczych	68%	42%
udział genów związanych z LGMD	61%	0%
udział pozostałych genów	7%	42%:

Warto także zwrócić uwagę na częściowo wspólne podłoże genetyczne przypadków LGMD i MFH. Co prawda, w grupie chorych z MFH w aż 5 na 6 przypadków zidentyfikowano mutację sprawczą związaną uprzednio z wspomnianym fenotypem klinicznym (2x *DES*, *CRYAB*, *BAG3*, *FLNC*), a jeden przypadek pozostał bez wskazanej przyczyny genetycznej, jednak wśród LGMD w dwóch przypadkach (*LDB3/ZASP*, *FLNC*) uznano za sprawcze mutacje

wiązane zazwyczaj z MFM. Warto też zauważyć że w trzech przypadkach wykrywano mutacje w genach (2x *DES*, *DNAJB6*) które są wiązane z obydwoma badanymi fenotypami. Jeszcze większe "nakładanie się" mutacji wiązanych ze wspomnianymi jednostkami chorobowymi, o częściowo nakładających się fenotypach klinicznych, widać wśród mutacji określonych jako „potencjalnie modyfikujące”. Także w przypadku wszystkich wariantów wyszukanych metodą analizy korelacji genotypu z fenotypem, widać nakładające się podłoże genetyczne LGMD i MFM. Mimo większej liczby wykrytych wariantów w genach już wiązanych z różnymi fenotypami chorób mięśniowych wśród kontroli (średnio 43,2 wariantu na próbkę), niż wśród przypadków LGMD (35,6 wariantu) i MFM (36,7)

Warianty potencjalnie modyfikujące fenotyp wykrywano w genach opisywanych w chorobach mięśni, jednak wątpliwe by to one były zasadniczą przyczyną choroby. Wniosek taki wyprowadzono analizując obecność innych mutacji, które w kontekście aktualnej wiedzy medycznej i genetycznej lepiej tłumaczyły zachorowanie, a w wielu przypadkach były opisywane jako mutacje sprawcze. Wyższa częstość występowania mutacji w bazach danych lub w grupie badanej również sugerowała by nie uznawać niektórych zmian za sprawcze, choć nie mogło to być podstawą do wykluczenia z grupy zmian potencjalnie dopełniających główne mutacje sprawcze.

W niektórych przypadkach mutacje uznane za przyczynowe wykryto w genach wiązanych z innymi chorobami mięśniowymi niż rozpoznane klinicznie, np. w nieuwzględnionych w klasyfikacji LGMD lub MFM. Jednakże mutacje niektórych z wspomnianych genów (*COL6A2*, *COL6A3* i *DMD*) były już identyfikowane w badaniach dużych grup pacjentów z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji [37–39,41]. Fakt ten wskazuje ponownie na istnienie spektrum fenotypów klinicznych w chorobach mięśniowych, co sprawia, że dokładne rozpoznanie kliniczne jest niekiedy trudne lub nawet niemożliwe. Uzyskane wyniki uzasadniają zatem konieczność szerszego spojrzenia na genetyczne przyczyny miopatii i dystrofii, wykraczającego poza analizę wyłącznie genów kandydujących.

Można domniemywać, że obecność dodatkowych wariantów może lepiej tłumaczyć różnice fenotypowe pomiędzy pacjentami z mutacjami tego samego genu, często nawet z tą samą mutacją sprawczą. Zwłaszcza w przypadku chorych z tej samej rodziny różnice manifestacji choroby mogą być wynikiem innego tła genetycznego, w skład którego wchodzi np. zaproponowane w tabeli 1 warianty modyfikujące fenotyp. Chociaż związek kodowanych przez wspomniane geny białek z konkretnymi objawami klinicznymi nie zawsze był wyraźny, to wymienione w Tabeli 4. i Tabeli 5. geny były już wiązane z podobnymi chorobami mięśniowymi i można zasadnie przypuszczać, że różne mutacje w ich obrębie mogą

powodować niekiedy rozbieżne fenotypy kliniczne, tak jak to jest w przypadkach wielu genów związanych z LGMD i MFM (Tabela 1. i Tabela 2.).

Przypadki w których nie udało się wskazać prawdopodobnych mutacji sprawczych zostały poddane ponownej ocenie klinicznej, biorąc pod uwagę miopatie nabyte i inne rodzaje dystrofii mięśniowych, takie jak FSHD, DM2 lub OPMD, które mogą być powodowane mutacjami zmiany liczby kopii (CNV) lub ekspansjami kilkunukleotydowych powtórzeń, które nie zawsze są wiarygodnie wykrywane w analizie WES. Z wyjątkiem jednego pacjenta, którego stan poprawił się po leczeniu steroidami, co sugeruje miopatię zapalną, kliniczne diagnozy (LGMD, MFM) nie uległy zmianie. Warto jednak zaznaczyć, że ze względu na heterogenność kliniczną i genetyczną nie można wykluczyć przypadków mieszanych z nakładającymi się objawami.

W przypadkach bez wykrytej mutacji sprawczej mutacje patogenne i warianty liczby kopii mogą znajdować się w regionach niekodujących lub głęboko intronowych. Jeśli tak jest w istocie, fakt ten może wyjaśniać np. wysoką liczebność chorych posiadających pojedyncze mutacje *CAPN3* w porównaniu do częstości nosicieli mutacji *CAPN3* w populacji ogólnej. Jednak wykrycie mutacji zlokalizowanych poza eksomem i bliskimi sekwencjami intronowymi oraz bliskimi regulatorowymi wymaga zastosowania sekwencjonowania całego genomu.

W przypadkach sporadycznych lub przypadkach pierwszych zachorowań w rodzinie przyczyną choroby mogą być też mutacje *post-zygotyczne*, występujące w materiale genetycznym zajętych chorobą mięśni, ale niekoniecznie obecne w leukocytach krwi obwodowej. Zjawisko takie opisywano uprzednio dla innych jednostek chorobowych [45].

W co najmniej czterech przypadkach fenotyp kliniczny pacjenta może być niewątpliwie lepiej wyjaśniony mutacjami w więcej niż jednym genie (*CAPN3* + *MYH7*, *COL6A3* + *CACNA1S*, *DYSF* + *MYH7* *PHKB* + *CHRND*), czyli poprzez zjawisko nazywane *double-trouble*. Podobnie w większości przypadków, oprócz wysoce prawdopodobnych patogennych mutacji w jednym genie, dodatkowe mutacje innych genów mogą przynajmniej dokładać się do obserwowanych objawów. Wytypowanie takich zmian modyfikujących z tysięcy nieistotnych wariantów każdego pacjenta stanowi jedno z najnowszych i trudniejszych wyzwań, z jakimi borykają się genetycy.

W każdym przypadku zidentyfikowano nowe i rzadkie warianty w genach związanych z LGMD, MFM i innymi miopatiami, jednakże ich prawdziwy wpływ nie może być jednoznacznie określony biorąc pod uwagę jedynie fenotyp pacjenta, historię rodzinną oraz literaturowy opis znanych mutacji wspomnianych genów.

5.2 Algorytmy poszukiwania mutacji sprawczych i modyfikujących fenotyp kliniczny

Przyjęta pierwotnie strategia identyfikacji wariantów, która wiąże geny z terminami z bazy danych HPO, wskazującymi na patologię fizjologii lub struktury mięśni jest powszechnie uważana za prawidłową i skuteczną [46,47]. Może jednak prowadzić do pominięcia wariantów zlokalizowanych w genach nie związanych dotychczas z chorobą mięśni. W celu lepszego wykorzystania danych WES nie ograniczających się tylko do wariantów w genach związanych ze znanymi chorobami, zastosowano strategię poszukiwania zmian we wszystkich genach ulegających ekspresji w mięśniach. Oceniając wykryte warianty w genach ulegających ekspresji w mięśniach pod kątem interakcji ich produktów białkowych z innymi białkami wykrywano u każdego pacjenta od 0 do 3 wariantów powiązanych z genami już opisywanymi w przypadkach LGMD i MFM. Ze względu na prawdopodobny sposób dziedziczenia i/lub obecność mutacji w grupie kontrolnej i/lub obecność innych wariantów, lepiej wyjaśniających fenotyp kliniczny, uznano, że jest mało prawdopodobne, by wspomniane mutacje mogły być mutacjami przyczynowymi, czy współprzyczynowymi. Mimo to wystąpienie u 18 pacjentów mutacji genu *SRRM*, w tym jednej delecji zmieniającej ramkę odczytu, a także u 13 pacjentów mutacji genu *SYNM*, w tym jednej mutacji przedłużającej otwartą ramkę odczytu (ang. *stop lost*) wydaje się nie być przypadkowe. Uzyskane wyniki sugerują, że we wspomnianej grupie 27 genów mogą występować rzeczywiste warianty modyfikujące objawy kliniczne choroby.

Połączenie różnych metod filtrowania wyników WES może pomóc w typowaniu genów kandydujących, których mutacje powinny być dokładniej badane w przypadkach chorób mięśniowych. Wykaz wybranych genów wcześniej nie związanych z LGMD czy MFM, których rzadkie warianty pojawiają się w naszych wynikach i które mogą być związane z patofizjologią LGMD i MFM przedstawiono w tabeli 9.

Wszystkie wymienione w Tabeli 9 geny były rozpatrywane w literaturze przedmiotu w kontekście chorób mięśniowych (innych niż LGMD i MFM), albo były uwzględniane w opisach struktury i funkcji białek mięśni.

Tabela 9. Wybrane geny, których mutację mogą przyczyniać się do wystąpienia zachorowania, a które nie były dotychczas związane z LGMD lub MFM.

gen	Białko	interakcja z produktami białkowymi genów
<i>OBSCN</i>	obskuryna	<i>TTN</i>
<i>MAP4</i>	białko towarzyszące mikrotubulom 4	<i>BAG3, TARDBP</i>
<i>MAST2</i>	kinaza 2 serynowo/treoninowa towarzysząca mikrotubulom	<i>DMD</i>
<i>CACNA1S</i>	kanał wapniowy, bramkowany napięciem, typ L, podjednostka alfa 1S	-
<i>MYH7</i>	łańcuch ciężki miozyny VII	<i>TPM2</i>

Na przykład, mutacje genu *OBSCN* wiążano z kardiomiopatią, jednakże ich możliwy wpływ na dystrofię mięśni był również dyskutowany. Mutacje genu *TTN* wiązane z LGMD osłabiają lub uniemożliwiają wiązanie tytyny z obskuryną [48]. W badanej grupie wykryto 25 rzadkich (<1%) mutacji w *OBSCN* u 26 pacjentów, w tym dwie powodujące zmianę ramki odczytu i jedną mutację wprowadzającą kodon stop. W ośmiu przypadkach wykryto dwie lub trzy mutacje heterozygotyczne, co sugeruje że mogą to być heterozygoty złożone, uszkodzające obydwa allele.

Rola produktu białkowego genu *MAP4* w sieci mikrotubuli i możliwy udział mutacji tego genu w chorobach mięśniowych był również omawiany w literaturze. Jedna z izoform *MAP4* organizuje sieć mikrotubuli uczestniczącą w różnicowaniu komórek mięśniowych [49,50]. W badanej grupie znaleziono 8 rzadkich, pojedynczych, heterozygotycznych mutacji *MAP4* u 10 pacjentów.

Podobnie kinaza serynowa/treoninowa 2 wiązana z mikrotubulami (*MAST2*) jest domniemanym łącznikiem pomiędzy siecią dystrofiny/utrofiny (*DMD/UTR*) a włóknami mikrotubuli [51]. Gen *MAST2* wraz z *OBSCN* typowano już jako gen kandydujący w miopatiach w innych badaniach wykorzystujących sekwencjonowania nowej generacji [52,53]. W naszej grupie zidentyfikowano osiem rzadkich pojedynczych mutacji heterozygotycznych u ośmiu pacjentów.

Mutacje *CACNA1S* były opisywane w hipokaliemicznym porażeniu okresowym i w złośliwej hipertermii, a ostatnio wykryto je w kilku przypadkach autosomalnej recesywnej lub dominującej wrodzonej miopatii [54]. Rzadkie mutacje *CACNA1S* wykryto w ośmiu naszych przypadkach, a jedna z nich prawdopodobnie jest odpowiedzialna za niektóre objawy, w tym obserwowane w biopsji prawie wyłącznie włókna typu I.

Natomiast mutacje *MYH7* opisano w kardiomiopatii, ale także w przypadkach wrodzonej miopatii bez objawów sercowych [55]. W naszej grupie stwierdzono rzadkie mutacje *MYH7* u czterech pacjentów. W dwóch przypadkach charakterystyczne cechy, w tym wczesny początek zachorowania i opadanie stóp, były charakterystyczne dla miopatii związanych z *MYH7*.

Wiele powszechnie występujących, uwarunkowanych genetycznie chorób mięśni wykazuje podobne objawy kliniczne czy charakter zmian mięśni, z LGMD i MFM. Osłabienie siły mięśni kończyn jest jednym z typowych objawów. Badania genetyczne wykorzystujące różnorodne techniki NGS mogą przyczynić się do precyzyjniejszej diagnozy tej klasy schorzeń [56–59]. Dodatkowo wraz z opisem nowych przypadków spektrum objawów klinicznych mutacji poszczególnych genów ulega często poszerzeniu. Jednakże szczegółowe wyniki NGS wskazują, że podłoże genetyczne chorób mięśniowych jest bardziej złożone niż dotychczas sądzono [60,61].

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie podejście metodyczne sugeruje, że nie tylko mutacje jednego genu mogą odpowiadać za fenotyp chorób mięśniowych. Biorąc pod uwagę zmienność fenotypową w obrębie tego samego podtypu LGMD czy nawet wśród pacjentów z tą samą mutacją przyczynową [21,62] możemy oczekiwać silnego wpływu mutacji modyfikujących, chociaż w przypadkach LGMD i MFM nie opisano jeszcze żadnego konkretnego silnego modyfikatora, ani tym bardziej genów współsprawczych.

W przedstawionych w rozprawie przypadkach z wykrytymi już opisanymi mutacjami przyczynowymi można znaleźć co najmniej kilkanaście mutacji, potencjalnie modyfikujących fenotyp kliniczny, biorąc pod uwagę jedynie geny związane z patologią mięśni. Jest zatem wysoce prawdopodobne, że spektrum czynników genetycznych wpływających na chorobę jest szersze niż dotychczas uznawano. Nie tylko bardzo rzadkie mutacje o uznanym, dużym wpływie na fenotyp, ale także mniej rzadkie warianty oraz prawdopodobnie bardziej powszechne czynniki ryzyka mogą przyczynić się do patologii. Niedawno wykazano, że powszechnie występujący w populacji polimorfizm genu *LTPB4* jest czynnikiem modyfikującym w przebiegu dystrofinopatii [7]. Co więcej, w niektórych przypadkach mutacje w więcej niż jednym genie są uznaną przyczyną choroby. Na przykład dziedziczenie dwugenowe (wspomniane zjawisko *double-trouble*) zostało udowodnione dla podtypu FSHD [63], we wrodzonym zespole miastenicznym [64], a w przypadku kalpainopatii było sugerowane [8]. W badanej grupie dwa przypadki *double trouble*, w których wskazano mutacje w dwóch genach jako prawdopodobną przyczynę zachorowania, zostały znalezione u pacjentów bez rodzinnej historii choroby (Tabela 4.). Również nadmierna reprezentacja

pojedynczych heterozygotycznych mutacji *CAPN3* w grupie badanej może być wyjaśniona przez możliwe dziedziczenie dwugenowe lub oligogenowe (Tabela 4.). Oligo- lub poligenowa etiologia może być więc szczególnie wyraźna i łatwiejsza do interpretacji w przypadkach, w których nie wskazano mutacji sprawczych, a także w przypadkach sporadycznych.

Białka komórki mięśniowej stanowią złożoną maszynę, w której strukturalne lub funkcjonalne upośledzenie któregośkolwiek z elementów może powodować zaburzenia funkcjonowania mięśni i ich degradację. Kumulacja wielu pojedynczo "łagodnych" wariantów (ang. *mutation burden*) może powodować podobny fenotyp, jak mutacja genu o dużym efekcie. Różne konfiguracje wariantów w wielu genach mogą też w mniejszym lub większym stopniu uwrażliwiać pacjentów na zewnętrzne czynniki ryzyka związane ze stylem życia, aktywnością fizyczną czy dietą.

Z drugiej strony należy pamiętać, że niektóre mutacje opisane jako sprawcze przed wprowadzeniem do szerokiego stosowania technik wysokoprzepustowych, mogą wywierać wpływ jedynie modyfikujący [21] i wymagają dodatkowych mutacji współsprawczych, by spowodować objawy kliniczne. Bardzo możliwe, że w niektórych publikacjach sprzed kilkunastu lat opisano jako sprawcze zmiany, które nie mają dużego wpływu na zachorowanie.

Wyniki różnych strategii filtrowania wyników sekwencjonowania następnej generacji udowodniły, że sekwencjonowanie nowej generacji jest nie tylko skuteczną metodą ustalania genetycznej diagnozy, ale mają potencjał do wszechstronnego opisu zmian genetycznych przyczyniających się do rzeczywistej i heterogennej klinicznej manifestacji choroby.

Dostępnych jest wiele narzędzi opisujących wyszukane warianty, które stosują różne algorytmy i korzystają z różnych baz danych by pomóc lepiej ocenić funkcjonalne efekty mutacji. Należy jednak wziąć pod uwagę, że wyniki oceny wariantów mogą się różnić znacznie pomiędzy bazami danych i narzędziami przewidującymi patogenność, ponieważ mogą one opierać się na różnych aspektach funkcjonalnych i wstępnej wiedzy. W rzeczywistości wiele narzędzi do opisu zmian wykorzystuje znajomość wcześniej zidentyfikowanych mutacji sprawczych, więc analizy na nich oparte są ograniczone dotychczasową wiedzą.

Wyższosc wieloskalowej analizy bioinformatycznej polega jednak na możliwości wykorzystania różnych narzędzi do oceny wyszukanych wariantów, a zwłaszcza na możliwości powrotu do analizy istniejących danych. Wprowadzenie do rutynowych badań sekwencjonowań całego eksomu i genomu zwiększa liczbę zidentyfikowanych wariantów zarówno potencjalnie patogennych, a tym samym wydajność diagnostyczną, jak zwłaszcza zmian potencjalnie modyfikujących fenotyp.

5.3 Oligogenowe choroby mendlowskie

Z przedstawionych powyżej badań wynika wniosek, że choroby mięśniowe, takie jak LGMD i MFM można lepiej opisywać jako zaburzenia oligogenowe lub nawet poligenowe, w których zmienna manifestacja kliniczna może wynikać z połączonego działania mutacji wielu genów. Kombinacje wariantów w wielu genach, w różnym stopniu upośledzających lub zmieniających funkcję kodowanych białek mogą powodować szerokie spektrum objawów klinicznych. Liczba wykrywanych wariantów w genach związanych z różnymi miopatiami sugeruje, że oligogenowe dziedziczenie rzadkich wariantów może być istotne także u pacjentów z wykrytą pierwotną mutacją patogenną. W tym kontekście zmienność kliniczna pomiędzy nosicielami tych samych mutacji sprawczych, a także ta pomiędzy chorymi w obrębie rodziny, mogłaby być odbiciem specyficznego tła genetycznego i obecności różnych konfiguracji wariantów modyfikujących fenotyp lub nawet współsprawczych. Jednakże, identyfikacja wariantów bezdyskusyjnie sprawczych, współsprawczych i modyfikujących będzie wymagać kompleksowych bioinformatycznych analiz zestawów szczegółowych danych genomowych i klinicznych pochodzących od dużych grup pacjentów [65]. Bazy danych z takimi informacjami powinny gromadzić wyniki analiz sekwencjonowań nowej generacji z całego świata, ponieważ rzadkie mutacje są znacznie bardziej geograficznie i etnicznie rozproszone w porównaniu z wariantami powszechnymi [66]. Takie dokładne badania genetyczne powinny być łączone nie tylko z głębokim fenotypowaniem, ale także z kolejnymi etapami obejmującymi analizę transkryptomu i analizę ekspresji izoform białkowych. Przedstawione wyniki mogą być traktowane jako pierwszy krok w kierunku dokładnego poznania czynników genetycznych, a w konsekwencji mechanizmów wpływających na rozwój choroby, niezbędnych do wskazywania kierunków w poszukiwaniach terapii.

6 Podsumowanie:

Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji do określania podłoża genetycznego chorób mięśni, zaowocowało zidentyfikowaniem u każdego z pacjentów dużej liczby wariantów o potencjalnym wpływie na fenotyp. Wspomniane odkrycia kwestionują tradycyjne, monogenowe postrzeganie chorób dziedzicznych, wynikające z opartej na hipotezach strategii sekwencjonowania sangerowskiego. Również dostępność danych z sekwencjonowań całego eksomu i genomu w badaniach innych chorób podważa klasyczną definicję jednej mutacji sprawczej i pokazuje złożoność ludzkiego genomu [18]. Na podstawie częstości błędów w procesie replikacji DNA (1×10^{-8} / nukleotyd) można obliczyć że każda mejoza wprowadza ok. 55 wariantów *de novo*, które stanowią źródło tła genetycznego złożonego z rzadkich mutacji wpływających na różnorodność fenotypową, także w przypadkach chorobowych [67].

Przedstawione wyniki wskazują na szereg podobnych choć zróżnicowanych fenotypów związanych nie tylko z genami typowymi dla LGMD i MFM, ale także z genami wiązanymi dotychczas z podobnymi zaburzeniami mięśni, miopatiami Bethlem, czy dystrofiami wrodzonymi, a także genami, których mutacje nie były wcześniej bezpośrednio związane z fenotypem osłabienia mięśni. Nawet jeśli nie zawsze jest możliwe udowodnienie wpływu potencjalnych wariantów modyfikujących fenotyp, to łączna analiza wykrytych mutacji sugeruje, że zwykle obciążenie dużą liczbą mutacji o małym wpływie (ang. *mutational burden*) może przyczynić się do zmienności fenotypowej.

Na podstawie przedstawionych w rozprawie danych można pokusić się o stwierdzenie, że rzadkie dystrofie i miopatie, takie jak LGMD i MFM, lepiej definiować jako zaburzenia oligogenowe lub nawet poligenowe, w których zmienna manifestacja fenotypowa może wynikać z połączonego działania mutacji w wielu genach. Takie podejście do podłoża genetycznego miopatii lepiej wyjaśnia fakt, że metody NGS nie identyfikują pojedynczego głównego genu przyczynowego w wielu przypadkach LGMD, ale praktycznie w każdym przypadku wskazują na wiele mutacji potencjalnie patogennych i / lub modyfikujących objawy. Wielość wariantów genomowych wykrywana jest również w przypadkach, w których dość łatwo można wskazać główną mutację sprawczą w pojedynczym genie. W niektórych przypadkach także mutacje drugiego genu można łatwo powiązać z jednym lub dwoma charakterystycznymi objawami dodatkowymi. Wielogenowe podłoże dziedziczne lepiej tłumaczy szerokie spektrum objawów klinicznych, które płynnie przechodzą pomiędzy poszczególnymi chorobami mięśniowymi. Lepiej tłumaczy także niejednorodność kliniczną nie

tylko wśród LGMD i MFM, nie tylko wśród podtypów tych chorób, ale także wśród osób chorych, mających takie same znane mutacje patogenne, w tym w obrębie tej samej rodziny.

Dalsza i pewna identyfikacja wariantów modyfikujących wymaga kompleksowych analiz bioinformatycznych, z wykorzystaniem baz danych integrujących wyniki sekwencjonowania nowej generacji z dokładnym opisem klinicznym [65].

Można oczekiwać, że wraz ze zwiększaniem ilości dostępnych danych genomowych z dużych i zróżnicowanych etnicznie grup pacjentów z różnymi chorobami mięśniowymi, podejścia metodyczne analizujące geny ze względu na uczestnictwo w szlakach lub strukturach powiązanych z fenotypem klinicznym będą coraz skuteczniejsze. Przejście od stosowanych powszechnie sekwencjonowań całego eksomu do sekwencjonowań całego genomu umożliwi określenie wpływu licznych wariantów zlokalizowanych w obszarach niekodujących [68].

W rezultacie tradycyjna genetyczna klasyfikacja chorób mięśni powinna ewoluować w kierunku grupowania podobnych fenotypów klinicznych powodowanych dysfunkcją struktur i/lub szlaków biochemicznych, a nie tylko poszczególnych białek kodowanych przez pojedyncze geny z wykrytą mutacją uznaną w przeszłości za sprawczą [69].

7 Wnioski:

Uzyskane wyniki sugerują, że sekwencjonowanie całego eksomu może być skutecznie stosowane jako metoda diagnostyczna w miopatiach. Badanie WES umożliwia szybkie wykrywanie mutacji sprawczych w znanych genach u ponad 60% badanych. W innych przypadkach może prowadzić do powiązania nowych genów z badaną chorobą.

Dodatkowo sekwencjonowanie nowej generacji w połączeniu z zaawansowaną analizą bioinformatyczną umożliwia pełniejsze przedstawienie podłoża genetycznego choroby i wytypowanie mutacji współsprawczych i potencjalnie modyfikujących fenotyp.

Uzyskane wyniki uzasadniają potrzebę zaproponowania nowego podziału chorób mięśniowych (w tym podziału LGMD i MFM), na podstawie powiązania cech klinicznych ze szlakami oraz strukturami komórkowymi, które tworzą białka kodowane przez geny z wykrytymi mutacjami sprawczymi, współsprawczymi bądź modyfikującymi.

8 Streszczenie:

Miopatie to grupa niejednorodnych klinicznie i genetycznie chorób, w których zaburzone funkcjonowanie włókien mięśniowych skutkuje osłabieniem siły mięśni. Badania podłoża genetycznego różnych chorób mięśniowych przyczyniają się do zrozumienia patofizjologii tej klasy chorób, a w konsekwencji do wypracowania przyczynowych form leczenia. Miopatie miofibrylarne (ang. *myofibrillar myopathies*, MFM) oraz dystrofie obręczowo-kończynowe (ang. *limb girdle muscular dystrophies*, LGMD) stanowią heterogenne grupy rzadkich dziedzicznych schorzeń mięśniowych o nakładających się fenotypach klinicznych. Różnicowanie pomiędzy wyżej wymienionymi jednostkami chorobowymi, a zwłaszcza między ich podtypami, jedynie na podstawie cech fenotypowych, kliniczno-patologicznych, jest niezwykle trudne. Identyfikacja mutacji sprawczych to obecnie najbardziej precyzyjna metoda diagnostyczna. Jednakże pomimo trwających od ponad 20 lat badań, podłoże genetyczne obu miopatii pozostaje w dużej części nieokreślone.

Celem pracy było:

1. poznanie podłoża genetycznego, a w szczególności mutacji sprawczych, MFM, LGMD oraz pokrewnych fenotypów klinicznych w populacji polskiej.
2. wytypowanie nowych genów, których mutacje mogą mieć wpływ na wystąpienie i stopień objawów choroby (geny sprawcze, współsprawcze i modyfikujące fenotyp).
3. oszacowanie udziału podtypów LGMD i MFM wśród chorych z miopatiami w populacji polskiej.
4. wskazanie możliwych elementów nowego podziału MFM i LGMD, opartego na wskazaniu nowych elementów biochemicznych i strukturalnych, mogących leżeć u podłoża wspomnianych chorób.

Badaniami objęto 85 chorych z 84 rodzin z klinicznym rozpoznaniem dystrofii obręczowo-kończynowej oraz 20 chorych z 11 rodzin z diagnozą miopatii miofibrylarnych. Jako kontrolę wykorzystano wyniki badań 16 pacjentów z chorobami neurologicznymi bez objawów mięśniowych, a także informacje z ogólnie dostępnych baz danych. Do sekwencjonowania eksomowego zakwalifikowano łącznie 92 przypadki dystrofii i miopatii.

Strategie filtrowania mające na celu zidentyfikowanie wariantów prawdopodobnie związanych z chorobą obejmowały: analizę danych WES poprzez powiązanie poszczególnych genów z fenotypami osłabienia mięśni, szczegółową analizę wariantów w genach ulegających

ekspresji w mięśniach, analizę wariantów w genach, których produkty białkowe należą do interaktomu badanych chorób oraz analizę wariantów liczby kopii.

Wskazanie mutacji sprawczych było możliwe w 63,5% przypadków LGMD i 83% przypadków w grupie MFM. Mutacje przeważnie identyfikowano w genach związanych dotychczas z LGMD i MFM, ale także w genach niewłączanych do obecnej klasyfikacji wspomnianych chorób (*DMD*, *COL6A2* i *COL6A3*). U czterech chorych za przyczynę choroby uznano mutacje w dwóch genach (*CAPN3* + *MYH7*, *COL6A3* + *CACNA1S*, *DYSF* + *MYH7*, *PHKB* + *CHRND*). Ponadto u wszystkich chorych stwierdzono liczne warianty w genach powiązanych z różnymi objawami chorób mięśniowych. W grupie LGMD identyfikowano średnio 35,6, a w grupie MFM 36,7 tego typu wariantów. Dodatkowo stwierdzono rzadkie warianty w obrębie genów niewiązanych wcześniej z chorobami mięśni, ale ulegających ekspresji w mięśniach i których produkty białkowe są partnerami produktów białkowych genów już wiązanych z LGMD i MFM.

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność metod sekwencjonowania nowej generacji w wykrywaniu głównych mutacji sprawczych. Liczba potencjalnych mutacji modyfikujących i przypadki w których jako sprawcze uznano mutacje w dwóch genach sugerują bardziej skomplikowane podłoże genetyczne chorób mięśniowych.

Na podstawie uzyskanych danych można zatem uznać, że LGMD i MFM lepiej definiować jako zaburzenia oligogenowe lub poligenowe, w których zmienna prezentacja kliniczna wynika z połączonych efektów mutacji w wielu genach. W tym kontekście obserwowana zmienność między przypadkami z wykrytymi tymi samymi mutacjami sprawczymi, nawet w obrębie tej samej rodziny, mogłaby odzwierciedlać specyficzne tło genetyczne i obecność różnych zestawów wariantów modyfikujących fenotyp lub wręcz wariantów współsprawczych. Jednakże wskazanie wariantów współzależnych i modyfikujących będzie wymagało bioinformatycznej analizy połączonych danych genomowych i klinicznych dużych grup etnicznie zróżnicowanych pacjentów z różnymi chorobami mięśniowymi. Przedstawione wyniki są jednym z pierwszych kroków w tym kierunku.

9 Abstract:

Myopathies are a group of clinically and genetically heterogeneous diseases in which the muscle fibers do not function properly, which results in muscular weakness. Research on the genetic background of various diseases of the muscle provide better understanding of the molecular mechanisms of the disease and can lead to introduction of novel targeted therapies.

Myofibrillar myopathies (MFM) and limb girdle muscular dystrophies (LGMD) are heterogeneous hereditary rare myopathies with similar clinical symptoms. Due to an overlap of symptoms, differential diagnosis between them and between the subtypes of the disease is a challenge. Results of genetic testing can provide the most precise diagnosis.

The aim of the study was to

1. comprehensively identify the genetic background, of MFM, LGMD, and similar phenotypes, in the Polish population.
2. propose novel causal and co-causal genes and modifiers of the clinical symptoms
3. assess LGMD and MFM subtypes frequencies
4. propose a novel classification of MFM and LGMD based on the affected biochemical pathways and structures

The study group comprised 85 LGMD patients from 84 families and 20 MFM patients from 11 families. Results obtained from additional 16 neurological patients without muscle involvement were used as a control group. Whole exome sequencing was performed in 92 patients.

Filtering strategy aimed at identification of variants plausibly related to the disease included integrative analysis of WES data and human phenotype ontology (HPO) terms, analysis of genes expressed in muscle, analysis of disease-associated interactome and copy number variants analysis.

A reasonably robust genetic diagnosis was possible in 63.5% of LGMD cases and 83% of MFM cases. On average 36.3 rare variants in genes previously associated with various muscle diseases per patient were found that could relate to the myopathic clinical phenotype. The putative causal mutations were mostly in LGMD-associated genes, but also in genes not included in the current LGMD classification (*DMD*, *COL6A2*, and *COL6A3*). In four patients mutations in two genes were suggested as the joint cause of the disease (*CAPN3* + *MYH7*, *COL6A3* + *CACNA1S*, *DYSF* + *MYH7*, *PHKB* + *CHRND*). Moreover, in all patients a variety

of phenotype-modifying variants were postulated in genes previously associated with various muscle diseases. On average 35.6 such variants were found in each LGMD patient, and 36.7 in each MFM patient. In addition, rare variants were found in genes not associated with muscle disease, but expressed in skeletal muscle and in the interactome of the protein products of known LGMD and MFM genes.

The results confirm that next generation sequencing is a suitable method of molecular diagnosis and of main causal mutation detection. The number of potentially modifying variants and cases with possible digenic inheritance indicate the complexity of muscle disease genetic background.

Based on the obtained data one can propose that LGMD and MFM could be better described as a group of oligogenic or even polygenic disorders in which variable clinical presentation can result from combined effects of mutations in many genes. In this view, the inter-, as well as intrafamilial variability could reflect a specific genetic background and the presence of different sets of phenotype-modifying or co-causal variants in genes that either interact with the known LGMD-associated genes or are a part of the same pathways. However, pinpointing of co-causal and modifying variants will require bioinformatic analysis of combined genomic and clinical data on large groups of ethnically diverse patients with various muscle diseases and eventually followed by functional *in vivo* studies. Presented results are the first step towards this goal.

10 Spis rycin i tabel:

Tabela 1. Klasyfikacja dystrofii obręczowo-kończynowych.	9
Tabela 2. Klasyfikacja miopatii miofibrylarnych.	11
Ryc. 1 Procedura analizowania wyników sekwencjonowania całego eksomu.	18
Tabela 3. Przykładowe wyniki wyszukiwania wariantów w genach związanych z objawami osłabienia mięśnia.	25
Tabela 4. Zidentyfikowane mutacje sprawcze oraz mutacje mogące przyczynić się do powstania fenotypu klinicznego lub modyfikować jego charakter, w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem LGMD.	26
Tabela 5. Zidentyfikowane mutacje sprawcze oraz mutacje mogące przyczynić się do powstania fenotypu klinicznego lub modyfikować jego charakter, w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem MFM.	33
Ryc. 2 Modelowanie trzeciorzędowej struktury dimeru desminy.	34
Ryc. 3 Histogram wygięcia helisy w punkcie aminokwasu 348 białka desminy.	34
Ryc. 4 Rozmieszczenie desminy w mięśniach z mutacją Q348P.	35
Tabela 6. Ulegające ekspresji w mięśniach geny, których produkty białkowe są w interakcji z produktami genów związanych uprzednio z LGMD i MFM, i w których znaleziono rzadkie warianty potencjalnie patogenne.	36
Tabela 7. Wykryte warianty zmiany liczby kopi (CNV) obejmujące geny związane z LGMD i MFM.	37
Ryc. 5 Wykryte mutacje uznane za sprawcze w przypadkach LGMD	41
Ryc. 6 Wykryte mutacje uznane za sprawcze w przypadkach MFM	42
Tabela 8. Mutacje wykryte w grupach różnego szczegółowego rozpoznania klinicznego wśród pacjentów z LGMD	42
Tabela 9. Wybrane geny, których mutację mogą przyczynić się do wystąpienia zachorowania, a które nie były dotychczas związane z LGMD lub MFM.	46

11 Uzupełnienie:

LGMD1A jest powodowane przez mutacje miotyliny (*MYOT*). Cechy kliniczne nakładają się z miotilinopatią – miopatią miofibrylarną również powodowaną przez mutację genu *MYOT*. Gen ten posiada 9 eksonów kodujących, w których dotychczas wykryto 16 mutacji zmiany sensu zgodnie z informacją w bazie Leiden Open Variants Database (LOVD [70]). Pięć przypadków związanych jest z fenotypem LGMD1A, natomiast pozostałe mutacje dezorganizują strukturę linii Z i powodują miopatie miofibrylarne. Miotylina funkcjonuje jako białko stabilizujące linię Z występując obok alfa aktyniny i tytyny.

LGMD1A charakteryzuje późnym początkiem i powolnym przebiegiem. Objawy obejmują osłabienie mięśni pasów biodrowego, a następnie barkowego, a także charakterystyczną nosową mowę dyzartryczną. Poziom CK w surowicy jest prawidłowy lub nieznacznie podwyższony. W obrazie mikroskopowym można zauważyć zwyrodnienie włókien mięśniowych, różnice w rozmiarze włókien, rozszczepianie włókien, centralne położenie jąder komórkowych, dużą liczbę autofagicznych pęcherzyków. Mikroskopia elektronowa pokazuje też rozmycie linii Z (tzw. *Z-line streaming*) [71–76].

LGMD1B jest powodowane mutacjami laminy A/C (*LMNA*). Główna funkcja laminy A/C, tworzącej sieć włókien leżących głównie poniżej wewnętrznej błony jądrowej, jest strukturalna. Oprócz łączenia jądra komórkowego z cytoplazmą, odgrywa też rolę w organizacji chromatyny, wpływa na transkrypcję i mitozę. Tłumaczy to ilość fenotypów powodowanych różnymi mutacjami genu *LMNA*. Oprócz LGMD1B do spektrum laminopatii zalicza się inne choroby mięśniowe (dystrofię Emery-Dreifussa, kardiomiopatię rozstrzeniową, zespół Holt-Orama „serce-ręka”), chorobę Charcot-Marie-Tooth, różne podtypy lipodystrofii (w tym zespół Seipa-Berardinelliego) i progerii (Hutchinsona-Gilforda, zespół Wernera). Dotychczas wykryto 72 mutacje wpływające na sekwencję aminokwasów laminy A/C, wszystkie w pierwszych 11 z 12 eksonów (LOVD). Opisano też jedną mutację synonimiczną, która wpływając na splicing powoduje LGMD1B. Pacjenci charakteryzują się wolno postępującym osłabieniem mięśni obręczy biodrowej, z późniejszym osłabieniem mięśni ramion. Z wiekiem mogą pojawiać się problemy kardiologiczne w węzłem przedsionkowo-komorowym i kardiomiopatia rozstrzeniowa. Poziom CK w surowicy pozostaje prawidłowy lub jest łagodnie podwyższony [77–85].

LGMD1C jest powodowane mutacjami kaweoliny 3 (*CAV3*). Kaweolina 3 to mięśniowo specyficzne transbłonowe białko z rodziny kaweolin, które odpowiadają za powstawanie i utrzymanie kaweoli – małych wgłębień w błonie komórkowej o odmiennym składzie lipidowym, gdzie koncentrują się kanały jonowe, kinazy i cząsteczki sygnałowe. Kaweolina 3 jest też obecna w kanalikach T magazynujących jony wapnia, a więc miejsca kluczowe dla inicjowania skurczu. Dodatkowo opisywana interakcja z białkami dysferliny, kompleksu sarkoglikanowego, czy receptora rianodynowego może być wytłumaczeniem fenotypów związanych z mutacjami *CAV3*. Dotychczas zidentyfikowano 46 mutacji zmiany sensu, które mogą powodować także miopatię z falowaniem mięśni, miopatię dystalną, idiopatyczną hiperCK-emię, czy kardiomiopatię przerostową. U pacjentów z LGMD1C zaobserwowano łagodnie postępujące osłabienie mięśni ud, przerost łydki, objaw Gowensa i 3-40x podwyższony poziom CK w surowicy. Mogą łatwiej występować bóle i skurcze mięśni po wysiłku. Obecność białka kaweoliny3 w mięśniach jest wyraźnie zmniejszona [86–93].

U pojedynczej rodziny z **LGMD1D** i kardiomiopatią rozstrzeniową została zidentyfikowana mutacja miejsca splicingowego w genie kodującym desminę (*DES*). Desmina jest specyficznym dla mięśni białkiem strukturalnym, tworzącym sieć oplatającą linię Z, łączącą

sąsiednie prążki ze sobą, a także z sarkolemmą, błoną jądrową, kanalikami T, mitochondriami i innymi organellami. Sugeruje się że dzięki tworzeniu takiej sieci desmina może bezpośrednio lub pośrednio odpowiadać za przesyłanie sygnałów mechanicznych. Mutacje desminy powodują zazwyczaj miopatie miofibrylarne, kardiomiopatie, bądź połączenie tych fenotypów. W pojedynczych przypadkach mutacje genu *DES* mogą również powodować fenotyp **LGMD** i mogą być dziedziczone zarówno dominująco (**LGMD1D**) jak i recesywnie. (**LGMD2R**) [94]. U opisanych chorych postępujące osłabienie mięśni proksymalnych rozpoczynało się w drugiej lub trzeciej dekadzie życia. Poziom CK w surowicy był podwyższony 2-4 krotnie, zaobserwowano też duszność wysiłkową i problemy z układem bodźcoprzewodzącym serca. W obrazie mikroskopowym mięśni zauważono wyraźne okołojądrowe lub usytuowane przy sarkolemmie wtrącenia, w których wykryto obecność desminy [94–98].

LGMD1E jest powodowane mutacjami genu *DNAJB6* (DnaJ homolog subfamily B member 6). Produkt genu należy do rodziny białek regulujących aktywność szpieronów przez stymulację aktywności ATPazy. Białko *DNAJB6* jest wykrywane między innymi w mięśniach przy linii Z, obok kompleksu CASA (Chaperone-Assisted Selective Autophagy), w skład którego wchodzi białko *BAG3*. Mutacje genu kodującego *BAG3* powodują miopatie miofibrylarne. Prawdopodobny mechanizm choroby **LGMD1E** polega na utracie funkcji antyagregacyjnej białka *DNAJB6* co prowadzi do nadmiernej agregacji białek i dezorganizacji linii Z. Objawy pojawiają się zazwyczaj w trzeciej dekadzie życia i obejmują osłabienie mięśni zaczynające się w pasie biodrowym, a z czasem pojawiające się też przy obręczy barkowej. Postęp choroby jest zazwyczaj powolny, niemożność chodzenia pojawia się po 20-30 latach od początku choroby. W obrazie mikroskopowym widoczne są zaokrąglone autofagiczne wakuole, dezintegracja linii Z oraz inkluzje zawierające białko *DNAJB6* wokół wakuoli i przy sarkolemmie [99–104].

LGMD1F jest powodowane mutacjami transportyny 3 (*TNPO3*). Białko to jest jądrowym receptorem odpowiadającym za import białek bogatych w serynę i argininę (S/R-rich proteins) do jądra komórkowego. Uczestniczy także w imporcie lentiwirusów, w tym wirusa HIV. Początek zachorowania często jest dość wczesny, średnia wieku zachorowania to 16 lat, choć zdarzają się przypadki późniejszych zachorowań. Osłabienie początkowo dotyka mięśni ud, później także obręczy barkowej i mięśni dystalnych. Najczęściej w drugiej bądź trzeciej dekadzie życia pacjenci są już uzależnieni od wózka inwalidzkiego. Osłabienie mięśni oddechowych może wystąpić u osób z bardzo wczesnym wiekiem zachorowania. Biopsje mięśni ujawniają nietypowy i zróżnicowany rozmiar włókien i zwiększoną obecność tkanki łącznej. Poziom CK w połowie przypadków jest normalny a w połowie 2x – 10x podwyższony [105–110].

Dotychczas zdiagnozowano tylko jedną rodzinę z **LGMD1G**. *Locus* odpowiedzialne za zachorowania w tej rodzinie to 4q21 i dopiero niedawno został wykryty gen powodujący chorobę: *HNRPDL*. Początek choroby następuje w 3-5 dekadzie życia i charakteryzuje się skurczami i osłabieniem mięśni nóg. Przykurcze palców u rąk i nóg uniemożliwiają pełne zginanie. Poziom CK jest najczęściej lekko podwyższony (do 10 razy), a w obrazie mikroskopowym widać zróżnicowane wielkości włókien, włóknienie omięsnej (perimysium) i wakuole otoczone sarkoglikanami i dystrofina. *HNRPDL* [111,112].

Gen, którego mutacje powodują **LGMD1H** nie został jeszcze poznany. Zachorowania te wiązane są z *locus* 3p23-25. Dotychczas zdiagnozowano jedną rodzinę z tym podtypem **LGMD**. Objawy pojawiają się od 16 do 50 roku życia i obejmują: osłabienie mięśni proksymalnych rąk i nóg, przerost łydki. Poziom CK jest podwyższony (do 10 razy), zwłaszcza wśród osób

z silniejszymi objawami. Biopsja mięśni ukazuje zróżnicowany rozmiar włókien i włóknienie śródmięśni (endomysium) [113].

LGMD2A jest powodowane mutacjami kalpajny 3 (*CAPN3*) i stanowi 20-40% wszystkich przypadków LGMD. W większości populacji LGMD2A jest najczęstszą postacią LGMD ze względu na wysoką powszechność heterozygot (1:100). Dotychczas wykryto 328 mutacji zmiany sensu (LOVD), z których część jest na tyle powszechna, że występuje w bazie polimorfizmów dbSNP. Gen *CAPN3* składa się z 26 eksonów i koduje proteazę cysteinową specyficzną dla mięśni, podobną do obecnych w innych tkankach kalpajny 1 i 2. W sarkomerach *CAPN3* kolokalizuje z tytyną (konektyną) i filaminą C, które są jej substratami. Prawdopodobnie proteoliza przeprowadzana przez kalpajnę3 prowadzi do adaptacji mięśni szkieletowych drogą modyfikacji ich właściwości mechanicznych. LGMD2A diagnozuje się najczęściej w wieku 8-15 lat, a postęp choroby zazwyczaj jest łagodny. Charakterystyczne objawy to symetryczna atrofia mięśni przywodzących powodująca zeszczuplenie ramion i ud, odstawanie łopatek, przykurcze stawów. Poziom CK jest zazwyczaj podwyższony. Często po 20 latach postępu choroby pacjenci nie są już w stanie chodzić [56,114–118].

LGMD2B jest powodowane mutacjami dysferliny (*DYSF*). Jest to zazwyczaj druga pod względem częstotliwości występowania postać LGMD (około 15-25% przypadków). Dotychczas wykryto 306 mutacji wpływających na sekwencję aminokwasów białka (LOVD). Kodowana przez 55 eksonów dysferlina jest białkiem transmembranowym uczestniczącym w związanej z wapniem naprawie sarkolemy. Zaburzenie tej funkcji jest prawdopodobną przyczyną choroby. W dysferlinopatiach, ale często i w innych odmianach LGMD (kalpainopatie, sarkoglikanopatie, LGMD2I) obserwuje się nagromadzenie dysferliny w cytoplazmie. Typowe cechy LGMD2B to wiek zachorowania około 20 roku życia, powolny postęp choroby, bardzo wysoki poziom CK, stany zapalne mięśni, niezdolność do stawania na palcach związana z osłabieniem mięśni łydek. Mutacje genu *DYSF* związane są z jednak z różnymi obrazami klinicznymi, opisywanymi jako Miopatia Miyoshi, czy miopatia dystalna zaczynająca się od mięśnia piszczelowego przedniego (distal myopathy anterior tibial onset, DMAT). Nierzadko fenotyp jest mieszany, a różne objawy występują u członków rodziny [19,20,114,119,120].

Mutacje w czterech genach kodujących sarkoglikany, gamma, alfa, beta i delta, powodują odpowiednio **LGMD2C**, **LGMD2D**, **LGMD2E** i **LGMD2F**. Najbardziej powszechnym podtypem jest LGMD2D, ale łącznie sarkoglikanopatie stanowią około 10-15% wszystkich LGMD2. W przypadku podejrzenia sarkoglikanopatii mutacji można się spodziewać nie tylko w 29 eksonach kodujących (łącznie dla genów *SGCG*, *SGCA*, *SGCB* i *SGCD*), w których do tej pory wykryto 181 mutacji zmiany sensu (LOVD). Częściej niż w innych genach występują też mutacje wpływające na splicing, oraz zmiany liczby kopii. Sarkoglikany są N-glikozylowanymi białkami błonowymi, które tworzą kompleks dystrofinowo-sarkoglikanowy, łączący cytoskielet z macierzą zewnątrzkomórkową. Mutacje w którymkolwiek z sarkoglikanów zazwyczaj często powodują brak, lub mniejszą ilość kodowanego białka i w konsekwencji mają destabilizujące skutki dla całego kompleksu. Typowa forma ma początek w dzieciństwie, oraz cięższy i szybszy przebieg niż inne postaci LGMD. Objawami są osłabienie i zanik mięśni bioder, ud i ramion, coraz większe problemy z chodzeniem, a wraz z postępem choroby kłopoty z sercem i oddychaniem. Mutacje sarkoglikanów mogą też powodować nieco inne objawy, podobne do dystrofii mięśniowej Duchenne'a [121–124].

Mutacje genu *TCAP* powodują **LGMD2G**, jedną z rzadszych form LGMD. Dotychczas zidentyfikowano ją jedynie u kilku rodzin, najczęściej w populacji brazylijskiej. Gen składa się

tylko z dwóch małych eksonów, w których opisano 16 mutacji zmiany sensu. Kodowana przez *TCAP* teletonina łączy tytynę i inne białka linii Z. Teletonina podczas miofibrylogenezy jest substratem dla domeny tytyny o aktywności kinazy serynowej. Wpływa też na utrzymywanie prawidłowej struktury kanalików T, zwłaszcza przy przeciążeniach mechanicznych. U chorych we wczesnym okresie dojrzewania zaczyna się osłabienie mięśni bioder i dystalnych mięśni nóg. Często obserwowany jest też objaw opadającej stopy, przerost łydki, oraz kardiomiopatia. Poziom CK w surowicy jest podwyższony od 3 do 30 razy. W mięśniach nie wykrywa się teletoniny. Mutacje genu *TCAP* są też związane z wrodzoną dystrofią mięśniową oraz z izolowaną kardiomiopatią [125–130].

Mutacje w genie *TRIM32* są przyczyną **LGMD2H**. Jest to również forma rzadka, opisywana głównie w populacji huterytów w Kanadzie. Gen *TRIM32* zawiera tylko jeden duży ekson kodujący, w którym znaleziono 8 mutacji zmiany sensu. Białko *TRIM32* to ligaza ubikwitynowa, należąca do rodziny co najmniej 70 ludzkich białek zawierający motyw TRIM, zlokalizowana w pobliżu linii Z gdzie wspomaga degradację dysbindyny. Enzym ten reguluje różnicowanie komórek macierzystych mięśni szkieletowych i jest niezbędny dla regeneracji mięśni u dorosłych. Przebieg choroby jest względnie łagodny z osłabieniem mięśni, bólem pleców, szybszym zmęczeniem. Początek **LGMD2H** obserwowano między 8 a 27 rokiem życia, a zdolność chodzenia utrzymuje się przynajmniej do 50 roku życia. CK w surowicy jest zazwyczaj podwyższone (od normalnego do 20 razy powyżej normy), a w obrazie mikroskopowym widać włóknienie śródmięśni, zróżnicowany rozmiar i degenerację włókien. Mutacje genu *TRIM32* mogą jednak również powodować cięższe objawy nazywane miopatią sarkotubularną szybko uniemożliwiającą chodzenie [131–135].

LGMD2I jest powodowane mutacjami genu *FKRP* (Fukutin-related protein) i występuje powszechniej głównie w Europie północnej, ale jest też obserwowana w Azji, a po raz pierwszy opisana została w rodzinie z Tunezji. Białko *FKRP* występuje powszechnie, ale największą ekspresję obserwuje się w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i łożysku. Sugeruje się że *FKRP* uczestniczy w glikozylacji dystroglikanu, a jego mutacje powodują nie tylko fenotyp **LGMD**, ale też wrodzone dystrofie mięśniowe, chorobę mięsień-oko-mózg lub zespół Walkera – Warburga [136–142].

LGMD2J jest rozpoznawane w przypadkach ze sprawczymi mutacjami w genie *TTN* kodującym tytynę. Tytyna jest największym znanym białkiem posiadającym, zależnie od izoformy, od około 27 do ponad 34 tysięcy aminokwasów. Kodowana jest przez gen posiadający 363 eksony. W porównaniu do innych fenotypów powodowanych mutacjami *TTN* w przypadku dystrofii obręczowo-kończynowej początek choroby obserwowany jest już w dzieciństwie a jej przebieg jest cięższy i kończy się utratą ambulacji po około 20 latach. Poziom CK w surowicy jest wyraźnie podwyższony [143].

LGMD2K jest powodowane mutacjami genu *POMT1*. Objawy występują już we wczesnym dzieciństwie, ale są zazwyczaj relatywnie łagodne ze zwiększoną męczliwością mięśni i możliwymi przykurczami. Zażęte są częściej mięśnie proksymalne [144].

LGMD2L jest wynikiem mutacji genu *ANO5* kodującego anoktaminę 5. Początek zachorowania następuje od 2. do 5. dekady życia i cechuje się relatywnie łagodnym przebiegiem. Mutacje genu *ANO5* związane są także z miopatią Miyoshi [145].

LGMD2M jest powodowana mutacjami genu *FKTN* kodującego fukutynę. Osłabienie mięśni obserwowane jest już we wczesnym dzieciństwie i charakteryzuje się głównie zajęciem mięśni

kończyn dolnych. Do częstych objawów należą przerosty mięśni łydek, ud i tricepsów. Choroba postępuje zazwyczaj łagodnie i pacjenci nie muszą korzystać z wózków inwalidzkich [146].

Mutacje genu *POMT2* kodowanego przez 21 eksonów powodują **LGMD2N**. Mutacje *POMT2* zazwyczaj powodują syndrom Walkera-Warburga lub chorobę mięsień-oko-mózg ale były też opisywane w LGMD. W przypadkach tych obserwuje się obniżoną glikozylację α -dystroglikanu i bardzo podwyższony poziom CK. [147].

Również mutacje genu *POMGnT1* zazwyczaj powodują cięższe fenotypy niż **LGMD2O**, takie jak zespół Walkera-Warburga [148].

LGMD2P jest spowodowane mutacjami dystroglikanu (*DAG1*). Dodatkowym objawem w tym podtypie bywa upośledzenie funkcji poznawczych [149].

LGMD2Q jest powodowane specyficznymi mutacjami w genie kodującym plektynę (*PLEC1*). Większość patogennych mutacji tego genu powoduje epidermolizę. Przypadki LGMD dotyczą do tej pory jedynie homozygotycznych delecji dziewięciu nukleotydów zmieniających mięśniową izoformę białka. W przebiegu choroby nie odnotowuje się zmian skórnych charakterystycznych dla innych mutacji genu *PLEC* [150].

Desmina jest specyficznym dla mięśni białkiem filamentu pośredniego. Gen *DES* zawiera 9 eksonów, a jego dominujące mutacje są związane z miopatią miofibrylarną. W pojedynczych przypadkach mutacje genu *DES* mogą również powodować fenotyp LGMD i mogą być dziedziczone zarówno dominująco (**LGMD1D**) jak i recesywnie. (**LGMD2R**) [94].

LGMD2S jest to spowodowane mutacjami w genie kompleksu białka transportowego 11 (*TRAPPC11*). Fenotyp **LGMD2S** obejmuje najczęściej przypadki o wczesnym początku, ale powolnej progresji z wysokim CK, ale były też opisane przypadki z dodatkowymi objawami neurologicznymi: upośledzeniem umysłowym i ataksją [151].

LGMD2T jest spowodowane przez mutacje w genie małym, kodowanym przez 8 eksonów genie *GMPPB*. Mutacje genu *GMPPB* były związane z cięższymi wrodzonymi dystrofiami mięśniowymi, ale opisano trzy przypadki fenotypu LGMD. U wszystkich 3 pacjentów stwierdzono zwiększony poziom CK, a u dwóch dodatkowo mikrocefalię i symptomy neurologiczne [152].

Gen *ISPD* to kolejny z genów których mutacje zazwyczaj powodują zespół Walkera-Warburga, jednakże identyfikuje się je jako przyczynowe także w przypadkach **LGMD2U**. Choroba jest podobna do DMD z wczesną utratą możliwości chodzenia. Mogą występować także osłabienia mięśni układu oddechowego i serca podobnie jak w inne dystroglikanopatiach [153].

Mutacje *GAA* zazwyczaj powodują chorobę spichrzeniową glikogenu typu 2 (*GSD2*) z wczesnym początkiem i niewydolnością oddechową. Łagodniejsze objawy bywają podobne do dystrofii obręczowo-kończynowych i nazywane są **LGMD2V** [154].

LGMD2W jest powodowane przez mutacje genu *LIMS2/PINCH2* kodowanego przez 7 eksonów. Pacjenci wykazują początek LGMD w dzieciństwie z przerostem łydki. Rozwijają się u nich zaburzenia pracy serca. Cechą charakterystyczną jest szeroki, trójkątny język. [155].

Ostatnio dodanymi do klasyfikacji LGMD podtypami są **LGMD2X**, **LGMD2Y**, oraz **LGMD2Z**, a zidentyfikowanymi genami sprawczymi są odpowiednio *BVES* [156], *TORIAIP1* [157] i *POGLUT1* [158].

MFM to grupa chorób o zróżnicowanych cechach klinicznych, podobnych fenotypowo i genetycznie do LGMD [4,159–161]. Mutacje w genach *MYOT* i *DES* mogą powodować zarówno LGMD1 jak i MFM. Cechą charakterystyczną dla miopatii miofibrilarnych jest ektopowa akumulacja białek strukturalnych w mięśniach i dezorganizacja sarkomeru. Inkluzje (nagromadzenia) białek dezorganizuje sieć miofibrili, czasami obserwuje się też obecność wakuoli autofagicznych. Dotychczas zidentyfikowano sześć genów których mutacje mogą powodować MFM: desminę (*DES*), AB-krystalinę (*CRYAB*), myotylinę (*MYOT*), Z band alternatively spliced PDZ motif containing protein (*ZASP*, znany również jako *LDB3*), filaminę C (*FLNC*) i Bcl2-associated athanogene (*BAG3*). Są to geny kodujące białka związane z linią Z mięśni poprzecznie prążkowanych. Przypuszcza się, że zmienione białka nie mogą pełnić swojej funkcji strukturalnej, a ich nagromadzenie może mieć toksyczny wpływ na mięśnie.

12 Piśmiennictwo:

1. Norwood FLM, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain J. Neurol.* 2009;132:3175–86.
2. van der Kooi AJ, Barth PG, Busch HF, de Haan R, Ginjaar HB, van Essen AJ, et al. The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy. A survey in The Netherlands. *Brain J. Neurol.* 1996;119 (Pt 5):1471–80.
3. Urtasun M, Sáenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizberea JA, Cobo AM, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Brain J. Neurol.* 1998;121 (Pt 9):1735–47.
4. Selcen D, Engel AG. Myofibrillar Myopathy. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 Sep 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1499/>
5. Mitsuhashi S, Kang PB. Update on the genetics of limb girdle muscular dystrophy. *Semin. Pediatr. Neurol.* 2012;19:211–8.
6. Nigro V, Savarese M. Next-generation sequencing approaches for the diagnosis of skeletal muscle disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 2016;29:621–7.
7. Flanigan KM, Ceco E, Lamar K-M, Kaminoh Y, Dunn DM, Mendell JR, et al. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2013;73:481–8.
8. Sáenz A, López de Munain A. Dominant LGMD2A: alternative diagnosis or hidden digenism? *Brain J. Neurol.* 2017;140:e7.
9. Qiao C, Wang C-H, Zhao C, Lu P, Awano H, Xiao B, et al. Muscle and heart function restoration in a limb girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I) mouse model by systemic FKRP gene delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2014;22:1890–9.
10. Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN, et al. AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2015;2:256–70.
11. Liu J, Harper SQ. RNAi-based gene therapy for dominant Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Curr. Gene Ther.* 2012;12:307–14.
12. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Rosales-Quintero X, Kota J, Coley BD, Galloway G, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* 2009;66:290–7.
13. Bushby K, Norwood F, Straub V. The limb-girdle muscular dystrophies--diagnostic strategies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1772:238–42.
14. Kousi M, Katsanis N. Genetic modifiers and oligogenic inheritance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;5.
15. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 2011;11:759–69.

16. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
17. Erguner B, Ustek D, Sagioglu MS. Performance comparison of Next Generation sequencing platforms. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 2015;2015:6453–6.
18. Katsanis N. The continuum of causality in human genetic disorders. *Genome Biol*. 2016;17:233.
19. Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum. Mol. Genet*. 1999;8:871–7.
20. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology*. 2000;55:1931–3.
21. Fee DB, So YT, Barraza C, Figueroa KP, Pulst S-M. Phenotypic variability associated with Arg26Gln mutation in caveolin3. *Muscle Nerve*. 2004;30:375–8.
22. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am. J. Hum. Genet*. 2015;97:199–215.
23. Chen R, Shi L, Hakenberg J, Naughton B, Sklar P, Zhang J, et al. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. *Nat. Biotechnol*. 2016;34:531–8.
24. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum. Genet*. 2013;132:1077–130.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
26. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001.
27. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol*. 2011;29:24–6.
28. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164.
29. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet*. 2011;12:683–91.
30. Jiang Y, Oldridge DA, Diskin SJ, Zhang NR. CODEX: a normalization and copy number variation detection method for whole exome sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e39.
31. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, et al. The 1000 Genomes Project: data management and community access. *Nat. Methods*. 2012;9:459–62.

32. Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A, et al. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112:E5189-5198.
33. Schiemann AH, Stowell KM. Comparison of pathogenicity prediction tools on missense variants in RYR1 and CACNA1S associated with malignant hyperthermia. *Br. J. Anaesth.* 2016;117:124–8.
34. Fichna JP, Karolczak J, Potulska-Chromik A, Miszta P, Berdyski M, Sikorska A, et al. Two desmin gene mutations associated with myofibrillar myopathies in Polish families. *PloS One.* 2014;9:e115470.
35. Fichna JP, Potulska-Chromik A, Miszta P, Redowicz MJ, Kaminska AM, Zekanowski C, et al. A novel dominant D109A CRYAB mutation in a family with myofibrillar myopathy affects α B-crystallin structure. *BBA Clin.* 2016;7:1–7.
36. Yu M, Zheng Y, Jin S, Gang Q, Wang Q, Yu P, et al. Mutational spectrum of Chinese LGMD patients by targeted next-generation sequencing. *PloS One.* 2017;12:e0175343.
37. Stehlíková K, Skálová D, Zídková J, Haberlová J, Voháňka S, Mazanec R, et al. Muscular dystrophies and myopathies: the spectrum of mutated genes in the Czech Republic. *Clin. Genet.* 2017;91:463–9.
38. Monies D, Alhindi HN, Almuhaizea MA, Abouelhoda M, Alazami AM, Goljan E, et al. A first-line diagnostic assay for limb-girdle muscular dystrophy and other myopathies. *Hum. Genomics.* 2016;10:32.
39. Kuhn M, Gläser D, Joshi PR, Zierz S, Wenninger S, Schoser B, et al. Utility of a next-generation sequencing-based gene panel investigation in German patients with genetically unclassified limb-girdle muscular dystrophy. *J. Neurol.* 2016;263:743–50.
40. Reddy HM, Cho K-A, Lek M, Estrella E, Valkanas E, Jones MD, et al. The sensitivity of exome sequencing in identifying pathogenic mutations for LGMD in the United States. *J. Hum. Genet.* 2017;62:243–52.
41. Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, et al. Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Outcomes and Lessons Learned. *JAMA Neurol.* 2015;72:1424–32.
42. Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, et al. The Italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle Nerve.* 2017;55:55–68.
43. Dorobek M, Ryniewicz B, Kabzińska D, Fidziańska A, Styczyńska M, Hausmanowa-Petrusewicz I. The Frequency of c.550delA Mutation of the CANP3 Gene in the Polish LGMD2A Population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 2015;19:637–40.
44. Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum. Mutat.* 2000;15:295.
45. Acuna-Hidalgo R, Bo T, Kwint MP, van de Vorst M, Pinelli M, Veltman JA, et al. Post-zygotic Point Mutations Are an Underrecognized Source of De Novo Genomic Variation. *Am. J. Hum. Genet.* 2015;97:67–74.

46. Stark Z, Dashnow H, Lunke S, Tan TY, Yeung A, Sadedin S, et al. A clinically driven variant prioritization framework outperforms purely computational approaches for the diagnostic analysis of singleton WES data. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*. 2017;
47. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2015;17:405–24.
48. Fukuzawa A, Lange S, Holt M, Vihola A, Carmignac V, Ferreiro A, et al. Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J. Cell Sci.* 2008;121:1841–51.
49. Mogessie B, Roth D, Rahil Z, Straube A. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *eLife*. 2015;4:e05697.
50. Chinnakkannu P, Samanna V, Cheng G, Ablonczy Z, Baicu CF, Bethard JR, et al. Site-specific microtubule-associated protein 4 dephosphorylation causes microtubule network densification in pressure overload cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 2010;285:21837–48.
51. Liu W, Wu A, Pellegrini M, Wang X. Integrative analysis of human protein, function and disease networks. *Sci. Rep.* 2015;5:14344.
52. Abath Neto O, Tassy O, Biancalana V, Zanoteli E, Pourquié O, Laporte J. Integrative data mining highlights candidate genes for monogenic myopathies. *PLoS One*. 2014;9:e110888.
53. Pedrotti S, Giudice J, Dagnino-Acosta A, Knoblauch M, Singh RK, Hanna A, et al. The RNA-binding protein Rbfox1 regulates splicing required for skeletal muscle structure and function. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24:2360–74.
54. Schartner V, Romero NB, Donkervoort S, Treves S, Munot P, Pierson TM, et al. Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 2017;133:517–33.
55. Fiorillo C, Astrea G, Savarese M, Cassandrini D, Brisca G, Trucco F, et al. MYH7-related myopathies: clinical, histopathological and imaging findings in a cohort of Italian patients. *Orphanet J. Rare Dis.* 2016;11:91.
56. Mercuri E, Bushby K, Ricci E, Birchall D, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. *Neuromuscul. Disord. NMD*. 2005;15:164–71.
57. Simeoni S, Russo V, Gigli GL, Scalise A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy: “double trouble” overlapping syndrome? *J. Neurol. Sci.* 2015;348:292–3.
58. MD EC, FMedSci PFC FRCP, MD RCG, editors. *Evaluation and Treatment of Myopathies*. Second Edition. Oxford, New York: Oxford University Press; 2014.
59. Pegoraro E, Hoffman EP. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 Aug 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1408/>
60. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 2014;33:1–12.

61. Vissing J, Barresi R, Witting N, Van Ghelue M, Gammelgaard L, Bindoff LA, et al. A heterozygous 21-bp deletion in CAPN3 causes dominantly inherited limb girdle muscular dystrophy. *Brain J. Neurol.* 2016;139:2154–63.
62. Fischer D, Schroers A, Blümcke I, Urbach H, Zerres K, Mortier W, et al. Consequences of a novel caveolin-3 mutation in a large German family. *Ann. Neurol.* 2003;53:233–41.
63. Lemmers RJLF, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GWE, et al. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat. Genet.* 2012;44:1370–4.
64. Lam C-W, Wong K-S, Leung H-W, Law C-Y. Limb girdle myasthenia with digenic RAPSN and a novel disease gene AK9 mutations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 2017;25:192–9.
65. Hennekam RCM, Biesecker LG. Next-generation sequencing demands next-generation phenotyping. *Hum. Mutat.* 2012;33:884–6.
66. Zou Z-Y, Zhou Z-R, Che C-H, Liu C-Y, He R-L, Huang H-P. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2017;88:540–9.
67. Campbell CD, Chong JX, Malig M, Ko A, Dumont BL, Han L, et al. Estimating the human mutation rate using autozygosity in a founder population. *Nat. Genet.* 2012;44:1277–81.
68. McCarthy MI, MacArthur DG. Human disease genomics: from variants to biology. *Genome Biol.* 2017;18:20.
69. Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies - international collaborations for translational research. *Nat. Rev. Neurol.* 2016;12:294–309.
70. Fokkema IFAC, Taschner PEM, Schaafsma GCP, Celli J, Laros JFJ, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* 2011;32:557–63.
71. Gilchrist JM, Pericak-Vance M, Silverman L, Roses AD. Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology.* 1988;38:5–9.
72. Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, et al. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:2141–7.
73. Hauser MA, Conde CB, Kowaljow V, Zeppa G, Taratuto AL, Torian UM, et al. myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71:1428–32.
74. Shalaby S, Mitsuhashi H, Matsuda C, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, et al. Defective myotilin homodimerization caused by a novel mutation in MYOT exon 9 in the first Japanese limb girdle muscular dystrophy 1A patient. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009;68:701–7.
75. Reilich P, Krause S, Schramm N, Klutzny U, Bulst S, Zehetmayer B, et al. A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A). *J. Neurol.* 2011;258:1437–44.
76. Salmikangas P, van der Ven PFM, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, et al. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12:189–203.

77. van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;60:891–5.
78. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1999;21:285–8.
79. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;341:1715–24.
80. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat J-M, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70:726–36.
81. Mory PB, Crispim F, Freire MBS, Salles JEN, Valério CM, Godoy-Matos AF, et al. Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur. J. Endocrinol.* 2012;167:423–31.
82. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003;423:293–8.
83. Todorova A, Halliger-Keller B, Walter MC, Dabauvalle M-C, Lochmüller H, Müller CR. A synonymous codon change in the LMNA gene alters mRNA splicing and causes limb girdle muscular dystrophy type 1B. *J. Med. Genet.* 2003;40:e115.
84. Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:1453–9.
85. Worman HJ, Fong LG, Muchir A, Young SG. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1825–36.
86. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, et al. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1998;18:365–8.
87. Minetti C, Bado M, Broda P, Sotgia F, Bruno C, Galbiati F, et al. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am. J. Pathol.* 2002;160:265–70.
88. Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP. Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology.* 2004;62:538–43.
89. Whiteley G, Collins RF, Kitmitto A. Characterization of the molecular architecture of human caveolin-3 and interaction with the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 2012;287:40302–16.
90. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* 1997;272:30429–38.

91. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, et al. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J. Biol. Chem.* 2000;275:38048–58.
92. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10:1761–6.
93. Huang H, Bae C, Sachs F, Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One.* 2013;8:e72894.
94. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J. Med. Genet.* 2013;50:437–43.
95. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;61:909–17.
96. Greenberg SA, Salajegheh M, Judge DP, Feldman MW, Kuncl RW, Waldon Z, et al. Etiology of limb girdle muscular dystrophy 1D/1E determined by laser capture microdissection proteomics. *Ann. Neurol.* 2012;71:141–5.
97. Bär H, Goudeau B, Wälde S, Casteras-Simon M, Mücke N, Shatunov A, et al. Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Hum. Mutat.* 2007;28:374–86.
98. Kouloumenta A, Mavroidis M, Capetanaki Y. Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J. Biol. Chem.* 2007;282:35211–21.
99. Speer MC, Vance JM, Grubber JM, Lennon Graham F, Stajich JM, Viles KD, et al. Identification of a new autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy locus on chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:556–62.
100. Sarparanta J, Jonson PH, Golzio C, Sandell S, Luque H, Screen M, et al. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 2012;44:450–5, S1-2.
101. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr. Biol. CB.* 2010;20:143–8.
102. Harms MB, Sommerville RB, Allred P, Bell S, Ma D, Cooper P, et al. Exome sequencing reveals DNAJB6 mutations in dominantly-inherited myopathy. *Ann. Neurol.* 2012;71:407–16.
103. Chuang J-Z, Zhou H, Zhu M, Li S-H, Li X-J, Sung C-H. Characterization of a brain-enriched chaperone, MRJ, that inhibits Huntingtin aggregation and toxicity independently. *J. Biol. Chem.* 2002;277:19831–8.
104. Sandell SM, Mahjneh I, Palmio J, Tasca G, Ricci E, Udd BA. “Pathognomonic” muscle imaging findings in DNAJB6 mutated LGMD1D. *Eur. J. Neurol.* 2013;20:1553–9.
105. Logue EC, Taylor KT, Goff PH, Landau NR. The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. *J. Virol.* 2011;85:12950–61.

106. Gamez J, Navarro C, Andreu AL, Fernandez JM, Palenzuela L, Tejeira S, et al. Autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy: a large kindred with evidence for anticipation. *Neurology*. 2001;56:450–4.
107. Palenzuela L, Andreu AL, Gàmèz J, Vilà MR, Kunimatsu T, Meseguer A, et al. A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2. *Neurology*. 2003;61:404–6.
108. Torella A, Fanin M, Mutarelli M, Peterle E, Del Vecchio Blanco F, Rispoli R, et al. Next-generation sequencing identifies transportin 3 as the causative gene for LGMD1F. *PLoS One*. 2013;8:e63536.
109. Melià MJ, Kubota A, Ortolano S, Vílchez JJ, Gámèz J, Tanji K, et al. Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain J. Neurol.* 2013;136:1508–17.
110. Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:10154–9.
111. Starling A, Kok F, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Zatz M. A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*. 2004;12:1033–40.
112. Vieira NM, Naslavsky MS, Licinio L, Kok F, Schlesinger D, Vainzof M, et al. A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). *Hum. Mol. Genet.* 2014;23:4103–10.
113. Bisceglia L, Zoccolella S, Torraco A, Piemontese MR, Dell’Aglia R, Amati A, et al. A new locus on 3p23-p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*. 2010;18:636–41.
114. Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, Seto JT, Chiotis M, Tay V, et al. Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul. Disord. NMD*. 2008;18:34–44.
115. Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J. Med. Genet.* 2005;42:686–93.
116. van der Kooi AJ, Frankhuizen WS, Barth PG, Howeler CJ, Padberg GW, Spaans F, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the Netherlands: gene defect identified in half the families. *Neurology*. 2007;68:2125–8.
117. Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:9127–35.
118. Nadaj-Pakleza AA, Dorobek M, Nestorowicz K, Ryniewicz B, Szmidt-Sałkowska E, Kamińska AM. Muscle pathology in 31 patients with calpain 3 gene mutations. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2013;47:214–22.
119. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* 1998;20:37–42.

120. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann. Neurol.* 2000;48:902–12.
121. Nigro V. Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol.* 2003;22:35–42.
122. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *J. Neurol. Sci.* 1999;164:44–9.
123. Wildförster V, Dekomien G. Detecting copy number variations in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies using a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay. *Mol. Cell. Probes.* 2009;23:55–9.
124. Trabelsi M, Kaviani N, Daoud F, Commere V, Deburgrave N, Beugnet C, et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 2008;16:793–803.
125. Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Sertié AL, Zatz M, Passos-Bueno MR. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;61:151–9.
126. Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet.* 2000;24:163–6.
127. Olivé M, Shatunov A, Gonzalez L, Carmona O, Moreno D, Quereda LG, et al. Transcription-terminating mutation in telethonin causing autosomal recessive muscular dystrophy type 2G in a European patient. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2008;18:929–33.
128. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, et al. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature.* 1998;395:863–9.
129. Ibrahim M, Siedlecka U, Buyandelger B, Harada M, Rao C, Moshkov A, et al. A critical role for Telethonin in regulating t-tubule structure and function in the mammalian heart. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22:372–83.
130. Paim JF, Cotta A, Vargas AP, Navarro MM, Valicek J, Carvalho E, et al. Muscle phenotypic variability in limb girdle muscular dystrophy 2 G. *J. Mol. Neurosci. MN.* 2013;50:339–44.
131. Shieh PB, Kudryashova E, Spencer MJ. Limb-girdle muscular dystrophy 2H and the role of TRIM32. *Handb. Clin. Neurol.* 2011;101:125–33.
132. Locke M, Tinsley CL, Benson MA, Blake DJ. TRIM32 is an E3 ubiquitin ligase for dysbindin. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18:2344–58.
133. Frosk P, Del Bigio MR, Wrogemann K, Greenberg CR. Hutterite brothers both affected with two forms of limb girdle muscular dystrophy: LGMD2H and LGMD2I. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 2005;13:978–82.
134. Borg K, Stucka R, Locke M, Melin E, Ahlberg G, Klutzny U, et al. Intragenic deletion of TRIM32 in compound heterozygotes with sarcolemmal myopathy/LGMD2H. *Hum. Mutat.* 2009;30:E831–844.
135. Schoser BGH, Frosk P, Engel AG, Klutzny U, Lochmüller H, Wrogemann K. Commonality of TRIM32 mutation in causing sarcolemmal myopathy and LGMD2H. *Ann. Neurol.* 2005;57:591–5.

136. Driss A, Amouri R, Ben Hamida C, Souilem S, Gouider-Khouja N, Ben Hamida M, et al. A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2000;10:240–6.
137. Driss A, Noguchi S, Amouri R, Kefi M, Sasaki T, Sugie K, et al. Fukutin-related protein gene mutated in the original kindred limb-girdle MD 2I. *Neurology.* 2003;60:1341–4.
138. Sveen M-L, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann. Neurol.* 2006;59:808–15.
139. Liang W-C, Hayashi YK, Ogawa M, Wang C-H, Huang W-T, Nishino I, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2I is not rare in Taiwan. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2013;23:675–81.
140. Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69:1198–209.
141. Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LVB, Birchall D, et al. The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology.* 2003;60:1246–51.
142. Krag TO, Hauerslev S, Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. Level of muscle regeneration in limb-girdle muscular dystrophy type 2I relates to genotype and clinical severity. *Skelet. Muscle.* 2011;1:31.
143. Udd B, Vihola A, Sarparanta J, Richard I, Hackman P. Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology.* 2005;64:636–42.
144. Mercuri E, Messina S, Bruno C, Mora M, Pegoraro E, Comi GP, et al. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology.* 2009;72:1802–9.
145. Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, et al. Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;86:213–21.
146. Godfrey C, Escolar D, Brockington M, Clement EM, Mein R, Jimenez-Mallebrera C, et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2006;60:603–10.
147. Biancheri R, Falace A, Tessa A, Pedemonte M, Scapolan S, Cassandrini D, et al. POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;363:1033–7.
148. Raducu M, Baets J, Fano O, Van Coster R, Cruces J. Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 2O. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* 2012;20:945–52.
149. Hara Y, Balci-Hayta B, Yoshida-Moriguchi T, Kanagawa M, Beltrán-Valero de Bernabé D, Gündeşli H, et al. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:939–46.
150. Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, Balci-Hayta B, Cirak S, Akarsu NA, et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87:834–41.

151. Bögershausen N, Shahrzad N, Chong JX, von Kleist-Retzow J-C, Stanga D, Li Y, et al. Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93:181–90.
152. Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, Torelli S, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93:29–41.
153. Tasca G, Moro F, Aiello C, Cassandrini D, Fiorillo C, Bertini E, et al. Limb-girdle muscular dystrophy with α -dystroglycan deficiency and mutations in the ISPD gene. *Neurology.* 2013;80:963–5.
154. Preisler N, Lukacs Z, Vinge L, Madsen KL, Husu E, Hansen RS, et al. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Mol. Genet. Metab.* 2013;110:287–9.
155. Chardon JW, Smith AC, Woulfe J, Pena E, Rakhra K, Dennie C, et al. LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clin. Genet.* 2015;88:558–64.
156. Schindler RFR, Scotton C, Zhang J, Passarelli C, Ortiz-Bonnin B, Simrick S, et al. POPDC1(S201F) causes muscular dystrophy and arrhythmia by affecting protein trafficking. *J. Clin. Invest.* 2016;126:239–53.
157. Kayman-Kurekci G, Talim B, Korkusuz P, Sayar N, Sarioglu T, Oncel I, et al. Mutation in TOR1AIP1 encoding LAP1B in a form of muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopathies. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2014;24:624–33.
158. Servián-Morilla E, Takeuchi H, Lee TV, Clarimon J, Mavillard F, Area-Gómez E, et al. A POGLUT1 mutation causes a muscular dystrophy with reduced Notch signaling and satellite cell loss. *EMBO Mol. Med.* 2016;8:1289–309.
159. Olivé M, Odgerel Z, Martínez A, Poza JJ, Bragado FG, Zabalza RJ, et al. Clinical and myopathological evaluation of early- and late-onset subtypes of myofibrillar myopathy. *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2011;21:533–42.
160. Schröder R, Schoser B. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2009;19:483–92.
161. Knöll R, Buyandelger B, Lab M. The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:569628.