



UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marijana D. Mišković

VARIJABILNOST GENOTIPA  
I FENOTIPISKE EKSPRESIJE  
SPINALNE MIŠIĆNE ATROFIJE  
KOD PACIJENATA IZ SRBIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marijana D. Mišković

VARIABILITY OF GENOTYPE AND  
PHENOTYPIC EXPRESSION OF SPINAL  
MUSCULAR ATROPHY IN PATIENTS  
FROM SERBIA

doctoral dissertation

Belgrade, 2014

MENTOR: Prof. dr Marija Guć-Šćekić, profesor Biološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE: Prof. dr Jelena Milašin, profesor Stomatološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivana Novaković, profesor Medicinskog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Dušan Keckarević, docent Biološkog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: 2014.

DATUM PROMOCIJE:

Za izradu svoje doktorke disertacije veliku zahvalnost dugujem, pre svega, mentoru prof. dr Mariji Guć-Šćekić na uloženoj istrajnosti, podršci i znanju.

Zahvaljujem se prof. dr Jeleni Milašin i prof. dr Ivani Novaković na korisnim savetima i rečima podrške tokom pisanja ovog rada; doc. dr Dušanu Keckareviću koji mi je, kao jedan od prvih koji se bavio ovom problematikom na našim prostorima, pružio važne smernice tokom izrade i pisanja disertacije; dr Milici Keckarević-Marković koja mi je pomogla da svoj rad upotpunim; prof. dr Oliveru Stojkoviću koji mi je omogućio analizu značajnog broja pacijenata bez čega izrada ovog rada ne bi bila moguća; prof. dr Marini Stamenković-Radak na strpljenju, iznalaženju rešenja i uveravanju da je izvodljivo dovesti sve do kraja; dr med. Slavici Ostojić u pruženoj pomoći oko medicinskih aspekata ove problematike.

Posebno se zahvaljujem dr Danijeli Radivojević na izuzetnoj saradnji, kako tokom višegodišnjeg zajedničkog rada, tako i prilikom pisanja same teze i dr Sanji Ćirković sa kojom sam danju i noću rešavala mnogobrojne probleme.

Sve ovo naravno ne bi bilo moguće bez svesrdne pomoći svih ostalih mojih kolega iz laboratorije i u „lepim” i u „ružnim” danima, kao i moje porodice i prijatelja koji su bili uz mene na ovom dugom putu koji se zove doktoriranje.

Na kraju, ali ne manje važno, želim da svoju zahvalnost uputim i dr Zagi Bradić koja me je pri svakom padu uspešno podigla.

*Rad posvećujem svojim roditeljima*

*...i Aleksandru sa kojim sam stvorila i ono najvažnije....*

**Naslov:** VARIJABILNOST GENOTIPA I FENOTIPISKE EKSPRESIJE SPINALNE MIŠIĆNE ATROFIJE KOD PACIJENATA IZ SRBIJE

**Rezime:**

Spinalna mišićna atrofija (SMA) je drugo najčešće autozomno recesivno oboljenje kod ljudi. Prema uzrastu kada se pojavljuju prvi simptomi i težini kliničke slike SMA je klasifikovana u tri tipa. Mutacije u telomernoj kopiji gena *SMN1* (eng. *survival of motor neuron*), koji se nalazi u 5q13 regionu, dovode do nastanka bolesti, dok ostali geni u ovom regionu predstavljaju potencijalne modifikatore SMA fenotipa.

Detekcija homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMN1*, primenom PCR amplifikacije i polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (PCR/RFLP, eng. *Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*) urađena je na uzorcima 107 SMA pacijenata iz Srbije i 100 kontrolnih uzoraka DNK poreklom od zdravih osoba. Kod pacijenata bez homozigotne delecije kod kojih je klinička reevaluacija potvrdila dijagnozu SMA je primenom multipleks ligaciono-zavisne amplifikacije proba (MLPA, eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) određivan broj kopija prisutnog gena *SMN1* u cilju detekcije složenih heterozigotnih nosilaca delecije na jednom i tačkaste mutacije na drugom hromozomu. Kod potvrđenih heterozigota sekvenciran je egzon 6 gena *SMN* u cilju detekcije intragenskih mutacija. Za ispitivanje varijabilnosti genotipa 5q13 regiona i njegove povezanosti sa fenotipskom ekspresijom bolesti prvo je na istom uzorku analizirana homozigotna delecija gena *NAIP* (eng. *neuronal apoptosis inhibitory protein*). Nakon toga, primenom MLPA metode je kod 30 pacijenata sa prethodno dijagnostikovanom homozigotnom delecijom gena *SMN1* određivan broj kopija gena iz 5q13 regiona: *NAIP*, *SMN2* (centromerna kopija gena *SMN*), *GTF2H2* (eng. *general transcription factor IIIH subunit 2*) i gen koji kodira protein nepoznate funkcije - *H4F5*. Studija je obuhvatila i ispitivanje 39 zdravih osoba sa porodičnom SMA anamnezom kod kojih je analizom broja kopija gena *SMN1* određivan status heterozigotnih nosilaca delecije ovog gena. Kod 66 fetusa iz 44 porodice sa visokim rizikom za dobijanje obolelog potomstva sprovedena je prenatalna dijagnostika za direktnu detekciju homozigotne *SMN1* delecije.

Homozigotna delecija gena *SMN1* je uočena kod 81% (87/107) ispitivanih SMA pacijenata: delecija egzona 7 i 8 kod 76,6% (82/107) i delecija samo egzona 7 kod 4,7%

(5/107). Učestalost homozigotne delecije bila je najveća u grupi pacijenata sa SMA tip I - 93,1% (54/58), u odnosu na SMA tip II - 71,4% (25/35) i SMA tip III - 57,1% (8/14). Kod 23,1% (3/13) pacijenta bez homozigotne delecije gena *SMN1* kod kojih je klinička reevaluacija potvrdila dijagnozu SMA detektovana je jedna *SMN1* kopija i potvrđena je heterozigotnost. Kod dva ovakva pacijenta, klasifikovana kao SMA tip II, dokazano je prisustvo mutacije koja dovodi do aminokiselinske zamene (eng. *missense mutation*) c.821C>T. Homozigotna delecija gena *NAIP* je detektovana kod 21,5% (23/107) SMA pacijenata i 1% (1/100) kontrola. Uočena je statistički značajna razlika u učestalosti ove delecije i tipa SMA: najučestalija je bila kod SMA tip I pacijenata - 36,2% (21/58) dok je učestalost u SMA tip II iznosila - 2,9% (1/35), a u SMA tip III - 7,1% (1/14). Komparativna analiza homozigotne delecije gena *SMN1* i *NAIP* je pokazala da su veće homozigotne delecije učestalije u grupi SMA tip I pacijenata - 36,2% (21/58), dok su manje delecije - 42,9% (6/14) i 7,1% (1/14) ili njihovo odsustvo - 42,9% (6/14) najučestaliji u grupi SMA tip III. Analizom 5q13 regiona utvrđeno je da broj individualnih kopija gena *NAIP* i *SMN2* statistički značajno korelira sa fenotipom SMA pacijenata – kako se smanjuje broj kopija gena tako tako klinička slika postaje sve teža. Pored toga, homozigotne i heterozigotne delecije detektovane kroz prisustvo 0 i 1 kopije gena *NAIP* su prisutne kod 80% svih ispitivanih pacijenata. Komparativna analiza ova dva gena je pokazala da smanjenje broja kopija gena *NAIP* prati smanjenje broja kopija gena *SMN2* i rezultira u težem obliku bolesti. Nije pronađena statistički značajna korelacija između tipa SMA i broja kopija gena *GTF2H2* i *H4F5* u ispitivanoj grupi. Kod 61,5% (24/39) analiziranih zdravih osobe sa porodičnom anamnezom SMA je kroz detekciju jedne kopije gena *SMN1* potvrđen status heterozigotnih nosilaca. Prenatalnom dijagnostikom je prisustvo homozigotne delecije gena *SMN1* detektovano kod 19,7% (13/66) ispitivanih fetalnih uzoraka.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je ovakav pristup u analizi gena *SMN1* neophodan u cilju pouzdane prenatalne i postnatalne dijagnostike i izračunavanja preciznog rizika za dobijanje obolelog potomstva. Analizom ostalih gena iz 5q13 regiona uočen je visok stepen njegove varijabilnosti i nestabilnosti što ukazuje na njegovu ulogu u fenotipu SMA, kao i na složenost mehanizama koji se nalaze u osnovi ove bolesti. Rezultati ovog rada su pokazali da prilikom predviđanja SMA fenotipa kod analiziranog pacijenta treba imati u vidu sledeće: broj kopija gena *SMN2*, veličinu homozigotne ili

heterozigotne delecije koja pored *SMN1* uključuje i susedne gene kao i tip intragenske *SMN1* mutacije ukoliko je prisutna.

**Ključne reči:** SMA, *SMN1*, *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2*, *H4F5*, homozigotna delecija, broj kopija, status heterozigotnog nosica

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Medicinska genetika

**UDK broj:** 616.8-003.99:[575.224.2:575.21/.22](043.3)



**Title:** VARIABILITY OF GENOTYPE AND PHENOTYPIC EXPRESSION OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY IN PATIENTS FROM SERBIA

**Abstract:**

Spinal muscular atrophy (SMA) is the second most frequent autosomal recessive disease in humans. According to the age of onset and severity of clinical manifestations, SMA is classified into three types. Mutations in the telomeric copy of the survival of motor neuron gene (*SMN1*) cause the disease while other genes in 5q13 region has been considered as modifying factors of the SMA severity.

Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR/RFLP) method was used for direct detection of homozygous deletions of *SMN1* exons 7 and 8 in 107 SMA patients and 100 healthy controls from Serbia. Patients without homozygous *SMN1* deletion in which clinical re-evaluation confirmed SMA diagnosis were further analysed using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for determination of *SMN1* copy number to identify compound heterozygotes of deletion and point mutation. Sequencing of *SMN* exon 6 for detection of subtle mutations was performed in patients with confirmed heterozygosity. For examination of genotype variability in 5q13 region and its correlation with phenotype homozygous deletion of neuronal apoptosis inhibitory protein (*NAIP*) gene was first analysed using PCR in the same sample of patients and controls. After that, 30 patients with homozygous *SMN1* deletion were further examined using MLPA to determine copy number of genes in 5q13 region: *NAIP*, centromeric copy of *SMN* gene (*SMN2*), general transcription factor IIIH subunit 2 (*GTF2H2*) and putative RNA-binding protein (*HAF5*). The study also included the analysis of *SMN1* copy number for carrier status determination in 39 healthy individuals with SMA history. Prenatal diagnosis for direct detection of homozygous *SMN1* gene deletion was performed on 66 fetal samples from 44 families at high SMA risk.

Homozygous *SMN1* gene deletion was detected in 81.3% (87/107) of SMA patients: deletion of exons 7 and 8 in 76.6% (82/107), deletion of exon 7 in 4.7% (5/107). The highest deletion frequency was among SMA type I patients – 93.1% (54/58) compared to SMA type II – 71.4% (25/35) and SMA type III – 57.1% (8/14). One *SMN1* gene copy was detected in 23.1% (3/13) patients without homozygous deletion of this gene and with clinically reassessed confirmation of SMA diagnosis and heterozygosity was

confirmed. Among them two patients, classified as SMA type II, had missense mutation c.821C>T. Homozygous deletion of *NAIP* gene was present in 21.5% (23/107) of SMA patients and 1% (1/100) of controls. Statistical analyses showed significant difference between frequency of this deletion and SMA type - deletion was the most frequent among SMA type I patients compared to SMA type II and SMA type III: 36.2% (21/58) vs. 2.9% (1/35) and 7.1% (1/14). Comparative analyses of homozygous deletions of *SMN1* and *NAIP* genes showed that extended gene deletions were more frequent among SMA type I patients – 36.2% (21/58), while shorter deletions – 42.9% (6/14) and 7.1% (1/14) or absence of deletion – 42.9% (6/14) were the most frequent among SMA type III patients. The analysis of 5q13 region revealed negative correlation between copy number of *SMN2* and *NAIP* genes separately and SMA phenotype and this negative correlation was statistically significant. Beside, homozygous and heterozygous deletions of *NAIP* gene, detected as 0 and 1 gene copy, were present in 80% of all analysed patients. Comparative analysis of these two genes showed that lower copy number of *NAIP* gene reflects lower copy number of *SMN2* gene and is related to severe phenotype. No statistically significant correlation between the type of SMA and copy number of *GTF2H2* and *H4F5* genes, among analysed patients was found.

Carrier status with one *SMN1* gene copy was confirmed in 61.5% (24/39) of analysed healthy individuals with SMA history. Among analysed fetuses, 19.7% (13/66) showed homozygous deletion in *SMN1* gene.

The results from this study revealed that the strategy used in *SMN1* gene analyses, is essential for reliable SMA prenatal and postnatal diagnosis as well for accurate risk assessment. Copy number analysis of genes in 5q13 region showed the presence of a high degree of variability and therefore instability of this region indicating its role in SMA phenotype and revealed complex mechanisms underlying the disease. Consequently, genotype-phenotype analysis of SMA should take into account the following: *SMN2* copy number, extent of homozygous or heterozygous deletion which may include other genes from 5q13 region in addition to *SMN1* and if present, *SMN1* subtle mutations.

**Keywords:** SMA, *SMN1*, *NAIP*, *SMN2*, *GTF2H2*, *H4F5*, homozygous deletion, copy number, carrier status

**Scientific field:** Biology / Medical genetics

**UDC number:** 616.8-003.99:[575.224.2:575.21/.22](043.3)

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Spinalna mišićna atrofija .....	1
1.1.1	Klinička slika .....	1
1.1.2	Klinička klasifikacija SMA .....	2
1.1.3	Učestalost SMA .....	5
1.2	Molekularna osnova bolesti .....	5
1.3	Gen <i>SMN</i> i njegova ekspresija .....	7
1.3.1	Razlika između gena <i>SMN1</i> i <i>SMN2</i> .....	7
1.3.2	Egzon 7 i obrada primarnog transkripta .....	9
1.4	Protein SMN .....	12
1.4.1	Struktura i funkcionalni domeni proteina SMN .....	12
1.4.2	Funkcija proteina SMN .....	13
1.5	Mutacije i polimorfizmi gena <i>SMN1</i> .....	16
1.6	Mehanizam nastanka bolesti .....	17
1.7	Genotip-fenotip korelacija .....	20
1.7.1	Geni mapirani u 5q13 regionu i njihov uticaj na SMA fenotip .....	20
1.7.1.1	Uticaj gena <i>SMN2</i> na SMA fenotip .....	20
1.7.1.2	Uticaj gena <i>NAIP</i> , <i>BTF2p44</i> i <i>H4F5</i> na SMA fenotip .....	21
1.7.2	Potencijalni faktori modifikacije SMA fenotipa van 5q13 regiona .....	24
1.8	Dijagnostika SMA .....	25
1.8.1	Klinička dijagnostika .....	25
1.8.1.1	Serumski enzimi .....	25
1.8.1.2	Elektromiografija (EMG) .....	25
1.8.1.3	Merenje brzine provodljivosti neurona (NCV) .....	26
1.8.1.4	Mišićna biopsija .....	26
1.8.2	Molekularna dijagnostika .....	26
1.8.2.1	Detekcija homozigotne delecije gena <i>SMN</i> .....	27

1.8.2.2	Detekcija homozigotne delecije gena <i>NAIP</i> .....	30
1.8.2.3	Određivanje broja kopija gena u 5q13 regionu.....	30
1.8.2.4	Detekcija tačkastih mutacija.....	32
1.9	SMA koje nisu vezane za 5q13 region.....	34
2	CILJ RADA.....	35
3	MATERIJAL I METODE.....	37
3.1	Pacijenti.....	37
3.2	Metode.....	38
3.2.1	Izolacija DNK.....	38
3.2.1.1	Izolacija DNK iz limfocita periferne/fetalne krvi.....	38
3.2.1.2	Izolacija DNK iz horionskih resica/kulture amnijskih ćelija.....	39
3.2.2	PCR / RFLP metoda (detekcija homozigotnih delecija 7. i 8. egzona gena <i>SMN1</i> ) — postnatalna i prenatalna dijagnostika.....	40
3.2.2.1	PCR amplifikacija egzona 7 i 8 gena <i>SMN</i> .....	40
3.2.2.2	Priprema agaroznog gela i elektroforeza.....	41
3.2.2.3	Digestija PCR produkata restrikcijom enzimima.....	41
3.2.2.4	Analiza produkata enzimske digestije.....	42
3.2.3	PCR umnožavanje 5. i 13. egzona gena <i>NAIP</i> (detekcija homozigotnih delecije gena <i>NAIP</i> ).....	43
3.2.4	MLPA analiza (određivanje broja kopija gena <i>SMN1</i> , <i>SMN2</i> , <i>NAIP (BIRC1)</i> , <i>GTF2H2 (BTHP44)</i> i <i>H4F5 (SERF1B)</i> ).....	44
3.2.4.1	MLPA reakcija.....	46
3.2.4.2	Razdvajanje produkata kapilarnom elektroforezom.....	47
3.2.4.3	Obrada podataka dobijenih MLPA reakcijom.....	48
3.2.5	Analiza tačkastih mutacija u egzonu 6 gena <i>SMN</i> .....	50
3.2.5.1	PCR umnožavanje egzona 6 gena <i>SMN</i> .....	50
3.2.5.2	Sekvenciranje egzona 6 gena <i>SMN</i> .....	51
3.2.5.3	Prečišćavanje reakcije sekvenciranja i analiza na automatskom DNK sekvencatoru ...	51
3.2.6	Bayesova analiza za procene rizika.....	52
3.2.7	Statističke metode.....	52
4	REZULTATI.....	53
4.1	Analiza gena <i>SMN1</i> kod pacijenata obolelih od SMA.....	53
4.1.1	Detekcija homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena <i>SMN1</i> (PCR/RFLP metoda).....	53
4.1.2	Distribucija homozigotne delecije gena <i>SMN1</i> u grupi SMA pacijenata iz Srbije.....	54

4.1.3	Analiza broja kopija gena <i>SMN1</i> u grupi pacijenata bez homozigotne delecije ovog gena (MLPA metoda).....	56
4.1.4	Detekcija tačkastih mutacija u egzonu 6 gena <i>SMN</i> .....	57
4.2	Analiza homozigotne delecije gena <i>NAIP</i> i njena korelacija sa fenotipom.....	58
4.2.1	Detekcija homozigotne delecije egzona 5 gena <i>NAIP</i> (PCR metoda).....	58
4.2.2	Distribucija homozigotne delecije gena <i>NAIP</i> u grupi SMA pacijenata iz Srbije .....	58
4.2.3	Komparativna analiza homozigotne delecije gena <i>SMN1</i> i <i>NAIP</i> i korelacija sa fenotipom pacijenata.....	59
4.3	Analiza broja kopija gena iz 5q13 SMA regiona i korelacija sa fenotipom pacijenata (MLPA metoda) .....	62
4.3.1	Analiza broja kopija gena <i>NAIP</i> i njihova distribucije u odnosu na tip SMA .....	66
4.3.2	Analiza broja kopija gena <i>SMN2</i> i njihova distribucija u odnosu na tip SMA .....	67
4.3.3	Komparativna analiza broja kopija gena <i>SMN1</i> , <i>SMN2</i> i <i>NAIP</i> .....	69
4.3.4	Analiza broja kopija gena <i>GTF2H2</i> i njihova distribucija u odnosu na tip SMA.....	70
4.3.5	Komparativna analiza gena <i>GTF2H2</i> , <i>NAIP</i> i <i>SMN2</i> .....	71
4.3.6	Analiza broja kopija gena <i>H4F5</i> i njihova distribucija u odnosu na tip SMA.....	72
4.4	Određivanje statusa heterozigotnih nosilaca <i>SMN1</i> delecije kod zdravih članova porodice obolelog i davanje genetičkog saveta .....	74
4.4.1	Roditelji obolelog deteta koje nije dostupno za dalje analize (bez molekularno genetičke potvrde bolesti).....	74
4.4.2	Partner iz opšte populacije planira potomstvo sa osobom koja ima rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA.....	75
4.4.3	Bliski rođaci obolelog deteta sa homozigotnom delecijom gena <i>SMN1</i> .....	77
4.5	Prenatalna dijagnostika.....	78
5	DISKUSIJA.....	80
5.1	Analiza gena <i>SMN1</i> kod pacijenata obolelih od SMA .....	80
5.1.1	Detekcija homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena <i>SMN1</i> (PCR/RFLP metoda) .....	80
5.1.2	Distribucija homozigotne delecije gena <i>SMN1</i> u grupi SMA pacijenata iz Srbije .....	81
5.1.3	Analiza broja kopija gena <i>SMN1</i> u grupi pacijenata bez homozigotne delecije ovog gena (MLPA metoda).....	83
5.1.4	Detekcija tačkastih mutacija u egzonu 6 gena <i>SMN</i> .....	84
5.2	Analiza homozigotne delecije gena <i>NAIP</i> i njena korelacija sa fenotipom.....	88
5.2.1	Detekcija homozigotne delecije egzona 5 gena <i>NAIP</i> (PCR metoda).....	88
5.2.2	Distribucija homozigotne delecije gena <i>NAIP</i> u grupi SMA pacijenata iz Srbije .....	89

5.2.3	Komparativna analiza homozigotne delecije gena <i>SMN1</i> i <i>NAIP</i> i korelacija sa fenotipom pacijenata.....	90
5.3	Analiza broja kopija gena iz 5q13 SMA regiona i korelacija sa fenotipom pacijenata (MLPA metoda) .....	91
5.3.1	Analiza broja kopija gena <i>NAIP</i> i njihova distribucije u odnosu na tip SMA .....	92
5.3.2	Analiza broja kopija gena <i>SMN2</i> i i njihova distribucija u odnosu na tip SMA.....	95
5.3.3	Komparativna analiza broja kopija gena <i>SMN1</i> , <i>SMN2</i> i <i>NAIP</i> .....	99
5.3.4	Analiza broja kopija gena <i>GTF2H2</i> i njihova distribucija u odnosu na tip SMA.....	105
5.3.5	Komparativna analiza gena <i>GTF2H2</i> , <i>NAIP</i> i <i>SMN2</i> .....	106
5.3.6	Analiza broja kopija gena <i>H4F5</i> i njihova distribucija u odnosu na tip SMA.....	108
5.4	Određivanje statusa heterozigotnih nosilaca <i>SMN1</i> delecije kod zdravih članova porodice obolelog i davanje genetičkog saveta .....	110
5.4.1	Roditelji obolelog deteta koje nije dostupno za dalje analize (bez molekularno genetičke potvrde bolesti) .....	111
5.4.2	Partner iz opšte populacije planira potomstvo sa osobom koja ima rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA .....	114
5.4.3	Bliski rođaci obolelog deteta sa homozigotnom delecijom gena <i>SMN1</i> .....	115
5.5	Prenatalna dijagnostika.....	116
6	ZAKLJUČCI.....	118
7	LITERATURA .....	121

# 1 UVOD

## 1.1 Spinalna mišićna atrofija

Spinalnu mišićnu atrofiju (SMA) je prvobitno opisao Guido Werdnig 1890.godine, dok 1892. godine, profesor Johann Hoffmann sa Univerziteta u Hajdelbergu, prvi put koristi termin *spinale muskeltrophie* prilikom opisivanja ovog oboljenja (slika 1). Članci Werdniga i Hoffmanna predstavljaju prve objavljene kliničke i patološke aspekte SMA kod odojčeta (Werdnig, 1891). Pored toga Hoffmann čak diskutuje o postojanju progresivnog i hroničnog tipa SMA (Hoffmann, 1900).



**Slika 1.** Prvi opisi pacijenata obolelih od SMA  
( izvor: <http://neuromuscular.wustl.edu/synmot.html#cgcorr>)

### 1.1.1 Klinička slika

SMA je urođena, klinički i genetički heterogena grupa neuromuskularnih oboljenja. Ona predstavlja jedno od najčešćih uzročnika smrtnosti odojčadi. Kliničku sliku SMA karakteriše degeneracija motornih neurona u anteriornim rogovima kičmene moždine i

u nekim slučajevima, motornim jedrima u moždanom stablu, što dovodi do simetrične proksimalne mišićne slabosti, atrofije i progresivne paralize. Korteks obično ne pokazuje znake degeneracije (Nigro, 2005; Kostova i sar, 2007).

Klinička težina bolesti varira značajno u odnosu na uzrast kada je bolest započela, motornu sposobnost i očekivano trajanje života pacijenta. Međutim svi oblici SMA su povezani sa razvojem difuzne simetrične slabosti proksimalne grupe mišića — slabost ekstremiteta koja takođe pogađa aksijalnu, interkostalnu i bulbarnu muskulaturu. Mišići nogu su ranije i više oštećeni nego mišići ruku. Facijalni mišići nikada nisu oštećeni. Senzitivnost je očuvana. Tetivni refleksi su odsutni ili oslabljeni. Slabljenje respiratornih mišića dovodi do rekurentnih respiratornih infekcija kod pacijenata sa tendencijom progresije do potpune respiratorne insuficijencije što upravo predstavlja glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta kod SMA. Pored respiratornih, ovakvi bolesnici imaju problema i sa gastrointestinalnim traktom i ishranom. Deca sa SMA pate od gastroezofagealnog refluksa (GER), konstipacija i abdominalne distenzije. Otežano gutanje i GER u mnogome doprinose respiratornom morbiditetu. Deca sa SMA imaju povećan rizik za pojavu zaostajanja u rastu i razvoju kao i gojaznosti. Mišićna slabost kod ovih bolesnika dovodi do kontraktura, deformiteta kičmenog stuba i povećanog rizika za pojavu osteopenije i fraktura (Kolb i Kissel, 2011).

### 1.1.2 Klinička klasifikacija SMA

Klasifikacija SMA je uvek bila kontroverzna. Iako je rad Hoffmanna i Werdniga već na početku ukazao na razlike među decom sa teškom formom bolesti i onom sa hroničnim ispoljavanjem, tek narednih godina dolazi do formalnog opisivanja prvo najtežeg infantilnog oblika od strane Sylvestrea 1899. godine i Beevora 1903. godine, a potom i srednje teškog oblika 1950. godine od strane Wohlfarta, Feza i Eliassona i još detaljnije od strane Kugelberga i Welandera (Dubowitz, 2009).

Na internacionalnom konzorcijumu za spinalnu mišićnu atrofiju (ISMAC<sup>1</sup>), koji je održan 1992. godine, postavljeni su kriterijumi<sup>2</sup> na bazi kojih je izvršena klasifikacija SMA na tri osnovna tipa vezana za dečiji uzrast (Munsat and Davies, 1992):

- 1 ISMAC – eng. *International Spinal Muscular Atrophy Consortium* — Internacionalni konzorcijum za spinalnu mišićnu atrofiju
- 2 Kriterijumi su zasnovani na najvišem nivou motorne funkcije (pacijent može da sedi ili stoji) i uzrastu kada se javljaju simptomi



— **Tip I — Werdnig-Hoffmannova bolest** (MIM<sup>3</sup>#253300) je najteži i najčešći oblik SMA kome pripada približno 50% svih SMA pacijenata. Javlja se u prvih šest meseci života. Kod ove dece je izražena generalna slabost i hipotonija, poremećena kontrola pokreta glave, nečujan plač i kašalj, problemi sa gutanjem i salivacijom i nemogućnost napredovanja. Slabost je obično simetrična i više proksimalna nego distalna, sa donjim udovima slabijim od gornjih. Duboki tetivni refleksi izostaju ili su oslabljeni, ali je senzitivnost prisutna. Zahvaljujući progresivnoj mišićnoj slabosti ova deca nisu u mogućnosti da sede samostalno. Imaju teškoća pri disanju što dovodi do nedostatka kiseonika. Zbog slabog mišićnog tonusa razvija se karakterističan izgled označen kao „mlitava beba” (eng. *floppy infant*) (slika 2). Većina pacijenata umire pre prve godine života zbog ponovljenih respiratornih insuficijencija i aspiracione pneumonije (Nigro, 2005; Russman, 2007; D'Amico i sar, 2011; Kolb i Kissel, 2011).



**Slika 2.** Smanjen mišićni tonus kod bebe — *floppy infant*  
(izvor: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/17229.htm>)

— **Tip II — intermedijarna forma, Dubowitzova bolest** (MIM#253550) se javlja u periodu između 7. do 18. meseca života. Ovakva deca mogu da sede samostalno, ali ne mogu da stoje i da hodaju samostalno. U kliničkoj slici dominira zakasneli motorni razvoj, mala telesna težina, kao i nečujan kašalj. Kontrakture zglobova i skolioza su veoma česti i mogu se pojaviti u prvim godinama života kod težih oblika ove bolesti. Duboki tetivni refleksi odsustvuju, a tremori gornjih ekstremiteta su česti. Slabost mastikatornih mišića često smanjuje sposobnost žvakanja. Pacijenti mogu razviti respiratorne slabosti zbog kojih im je neophodna mehanička ventilacija. U zavisnosti od stepena težine bolesti,

ovi pacijenti se mogu prezentovati kao deca sa izraženom slabošću koja su samo sposobna da sede samostalno i koja su sklonija respiratornim problemima i ranoj skoliozi, do relativno jače dece koja imaju snažnije mišiće trupa, udova i respiratornih mišića. Preživljavanje je različito, između 4. godine i adolescentnog perioda, što zavisi od stepena oštećenja respiratornih mišića (Nigro, 2005; Russman, 2007; D'Amico i sar, 2011; Kolb i Kissel, 2011).

— **Tip III — Kugelberg-Welanderova bolest** (MIM#253400) ima najblaži klinički tok. Kod ovih pacijenata prvi simptomi se javljaju između 18. meseca i 18. godine starosti. Ova grupa uključuje klinički heterogene pacijente, koji samostalno hodaju, ali imaju problema kod trčanja, skakanja i penjanja. Tokom detinjstva mogu da razviju slabost proksimalnih mišića, predominantno mišića nogu. Napredovanje ovog tipa SMA je sporo. Pacijenti iako nauče da hodaju većinom kasnije gube ovu sposobnost i vezani su za invalidska kolica. I ovde se javlja široki spektar kliničkih manifestacija: nekima mogu biti neophodna kolica u detinjstvu, dok drugi nastavljaju da hodaju kao odrasli sa manjim mišićnim slabostima. Pacijenti koji izgube sposobnost hodanja obično razvijaju skoliozu i druge probleme povezane sa slabom pokretljivošću kao osteoporozi i gojaznost. Period preživljavanja je obično dugačak i uglavnom zavisi od oštećenosti respiratornih funkcija (ponekada je dužina života nepromenjena) (Nigro, 2005; Russman, 2007; D'Amico i sar, 2011; Kolb i Kissel, 2011).

Prikazanoj klasifikaciji vezanoj za dečji uzrast se kasnije dodaje i SMA **tip IV-Zerres – Rudnickova bolest** (MIM #271150) u koju spadaju pacijenti koji imaju početak pojave simptoma u odraslom dobu (posle 18. godine) i blag, hroničan tok bolesti sa slabom progresijom. Stoga je ovaj tip označen kao adultni oblik SMA. Oboleli su sposobni da hodaju u zrelom dobu i nemaju respiratorne i nutricionere probleme. Životni vek ostaje nepromenjen (Nigro, 2005; Russman, 2007; D'Amico i sar, 2011; Kolb i Kissel, 2011).

Međutim, iako je ova klasifikacija našla široku primenu, zbog velike heterogenosti kliničke slike skoro 25% pacijenata se ne može precizno klasifikovati. U cilju prevaziđenja problema heterogenosti unutar grupa predložena je subklasifikacija tipova SMA. U okviru tipa I izdvojena je grupa sa najtežom formom kod koje se uočava smanjena intrauterina pokretljivost što ukazuje na prenatalnu pojavu bolesti. Karakteriše je teška slabost sa pridruženim kontrakturama koje se javljaju odmah na rođenju. Stoga je ovaj

oblik označen kao SMA tip 0. Pored tipa I i tip III se deli na dva podtipa (a i b), bazirana na postojanju značajne razlike u periodu gubitka sposobnosti hodanja što je u korelaciji sa periodom pojave bolesti. Tako samo 22% obolelih (subklasifikovanih kao tip IIIa) imaju pojavu prvih simptoma pre 3. godine, dok 58,7% pacijenata (subklasifikovanih kao tip IIIb) iste simptome ispoljava posle 3. godine i svi ostaju pokretni do 40 godina života (Wang i sar, 2007). Međutim ova subklasifikacija još uvek nema širu primenu među kliničarima.

Nakon uvođenja prikazane klasifikacije SMA, 2007. godine je formalizovan i klinički tretman SMA pacijenata (eng. *Standard of Care document*<sup>A</sup>) (Wang i sar, 2007).

### 1.1.3 Učestalost SMA

SMA se javlja sa učestalošću između 1:6000 i 1:10000 živorođene dece i predstavlja, posle cistične fibroze, najčešće letalno autozomno recesivno monogeno oboljenje u populaciji belaca (Pearn, 1978; McAndrew i sar, 1997). Stariji literaturni podacima navode učestalost heterozigotnih nosilaca mutiranog gena od 1:60 do 1:80. Međutim novije studije pokazuju da ova učestalost varira od 1:25-1:63 zavisno od ispitivane populacije: u Francuskoj ustanovljena učestalost je 1:34-1:56, u Nemačkoj 1:25-1:35, SAD 1:44-1:60, Kanadi/SAD 1:54 i Kini 1:63 (Smith i sar, 2007).

## 1.2 Molekularna osnova bolesti

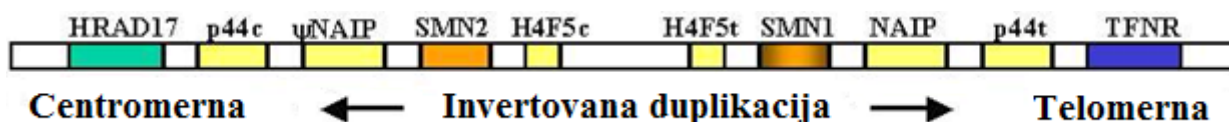
Nakon uspostavljanja kliničkih kriterijuma usledilo je traganje za genetičkom osnovom bolesti. Svi tipovi SMA pokazuju gensku homogenost. Molekularna istraživanja devedesetih godina prošlog veka bazirana na studijama praćenja vezanih markera (eng. *linkage* analiza) su pokazala da su sva tri tipa SMA, povezana sa istim lokusom koji se nalazi na hromozomu 5, u regionu 5q11.2-q13.3 (Brzustowicz i sar, 1990; Gilliam i sar, 1990; Melki i sar, 1990a; Melki i sar, 1990b). U narednim godinama je usledilo određivanje preciznije strukture ovog regiona. Lefebvre i saradnici su 1995. godine pokazali da lokus vezan za bolest ima kompleksnu strukturu koja sadrži region od 500kb invertovane i duplikovane sekvence na normalnom hromozomu 5q13 i sadrži gene odgovorne za pojavu SMA (Lefebvre i sar, 1995).

---

4 Eng. *Standard of Care document*-dokument o standardizaciji nege

U okviru ove velike invertovane duplikacije identifikovana su četiri gena. Svaki od ovih gena predstavljen je sa najmanje 2 kopije, telomernom i centromernom: *SMN* (engl. *survival of motor neuron*<sup>5</sup>) — *SMN1* i *SMN2*; *NAIP* (engl. *neuronal apoptosis inhibitory protein*<sup>6</sup>) — *NAIP* i *ΨNAIP*; *BTF2p44* (engl. *basal transcription factor subunit p44*<sup>7</sup>) — *BTF2p44t* i *BTF2p44c* i gen koji kodira protein sa nepoznatom funkcijom *H4F5* — *H4F5t* i *H4F5c* (slika 3) (Lefebvre i sar, 1995; Roy i sar, 1995; Burglen i sar, 1997; Carter i sar, 1997; Scharf i sar, 1998). Među njima postoje i ponovljene sekvence: veliki broj Alu sekvenci; nekoliko rasutih dugih (5 kopija L1<sup>8</sup>) i kratkih repetitivnih sekvenci (SINE<sup>9</sup>— npr. MIR2, MST, MER); polimorfni mikrosatelitni i nekoliko mono- i dinukleotidnih ponovljenih sekvenci.

Kompleksnost sekvence SMA regiona je dugo uzrokovala teškoće u određivanju organizacije ovog regiona. Zbog ovakve strukture ceo region je podložan čestim rearanžmanima i delecijama. Iako je homozigotna delecija koja obuhvata sve gene iz 5q13 regiona nađena kod SMA pacijenata, samo mutacije/delecije u genu *SMN* i to njegovoj telomernoj kopiji — *SMN1* uzrokuju sve tipove SMA vezane za dečji uzrast (Lefebvre i sar, 1998).



Slika 3. Šematski prikaz invertovanog i duplikovanog SMA regiona (5q13)

(Izvor: <http://neuromuscular.wustl.edu/synmot.html>)

Otkriće genetičke osnove bolesti je omogućilo brzo molekularno genetičko testiranje i dovelo do velikog napretka u razumevanju molekularne i ćelijske osnove bolesti. Kao posledica toga došlo je do razvoja novih terapijskih pristupa i animalnih modela SMA koji se koriste u sve većem broju uspešnih prekliničkih testiranja. Danas su potencijalne terapije područje aktivnog istraživanja i SMA je jedna od malobrojnih autozomno recesivnih bolesti kod ljudi za koje se čini da će razvoj somatske genske terapije postati realnost u bliskoj budućnosti (Wirth i sar, 2006; Van Meerbeke i Sumner, 2011) (slika 4).

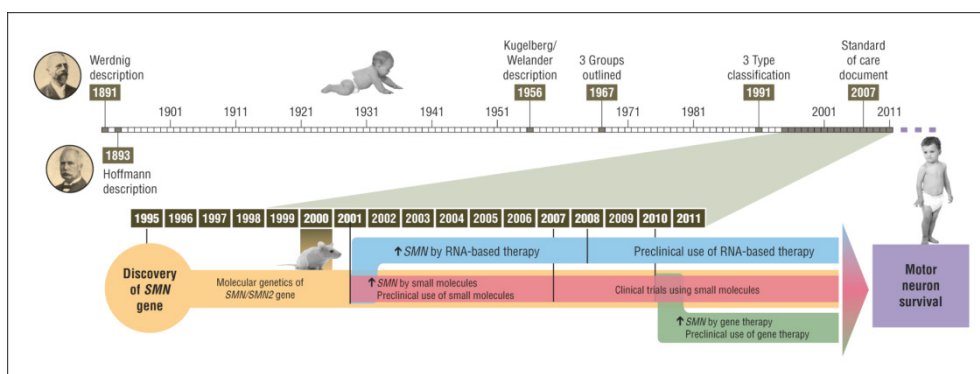
5 Eng. *survival of motor neuron* – opstanak motoneurona

6 Eng. *neuronal apoptosis inhibitory protein*– protein inhibitor apoptoze neurona

7 Eng. *basal transcription factor subunit p44* – subjedinica p44 bazalnog transkripcionog faktora

8 L1 ili LINE1-eng. *long interspersed nuclear element*– dugi rasuti jedarni elementi

9 SINE-eng. *short interspersed nuclear element* – kratki rasuti jedarni elementi



Slika 4. SMA — istorijski prikaz  
(izvor: <http://archneur.jamanetwork.com>)

### 1.3 Gen *SMN* i njegova ekspresija

Obe kopije gena *SMN* obuhvataju 27 kb sa okvirom čitanja od 83 bp koji je raspoređen u 9 egzona (1, 2a, 2b, 3-8) sa stop kodonom smeštenim blizu samog kraja egzona 7 (Lefebvre i sar, 1995; Chen i sar, 1998). Poliadenilacioni signal je 550 bp nizvodno, od stop kodona (Burglen i sar, 1995). Dve kopije gena *SMN* imaju isti obrazac ekspresije sa produktima koji su široko rasprostranjeni. Funkcionalna iRNK (FL<sup>10</sup>— iRNK) koja nastaje transkripcijom obe kopije gena je veličine 1,5kb i kodirana je sa svih 9 egzona, dok se samo egzoni 1-7 prevode u protein SMN od 294 amino kiseline, težine 38 kD (Lefebvre i sar, 1995, Lorson i sar, 2000; Cartegni i sar, 2002; Kashima i sar, 2003).

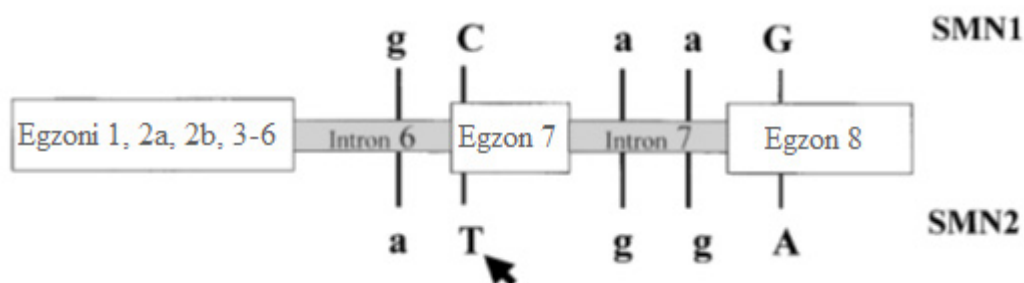
#### 1.3.1 Razlika između gena *SMN1* i *SMN2*

*SMN1* (MIM#600354) je visoko konzerviran i skoro svi do sada analizirani eukariotski organizmi imaju jednu kopiju ovog gena (Bergin i sar, 1997; Miguel-Aliaga i sar, 2000; Paushkin i sar 2000). Zanimljivo je da je evolutivno skorašnja genomska duplikacija, koja se dogodila pre razdvajanja čoveka i šimpanze, dovela do nastanka drugog gena koji je isključivo prisutan kod ljudi — *SMN2* (MIM# 601627) (Lefebvre i sar 1995; Rochette i sar, 2001). Sekvenciranje kompletnog genomskog regiona koji sadrži *SMN1* i *SMN2* je otkrilo 99% homologije između ove dve kopije (Monani i sar, 1999a). Obe kopije gena imaju gotovo identične 5' krajeve, uključujući promotorske sekvence za koje se vezuju isti transkripcioni faktori (Burglen i sar, 1995, Echaniz-Laguna i sar, 1999;

10 FL-eng. *full-length*-potpune dužine

Monani i sar, 1999b). *SMN1* se može razlikovati od *SMN2* samo po pet nukleotida lokalizovanih na 3' kraju gena: jedan u intronu 6 (c.835-45G>A), jedan u egzonu 7 (c.840C>T), dva u intronu 7 (c.889+100A>G i c.889+214A>G) i jedan u egzonu 8 (c.1155G>A) (slika 5) (Burglen i sar, 1995; Lefebvre i sar, 1995). Posledica toga je da je FL-transkript (FL-cDNA) oba gena identičan, osim za dve nukleotidne zamene u egzonima 7 i 8.

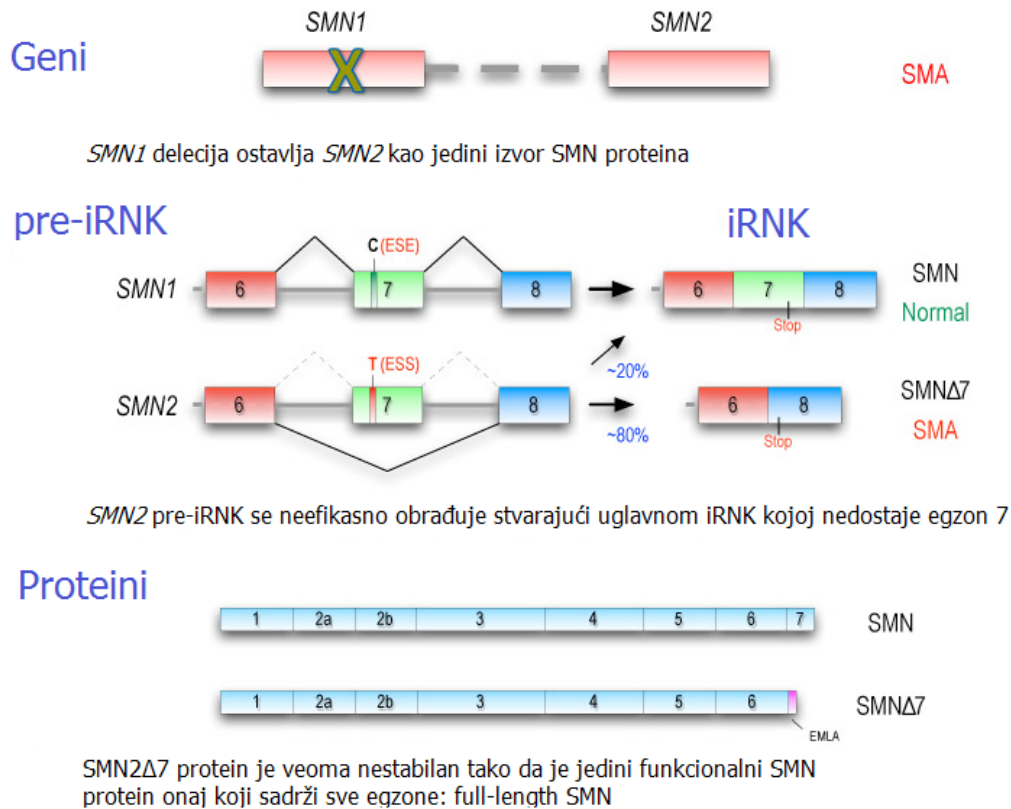
Od opisanih nukleotidnih razlika samo tranzicija C u T u egzonu 7 je lokalizovana u okviru kodirajućeg regiona (G u A tranzicija prisutna u egzonu 8 se nalazi u okviru 3'—netranslirajućeg regiona ovog egzona) (Lorson i sar, 1999). Međutim C u T tranzicija je nukleotidna promena bez uticaja na translaciju (engl. *silent*<sup>11</sup> mutacija) (Lefebvre i sar, 1995; Monani i sar, 1999a). Iako ova promena ne utiče na amino kiselinsku sekvencu proteina koji kodira, značajno utiče na iskrajanje (engl. *splicing*<sup>12</sup>) primarnog transkripta (Lorson i sar, 1999; Monani i sar, 1999a) (Slika 5). Posledica toga je da ekspresijom gena *SMN1* skoro isključivo nastaje tačno obrađen FL-transkript (sadrži svih 9 egzona), dok ekspresijom gena *SMN2* nastaje samo oko 10% FL-transkripta i 90% alternativno obrađenog transkripta koji nema egzon 7 (*SMN2Δ7*) (slika 6) (Lefebvre i sar, 1995; Wirth i sar, 2006). Delecija sedmog egzona iz primarnog transkripta dovodi do redukcije u dužini proteina SMN. Razlika između redukovanog proteina i proteina potpune dužine je 16 amino kiselina (amino kiselinska sekvencu C — kraja kompletnog proteina SMN je — YMGFRQNQKEGRCSHSLN, a proteina sa delecijom egzona 7 — YMEMLA). C-terminalni region proteina SMN koji kodira egzon 7 je tirozin-glicin dodekapeptidni motiv, esencijalan za oligomerizaciju i adekvatno funkcionisanje proteina SMN. Stoga skraćeni protein pokazuje smanjenu stabilnost i brzo se degraduje (Talbot i sar, 1997).



Slika 5. Genomska struktura i nukleotidne razlike između *SMN1* i *SMN2* (izvor: Wirth, 2000)

11 Eng. *silent* — tiha, bez uticaja

12 Eng. *splicing* — obrada, isecanje, iskrajanje



**Slika 6.** Alternativna obrada pre-iRNK nastale sa kopije gena *SMN1* i *SMN2*  
(izvor: <http://www.med.upenn.edu/dreyfuslab/research.html>)

### 1.3.2 Egzon 7 i obrada primarnog transkripta

Alternativna obrada iRNK prekursora je važan mehanizam koji reguliše gensku ekspresiju i izvor je velike raznovrsnosti proteina iz ograničenog broja gena. U molekularnoj patologiji SMA osnovni faktor je upravo alternativna obrada transkripta nastalog sa *SMN2* u poređenju sa transkriptom sa *SMN1* kopije. Ona ujedno objašnjava i zašto delecije/mutacije u *SMN1*, ali ne i u *SMN2* dovode do svih formi SMA odnosno zašto gen *SMN2* ne može u potpunosti da kompenzuje gubitak *SMN1* (Lorson i sar, 1998a). Do sada je postavljeno više hipoteza koje pokušavaju da objasne ovaj fenomen.

*SMN* egzon 7 obuhvata 54bp i karakteriše ga slabo mesto iskrajanja egzona (eng. *splice site*<sup>13</sup>). Da bi bio prepoznat od mehanizma za obradu neophodni su dodatni pomoćni elementi. Uključivanje egzona 7 u *SMN* iRNK je regulisano velikim brojem pozitivnih

13 Eng. *splice site* — sekvence na 5' i 3' egzon/intron mestima spajanja

cis-delujućih (eng. *cis-acting*<sup>14</sup>) elemenata nazvanih egzonskim (ESE<sup>15</sup>) ili intronskim (ISE<sup>16</sup>) stimulatorima iskrajanja i *cis* elementima koji imaju negativan uticaj nazvanih egzonskim (ESS<sup>17</sup>) ili intronskim (ISS<sup>18</sup>) utišivačima iskrajanja. Ove *cis* elemente potom prepoznaju trans-delujući (eng. *trans-acting*<sup>19</sup>) proteini uključeni u obradu (Wirth i sar, 2006).

Predložena su dva modela koja objašnjavaju inhibitorni efekat tranzicije C u T (U u iRNK) u *SMN2* na obradu egzona 7. Po ESE modelu *SMN1* egzon 7 sadrži važan ESE (SE1) koji se nalazi na 5' kraju ovog egzona. Njega prepoznaje faktor iskrajanja SF2/ASF i potencira uključivanje egzona 7 u obrađeni transkript. Pošto je sekvenca ovog ESE promenjena tranzicijom C u T u *SMN2* transkriptima, mašinerija za obradu ne prepoznaje 3' mesto iskrajanja i egzon 7 se izostavlja. (Lorson i sar, 1999; Cartegni i sar, 2003; Cartegni i sar, 2006). To dovodi do prednosti u stvaranju alternativno obrađenog, skraćenog *SMN2Δ7* transkripta. Nasuprot tome, model utišivača (eng. *silencer model*), predlaže da tranzicija CuT tranzicija stvara ESS koji interaguje sa hnRNP A1<sup>20</sup> faktorom iskrajanja koji sprečava obradu egzona 7. Ni jedna od ovih hipoteza nije konačno opovrgnuta. Pored toga ovi modeli nisu nužno međusobno isključivi i moguće je da oba mehanizma deluju simultano (slika 7) (Kashima i sar, 2003; Cartegni i sar, 2006).

Takođe je pokazano da se i u centralnom delu egzona 7 obe kopije gena *SMN* nalazi ESE (SE2). Njega prepoznaju brojni faktori iskrajanja<sup>21</sup> koji zajedno olakšavaju obradu egzona 7 i najverovatnije su odgovorni za ~10% FL-*SMN2* transkripta (slika 7) (Hofmann i sar, 2000). Pokazano je da njihova povećana ekspresija vraća nivo FL-*SMN2* transkripta na skoro 80%. Izostavljanje egzona 7 može biti stoga delom prevaziđeno kompleksom faktora iskrajanja koji se vezuju za ovaj ESE.

14 Eng. *cis-acting*— delovanje u cis položaju

15 ESE-eng. *exonic splicing enhancers* — egzonski stimulatori obrade

16 ISE-eng. *intronic splicing enhancers* — intronski stimulatori obrade

17 ESS-eng. *exonic splicing silencers* — egzonski supresori obrade

18 ISS-eng. *intronic splicing silencers* — intronski supresori obrade

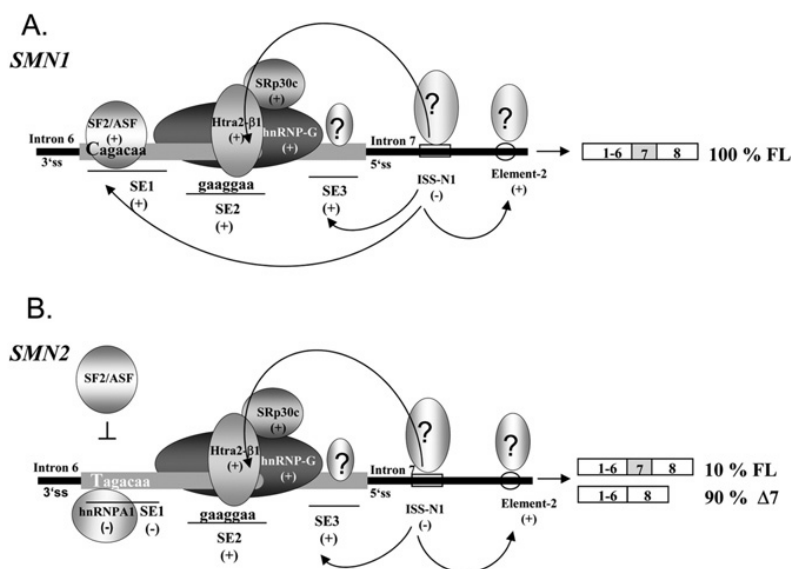
19 Eng. *trans-acting* — delovanje u trans položaju

20 hnRNP A1— eng. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*: heterogeni jedarni ribonukleoprotein A1

21 Proteini uključeni u obradu primarnog transkripta: Htra2-β1 i njegovi partneri u interakciji (SRp30c, hnRNP- G i RBM)



Među nekoliko intronskih regulatornih elemenata ISS-N1 se čini kao najrelevantniji. ISS-N1 je lokalizovan u intronu 7 blizu mesta vezivanja U1 snRNP<sup>22</sup>, esencijalnog za proces iskrajanja. ISS-N1 ispoljava svoju funkciju na pozitivno delujućim egzonskim i intronskim elementima (slika 7). Upotreba *antisense* oligonukleotida<sup>23</sup> specifičnog za sekvencu ISS-N1 dovodi do skoro kompletnog uključivanja egzona 7 u *SMN2* iRNK (Singh i sar, 2006).



Slika 7. Regulacija obrade *SMN* egzona 7 (izvor: Wirth i sar, 2006)

Do danas je dokazano postojanje još nekoliko drugih faktora koji imaju ulogu u iskrajanju *SMN* transkripata (Singh i sar, 2006, Kashima i sar, 2007). Ovi podaci pokazuju da je mehanizam isključivanja egzona 7 kompleksniji od onog što se ranije mislilo i daju novi uvid u kontrolu iskrajanja primarnog transkripta. Na osnovu svih predloženih mehanizama deluje da je obrazac iskrajanja transkripata nastalih sa *SMN2* specifičan za tip ćelije i zavistan od koncentracije različitih faktora iskrajanja u različitim ćelijskim tipovima. Specifičan obrazac iskrajanja u motornim neuronima je još uvek nepoznat. Ipak, ključna je činjenica da se obrada *SMN2* transkripta može modulirati aktivnošću različitih faktora iskrajanja što je, između ostalog, našlo primenu u kreiranju novih terapijskih pristupa (Wirth i sar, 2006).

22 U1 snRNP- eng. *uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particle*-mala jedarna ribonukleoproteinska partikula bogata uridinom

23 *Antisense* oligonukleotid je veštački sintetisana nukleotidna sekvencu komplementarna *sense* sekvenci iRNK koja se sintetiše sa određenog gena. Primenom *antisense* oligonukleotida on se vezuje za *sence* sekvencu iRNK, blokira je i posredno inaktivira gen.

## 1.4 Protein SMN

Termin univerzalno prisutan (eng., „ubiquitous”) je često korišćen da okarakteriše ekspresiju proteina SMN jer se ovaj protein nalazi u svim tkivima: u visokom procentu u kičmenoj moždini, mozgu, bubrezima i jetri; umereno u skeletnoj i srčanoj muskulaturi i u maloj meri u fibroblastima i limfocitima (Coover i sar, 1997). Protein SMN se detektuje u citoplazmi (gde je difuzno raspoređen) i jedru, u obliku tačkastih jedarnih struktura koje se nazivaju Gems (eng. *gemini of the coiled bodies*<sup>24</sup>), jer se obično uočavaju u neposrednoj blizini ili se kompletno preklapaju sa Cajalovim (eng. *coiled*<sup>25</sup>) telašcima (Liu i sar, 1996; Young i sar, 2000a). Količina proteina SMN kao i broj Gems partikula koreliraju sa težinom kliničke slike - pacijenti sa SMA tip I i homozigotnim gubitkom gena *SMN1* pokazuju značajno smanjenje nivoa proteina SMN kao i redukovani broj Gems partikula, dok se kod pacijenata sa SMA tip III detektuje samo neznatno smanjenje (Coover i sar, 1997).

### 1.4.1 Struktura i funkcionalni domeni proteina SMN

Kompletan (FL) protein SMN ima molekulsku težinu od 38 kDa i sadrži različite, dobro okarakterisane funkcionalne domene (slika 8) (Liu i sar, 1996). Egzoni 2a i 2b su konzervirani i kodiraju region (K-domen<sup>26</sup>) koji igra ulogu u vezivanju nukleinskih kiselina (Lorson i sar, 1998b). Pored toga, region kodiran egzonom 2b je važan za samooligomerizaciju, za interakciju sa Gemin2, proteinom neophodnim za formiranje splajsezomalnih snRNPs, a sadrži i NLS<sup>27</sup> (Fischer i sar, 1997; Young i sar, 2000b). Centralni region proteina SMN kodiran egzonima 2b i 3 predstavlja Tudor domen i posreduje u vezivanju Sm<sup>28</sup> proteina, ključnim elementima za stvaranje snRNPs (Buhler i sar, 1999; Selenko i sar, 2001). Egzon 4 kodira oblast za koju se vezuje Gemin3. Egzon 5 i deo egzona 6 kodiraju P-domen<sup>29</sup> koji posreduje u interakciji SMN sa profilinom, malim proteinom koji se vezuje za aktin (Giesemann i sar, 1999; van Bergeijk i sar,

24 Eng. *gemini of the coiled bodies* - blizanci izuvijanih telašaca

25 Eng. *coiled* - izuvijana

26 Eng. *K-rich domen* – domen bogat lizinom

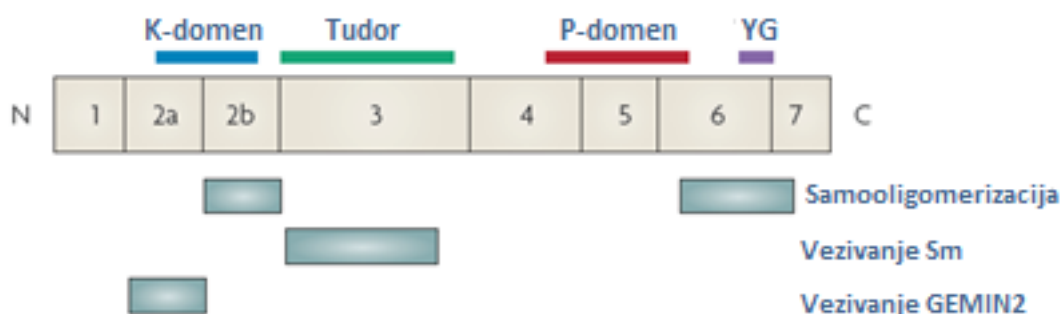
27 NLS— eng. *nucleolar localization signal* — nukleolusni lokalizacioni signal

28 Sm - eng. *Smith antigen* - Smithov antigen

29 Eng. *P-rich domen* - domen bogat prolinom

2007). C-terminalni region kodiran egzonima 6 i 7 je dodatni domen za samooligomerizaciju i sadrži konzervirane YG motive<sup>30</sup>. Ovaj domen je važan za metabolizam iRNK kroz interakciju sa snRNP i Sm proteinima (utičući na stvaranje Sm kompleksa), kao i proteinom Gemin3, a sadrži i CTS<sup>31</sup> (Liu i sar, 1997; Lorson i sar, 1998a; Zhang i sar, 2003).

Ovako strukturirani domeni proteina SMN izgleda da diktiraju njegovu multifunkcionalnost što značajno otežava identifikaciju njegove specifične uloge odgovorne za različite patologije SMA.



Slika 8. Dijagram sa prikazanim *SMN* egzonima i odgovarajućim domenima proteina SMN (izvor: [http://www.snpcar.ro/revista\\_en.php?level=articole&an=2011&id=454](http://www.snpcar.ro/revista_en.php?level=articole&an=2011&id=454))

### 1.4.2 Funkcija proteina SMN

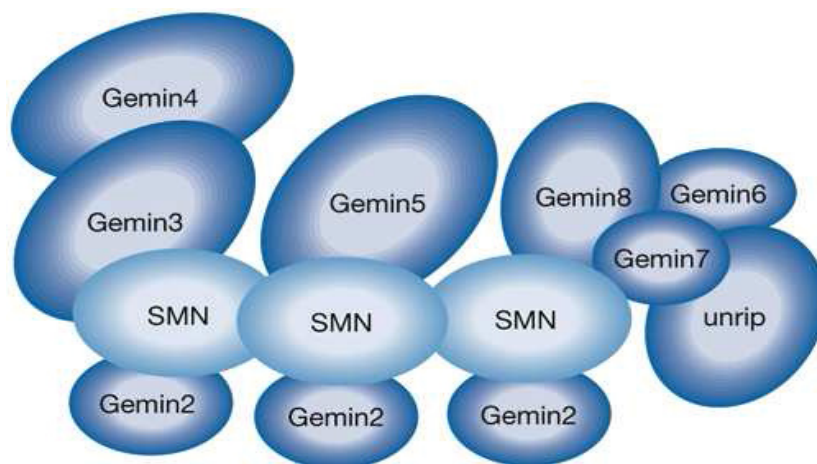
Iako se na prvi pogled činilo da se SMN svuda eksprimira, vremenski zavisna ekspresija i unutarćelijska lokalizacija je zapravo strogo regulisana ukazujući na višestruke uloge proteina SMN. Na to ukazuje i činjenica da pored svojstva samooligomerizacije protein SMN interaguje direktno ili indirektno sa različitim proteinima. Međutim precizna funkcija proteina SMN još nije definitivno razjašnjena.

SMN je čvrsto povezan sa nekoliko proteina koji se smatraju integralnim komponentama makromolekulskog kompleksa koji se naziva SMN kompleks i ima oko 1MDa (Pellizzoni i sar, 1999; Meister i sar, 2000) (slika 9). Ovi proteini se nazivaju Ge-

30 Triplikovane tirozin-glicin sekvence

31 CTS — eng. *cytoplasmic targeting signal* — signal za usmeravanja ka citoplazmi

mini (obeleženi 2-8) jer imaju distribuciju sličnu SMN, uključujući lokalizaciju u Gems partikulama. Pored njih u kompleks je uključen i unrip<sup>32</sup> koji je atipična komponenta SMN kompleksa koja, iako vezuje Gemine (6 i 7), nije lokalizovana u Gems partikulama ili Cajalovim telašcima (Pellizzoni i sar, 1999; Carissimi i sar, 2005; Grimmeler i sar, 2005)



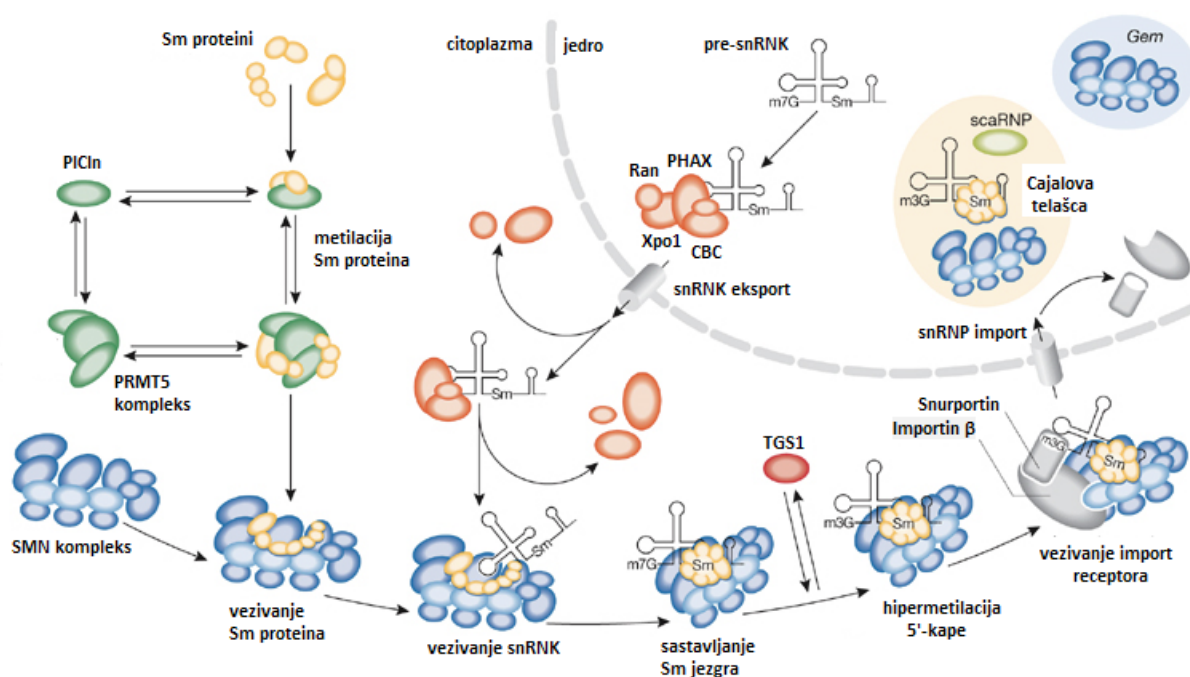
**Slika 9.** Šematska ilustracija SMN kompleksa

(izvor: [http://www.nature.com/embor/journal/v8/n4/fig\\_tab/7400941\\_F1.html](http://www.nature.com/embor/journal/v8/n4/fig_tab/7400941_F1.html))

SMN je deo multiproteinskog kompleksa koji pored brojnih proteina uključuje i Sm proteine. Sm proteini su neophodni za formiranje splajsozomalnih snRNP<sup>33</sup> koji su glavna komponenta splajsozoma, ćelijskih partikula koje sprovode obradu pre-iRNK (Wirth i sar, 2006) Prekursor snRNK transkripata se transportuje iz jedra u citoplazmu gde se kombinuje sa Sm proteinima da bi formirali stabilno jezgro Sm kompleksa. Ovaj proces je posredovan SMN kompleksom koji igra ulogu neke vrste kontrole sastavljanja kompleksa Sm proteina i njegovog tačnog vezivanja za snRNK, a ne za druge tipove RNK (Meister i sar, 2000). Na taj način SMN kompleks ima ulogu u građenju citoplazmatskog snRNP kompleksa i njegovog transporta iz citoplazme u jedro (Pellizzoni, 2007). Ovaj višestepeni proces sazrevanja funkcionalnih splajsezoma se odigrava u različitim ćelijskim odeljcima (slika 10) (Will i Luhrmann, 2001; Kiss, 2004).

32 Eng. *UNR interacting protein*— UNR interagujući protein

33 snRNP— eng. *small nucleus ribonucleoproteins* — mali jedarni ribinukleoproteini



Slika 10. Put biogeneze snRNP

(izvor: [http://www.nature.com/embor/journal/v8/n4/fig\\_tab/7400941\\_F2.html](http://www.nature.com/embor/journal/v8/n4/fig_tab/7400941_F2.html))

Danas je poznato da je glavna funkcija proteina SMN opisana biogeneza snRNPs. Pored ovoga, pretpostavlja se da je protein SMN, kroz interakciju sa nizom drugih proteina, uključen i u druge procese: u regulaciju transkripcije i gensku ekspresiju, u sklapanju snoRNPs<sup>34</sup>, u formiranje osteoklasta i koštanoj resorpciji kao i u druge još nepoznate funkcije (With i sar, 2006). Funkcionalan protein SMN takođe ima antiapoptotske karakteristike, dok skraćeni SMN indukuje apoptozu (Kerr i sar, 2000).

Iako se protein SMN eksprimira u svim somatskim ćelijama, na osnovu svojih univerzalnih funkcija, i dalje je zagonetka zašto su kod SMA posebno osetljivi motorni neuroni kičmene moždine. Ovo otvara pitanje da li SMN obavlja i dodatne funkcije ograničene samo na motorne neurone. Tako su postavljene dve glavne hipoteze kako bi se objasnila SMA patogeneza: (a) redukcija SMN može dovesti do poremećaja stvaranja snRNP na šta su motoni neuroni moguće više senzitivni (Fan i Simard, 2002) ili (b) da protein SMN može igrati ključnu ulogu u ćelijskim funkcijama specifičnim za motorne neurone, a nezavisnim od stvaranja snRNP. Hipoteza (b) je podržana različitim eksperimentalnim dokazima (Chan i sar, 2003; Carrel i sar, 2006; Chang i sar, 2008). SMN se

34 snoRNPs — eng. *small nucleolar ribonucleoprotein particles* – male ribonukleoproteinske partikule jedarca

nalazi u citoplazmi aksona i dendrita neurona u kompleksu sa grupom proteina različitom od one za obradu pre-iRNK<sup>35</sup>. Nekoliko studija je pokazalo da je protein SMN odgovoran za preživljavanje motornih neurona omogućavajući normalan aksonalni transport i održavajući integritet neuromišićnih sinapsi. Ovome ide u prilog činjenica da aksoni SMA pacijenata pokazuju destabilizaciju citoskeletnih proteina, te da su kraći, kao i da se javlja degeneracija njihovih krajeva na sinapsi. To može objasniti mišićnu slabost i atrofiju kod ovih pacijenata (Bechade i sar, 1999; Pagliardini i sar, 2000).

## 1.5 Mutacije i polimorfizmi gena *SMN1*

Egzoni 7 i 8 ili samo egzon 7 gena *SMN1* su homozigotno deletirani kod približno 94% SMA pacijenata nezavisno od tipa (Wirth, 2000). Jedino je tip IV SMA (adultna forma) heterogena: u nekoliko slučajeva je opisana homozigotna delecija gena *SMN1*, dok većina slučajeva nije bila vezana za region 5q13 (Zerres i sar, 1995; Wirth i sar, 2006). Postoji nešto veća učestalost homozigotne delecije *SMN1* u tipovima I i II (96% i 94%, respektivno) u poređenju sa tipom III SMA (86%) (Wirth, 2000). Ipak mehanizam bolesti odgovoran za homozigotnu deleciju gena *SMN1* u tipovima I-III se razlikuje.

U retkim slučajevima (~4%) tačkaste mutacije u *SMN1* su odgovorne za bolest. Pacijenti tipa I-III SMA koji ne nose homozigotnu deleciju mogu biti složeni heterozigoti sa delecijom na jednom hromozomu i tačkastom mutacijom na drugom (Wirth i sar, 1999). Do sada je opisano preko 60 različitih malih intragenih *SMN1* mutacija koje utiču na funkciju proteina SMN (Yu-jin i sar, 2012). One uključuju mutacije koje dovode do formiranja stop kodona (eng. *non-sense*<sup>36</sup> *mutations*), mutacije koje menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift*<sup>37</sup> *mutations*), mutacije koje dovode do aminokiselinske zamene (eng. *missense*<sup>38</sup> *mutations*), delecije, inverzije i mutacije na mestima iskrajanja (eng. *splice site mutations*) (Ogino i Wilson, 2004a; Sun i sar, 2005). Pokazano je da je većina *missense* mutacija lokalizovana u okviru visoko konzerviranog regiona egzona 6 i 7 i one pre svega redukuju kapacitet proteina SMN za samooligomerizaciju (Hahnen i sar, 1997; Talbot i sar, 1997; Lorson i sar, 1998a; Wirth i sar, 1999). Mutacije koje izazivaju veća oštećenja

---

35 Protein SMN u aksonima intereaguje sa aktinom

36 Eng. *non-sense* - besmisleno

37 Eng. *frameshift* - pomak okvira čitanja

38 Eng. *missense* - pogrešnog smisla

u oligomerizaciji koreliraju sa težom kliničkom slikom i obrnuto. Pokazano je da su aleli koji nose male intragenske mutacije najčešći kod SMA tip III, a najmanje učestali kod SMA tip I (Wirth 1999).

Približno 3% svih pacijenata koji su klinički dijagnostikovani kao SMA nemaju nijednu mutaciju u okviru gena *SMN1*. Oni mogu pripadati SMA pacijentima koji nisu vezani za 5q13 region i ukazuju na gensku heterogenost (Wirth i sar, 2006).

Većina opisanih polimorfizama ovog gena je prisutna u promotorskom regionu i intronu 6. Do sada je objavljen 31 polimorfizam: 12 u promotoru, jedan u intronu 1, jedan u egzonu 2a, jedan u egzonu 3 i 16 u intronu 6 (Brahe i sar, 1996; Hahnen i Wirth, 1996a; Monani i sar, 1999a).

## 1.6 Mehanizam nastanka bolesti

Poznato je da su duplicirani geni i regioni podložni nejednakim rearanžmanima između visoko homologih elemenata što dovodi do nastanka delecija/duplikacija ili genskih konverzija (npr. imunoglobulinski genski klaster, periferni mijelinski protein 22, steroid 21-hidroksilaza geni). Velike delecije/duplikacije koje se sreću u okviru ovako dupliciranih regiona se mogu odigrati: interhromozomski usled nejednake razmene naslednog materijala (eng. *crossing-over*<sup>39</sup>) između nesestrinskih hromatida homologih hromozoma tokom mejoze ili intrahromozomski, bilo kao posledica nejednake razmene sestrinskih hromatida tokom mitoze ili proklizavanjem DNK molekula (eng. *replication slippage*<sup>40</sup>) (Hahnen i sar, 1996b).

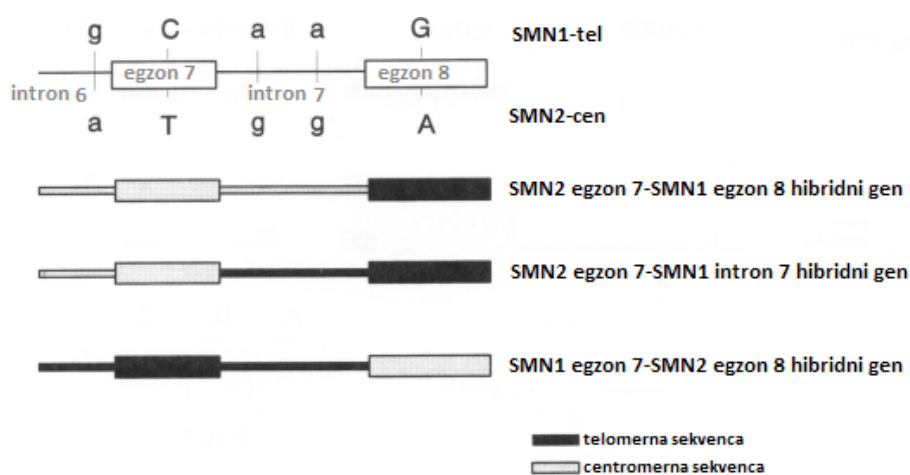
Slično organizovanu gensku strukturu ima i SMA region pa je i on nestabilan i podložan čestim rearanžmanima. Pokazano je da su različiti mehanizmi odgovorni za gubitak gena *SMN1* na SMA hromozomima (Wirth i sar, 1999). Nejednaki *crossing-over* između ponovljenih jedinica uglavnom dovodi do delecija različite veličine koje uključuju samo gen *SMN1*, a u nekim slučajevima mogu obuhvatiti *NAIP* i susedne gene (Wirth i sar, 1999). Među pacijentima sa homozigotnom delecijom gena *SMN1* približno 90% po-

---

39 Eng. *crossing-over* — prelazak na drugu stranu

40 Eng. *replication slippage* — replikativno proklizavanje poznato i kao *slipped-strand mispairing* (SSM) forma mutacija. Tokom replikacije, prilikom nailaska na repetativnu sekvencu, može doći do razdvajanja novosintetisnog lanca sa lanca koji se prepisuje. To povremeno dovodi do njihovog pomeranja i može rezultovati u pogrešnom sparivanju komplementarnih baza što za posledicu ima nastanak duplikacija/delecija repetativnih DNK sekvenci koje obično uključuju kraće ponovke.

kazuju homozigotno odsustvo oba egzona — 7 i 8. Oko 10% pokazuje homozigotnu deleciju samo egzona 7 za koju se smatra da je posledica genske konverzije *SMN1* u *SMN2* nastale zbog velike homologije ove dve kopije. Ova pojava predstavlja drugi mehanizam odgovoran za odsustvo gena *SMN1* (Wirth i sar, 2000). Genska konverzija obuhvata bilo kompletan gen *SMN1* ili samo njegov deo, rezultujući u nastanku hibridnog gena *SMN* koji obično vodi poreklo od egzona 7 *SMN2* i egzona 8 *SMN1*. Među SMA pacijentima nađene su i druge kombinacije hibridnih gena (slika 11) (Lefebvre i sar, 1995; Hahnen i sar, 1996b; van der Steege i sar, 1996; Wirth i sar, 1999).



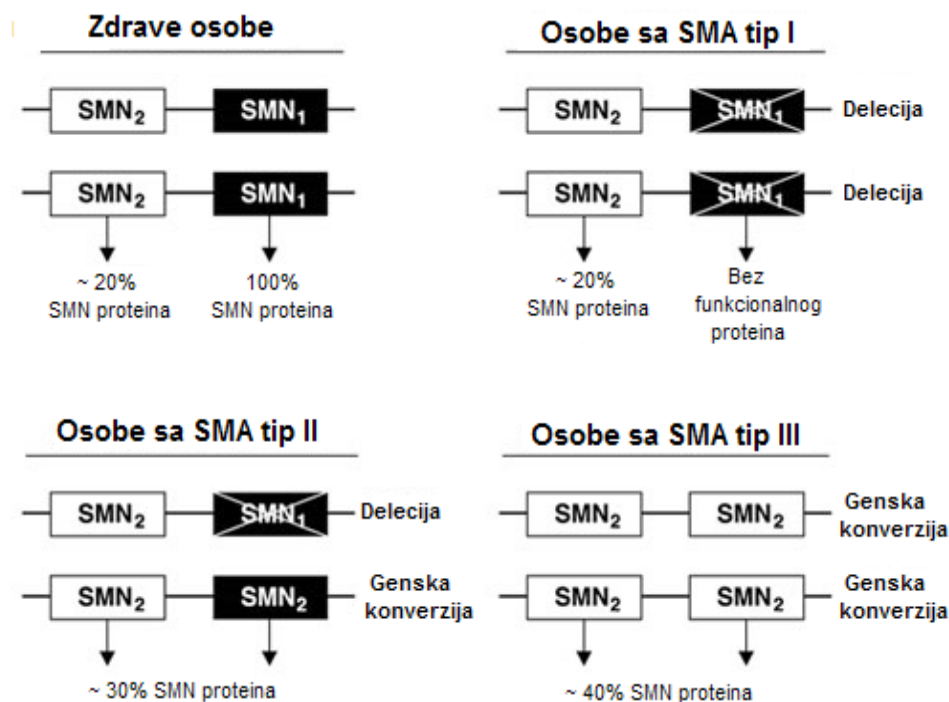
**Slika 11.** Grafički prikaz tri tipa hibridnog gena *SMN* nađenih kod SMA pacijenata i kontrola (izvor: Hahnen i sar,1996b )

Upravo genska konverzija između *SMN1* i *SMN2* kopije gena se smatra glavnim mehanizmom koji dovodi do velike varijabilnosti SMA regiona. Danas se zna da se ona može odigrati u oba smera i dovesti do povećanja u broju kopija bilo gena *SMN1* ili *SMN2* sa istovremenim smanjenjem broja kopija *SMN* duplikata na jednom hromozomu<sup>41</sup> (Ogino i sar, 2003; Chen i sar, 2011). Varijabilnost u broju kopija gena *SMN2* pokazana je u mnogim studijama, kao i promenljiv broj *SMN1* kopija: većina SMA pacijenta nema ni jednu *SMN1* kopiju, većina nosilaca ima jednu kopiju, dok zdrave osobe koje nisu nosioci mogu da imaju 2-4 kopije (Campbell i sar, 1997; McAndrew i sar, 1997; Burghes, 1997; Wirth i sar, 1999; Ogino i Wilson, 2004a).

41 Kada se *SMN1* konvertuje u *SMN2* nastaje SMA hromozom sa povećanim brojem *SMN2* kopija uz redukciju *SMN1* kopije. Kada se *SMN2* konvertuje u *SMN1*, nastaje normalan hromozom sa dva gena *SMN1* na jednom hromozomu, a sa redukovanim brojem *SMN2*.



Smatra se da različiti mehanizmi leže u osnovi gubitka gena *SMN1* kod različitih tipova SMA (slika 12): dok većina SMA pacijenata tipa I nosi pravu homozigotnu deleciju gena *SMN1*, većina pacijenata tipa II i III pokazuje (bilo na jednom ili na oba 5q13-homologa) homozigotno odsustvo gena *SMN1* kao rezultat genske konverzije *SMN1* u *SMN2*, dovodeći, kao što je već naglašeno, do porasta u broju kopija gena *SMN2* (Wirth i sar, 2006).



Slika 12. Šematski prikaz tipova mutacija i najučestalijih SMA hromozoma kod različitih tipova SMA (izvor: <http://www.jpmed.com.br/conteudo/10-86-04-261/ing.asp?cod=2101>)

Ono što dodatno doprinosi genetičkoj kompleksnosti SMA je visoka stopa *de novo* nastalih mutacija u genu *SMN1* (~2%) koja je uzrok visoke učestalosti heterozigotnih nosilaca u opštoj populaciji i pored velike smrtnosti obolelih (Ogino i Wilson, 2004a). Pericentrična lokacija i složena struktura regiona, kao i gore opisani mehanizmi su uzrok postojanja ove visoke stope. Većina opisanih *de novo* mutacija su delecije paternalnog porekla. Međutim nepoznat je razlog zašto su paternalne delecije ( $2,11 \times 10^{-4}$ ) učestalije od maternalnih ( $4,15 \times 10^{-5}$ ). Genska konverzija kao *de novo* događaj je bila opisana u retkim slučajevima (Wirth, 2002).

## 1.7 Genotip-fenotip korelacija

Na nivou gena *SMN1* nije moguće uspostaviti fenotip-genotip korelaciju s obzirom da je on deletiran kod većine pacijenta nezavisno od tipa. Ovaj podatak sugerira da, iako je genska osnova same bolesti u većini slučajeva ista, dodatni genetički mehanizmi su uključeni u modifikaciju SMA fenotipa. Mnogobrojna savremena istraživanja se bave ovom problematikom, jer identifikacija gena modifikatora može dovesti do novih terapijskih strategija, promeniti tok bolesti i eventualno ukazati na mogućnost njene prevencije u slučajevima homozigotnog odsustva gena *SMN1*. Međutim, ni do danas nije do kraja rasvetljena molekularna osnova fenotipske varijabilnosti SMA.

### 1.7.1 Geni mapirani u 5q13 regionu i njihov uticaj na SMA fenotip

#### 1.7.1.1 Uticaj gena *SMN2* na SMA fenotip

U populaciji zdravih ljudi broj kopija gena *SMN2* varira od 1 do 4 (retko dostiže 8 kopija). Pored toga, približno 10%-15% zdravih osoba nemaju ni jednu *SMN2* kopiju što je i ukazalo na činjenicu da ova kopija gena nije odgovorna za nastanak SMA. Prisustvo barem jednog potpuno funkcionalnog gena *SMN1* je dovoljno za normalno funkcionisanje proteina (Wirth, 2000)

Međutim, na osnovu rezultata nekoliko studija, korišćenjem različitih metoda, ustanovljena je jasna korelacija između broja *SMN2* kopija i težine kliničke slike SMA pacijenata. Danas je prihvaćeno da je to glavni faktor koji utiče na težinu SMA fenotipa (Melki i sar, 1994; DiDonato i sar, 1994; Campbell i sar, 1997; McAndrew i sar, 1997; Wirth, 2000).

Kao što je opisano mehanizam koji stoji u osnovi nastanka povećanog broja *SMN2* kopija i redukcije ili odsustva gena *SMN1* kod blažih SMA oblika je genska konverzija. Zbog toga što svaka *SMN2* kopija produkuje oko 10% FL-*SMN2* transkripata, povećan broj gena *SMN2* delimično nadomešćuje nedostatak funkcionalnog transkripta, ublažava simptome kod SMA pacijenata i na taj način utiče na težinu kliničke slike.

Većina SMA pacijenata tip I nosi 1 ili 2 *SMN2* kopije, tip II SMA pacijenata 3 *SMN2* kopije, tip IIIa SMA pacijenata 3 *SMN2* kopije, tip IIIb SMA pacijenata 4 *SMN2* kopije. Osobe koje nose 5 ili 6 *SMN2* kopija razvijaju veoma blage SMA simptome (tip

IV SMA), dok 8 *SMN2* kopija u potpunosti štiti od razvoja bolesti (Wirth i sar, 2006). Pored toga opisana su tri retka slučaja asimptomatskih osoba sa homozigotnom delcijom *SMN1*. Kod svakog od ovih pacijenata bilo je prisutno 5 kopija *SMN2* (Prior i sar, 2004). Analize FL-*SMN2* naspram *SMN2Δ7* transkripata SMA pacijenta tipa I-III pokazuju sledeće odnose — 20: 80 u tipu I, 30:70 u tipu II i 40:60 u tipu III. Na nivou proteina, znatne razlike su uočene posebno kada se porede SMA pacijenti tip I i II sa tipom III i zdravim kontroloma.

Studije na animalnim modelima su takođe ukazale da povećan broj kopija *SMN2* ublažava fenotip bolesti. Svi ovi rezultati zajedno podržavaju napore za stvaranje potencijalnih terapijskih pristupa, koji kroz povećavanje *SMN2* ekspresije imaju za cilj ublažavanje težine simptoma bolesti.

#### 1.7.1.2 Uticaj gena *NAIP*, *BTF2p44* i *H4F5* na SMA fenotip

Iako je uspostavljena značajna korelacija između broja kopija gena *SMN2* i fenotipa SMA pacijenata, ona nije apsolutno linearna, što ukazuje na činjenicu da postoje i drugi faktori koji mogu modifikovati kliničku ekspresiju bolesti. Kao što je već opisano, 5q13 duplicirani region pored *SMN* sadrži i gene *NAIP*, *BTF2p44* i *H4F5*. Slično genu *SMN*, koji je obično prisutan u najmanje dve kopije po hromozomu i svi drugi geni lokalizovani u SMA regionu su prisutni u nekoliko kopija, čiji broj može da varira od 0 do 4 po hromozomu. Iako su najučestalije delecije gena *SMN1*, telomerne kopije i ostalih gena iz 5q13 regiona mogu biti homozigotno delecirane kod SMA pacijenta. Nekoliko studija je pokazalo da postoji korelacija između veličine delecije, koja osim *SMN* obuhvata i druge gene u 5q13 regionu i težine bolesti (Melki i sar, 1994; Wirth i sar, 1995; Rodrigues i sar, 1996). Na osnovu ovih rezultata pretpostavlja se da *H4F5*, *NAIP* i *BTF2p44* najverovatnije mogu biti geni modifikatori fenotipa SMA.

Gen *NAIP(BIRC1)*<sup>42</sup> (MIM#600355) se nalazi na hromozomu 5q13.1 i to 16,5 kb nizvodno od *SMN* i sastoji se od 15 egzona (Roy i sar. 1995). Ovaj gen je odgovoran za sintezu proteina od 1404aa, koji pripada familiji IAP<sup>43</sup> proteina čoveka. Pored funkcionalnog proteina NAIP takođe je nađen i alternativno obrađen transkript koji kodira

42 Sinonim gena je *BIRC1*— eng. *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein 1*— bakuloviralni inhibitor ponavljanja apoptoze koji sadrži protein 1

43 IAP—eng. *inhibitor of apoptosis protein*—protein inhibitor apoptoze

različite proteinske izoforme. Protein NAIP se ekspimiru u motornim neuronima i inhibira apoptozu *in vitro* i *in vivo* indukovanu različitim signalima, ali tačan mehanizam njegovog delovanja do danas nije objašnjen.

Danas se zna da je gen *NAIP* prisutan u SMA regionu u više kopija (pseudogena) — u opštoj populaciji je identifikovan jedan kompletan *NAIP* (telomerni) i nekoliko skraćenih kopija *NAIP $\psi$*  koji nemaju dva kodirajuća egzona (egzon 5 i 6) i najverovatnije nastaju nezavisno od invertovane duplikacije (Roy i sar, 1995).

Funkcionalna uloga gena *NAIP* u SMA patogenezi još nije razjašnjena. Gen *NAIP* je deleciran kod SMA pacijenata, ali takođe i kod 2% zdravih nosilaca, pa stoga njegov gubitak nije dovoljan da dovede do razvoja bolesti. Sa druge strane, mnogobrojne studije koje su uključivale simultano praćenje delecija gena *SMN* i *NAIP*, otkrivaju da se rearanžmani koji uključuju oba gena češće sreću kod pacijenata sa težim oblikom SMA. Prema studiji Roy i saradnika egzon 5 ovog gena (kod zdravih ljudi jedino prisutan u kompletnoj telomernoj kopiji) je homozigotno deletiran kod približno 50% SMA tip I i oko 18% SMA tip II i III pacijenata (Roy i sar, 1995). U skladu sa tim rezultatima, zaključuje se da dok su delecije gena *SMN1* uzročnik bolesti, moguće je da je gen *NAIP* uključen u modifikaciju težine bolesti.

*BTF2p44(GTF2H2)*<sup>44</sup> (MIM#601748) je još jedan gen mapiran u 5q13 regionu i takođe postoji u najmanje dve kopije — telomerna (*p44t*), locirana blizu SMA kritičnog regiona i centromerna (*p44c*) kopija (Humbert i sar, 1994; Van der Steege i sar, 1995, Carter i sar, 1997). Obe genske kopije kodiraju protein p44, ali različite aminokiselinske sekvence. Ovaj protein predstavlja subjedinicu bazalnog transkripcionog faktora TFIIH (BTF2). Transkripcioni faktor TFIIH je multifunkcionalan proteinski kompleks sastavljen od više subjedinica, koji je uključen u procese bazalne transkripcije RNK polimerazom II, popravku DNK i kontrolu ćelijskog ciklusa (Hoeijmakerset i sar, 1996). Pored toga poznato je da mutacije dve TFIIH subjedinice (p89 i p80) rezultuju u autozomno recesivnim poremećajima popravke DNK koji oštećuju multipne sisteme i pokazuju izraženu neurološku disfunkciju (kseroderma pigmentozum, Cockayneov sindrom ili rihotiodistrofija) (Bootsma and Hoeijmakers, 1993).

---

44 Sinonim gena je *GTF2H2*— eng. *general transcription factor IIIH subunit 2* – subjedinica 2 opšteg transkripcionog faktora IIIH

Prilikom poređenja kliničkih podataka grupe SMA pacijenata sa njihovim genotipom, koristeći simultanu analizu gena *SMN*, *NAIP* i *p44* detektovana je velika delecija koja obuhvata ove lokuse kod većine SMA tip I pacijenata (68%). Ovi rezultati ukazuju na to da gen *p44t* može biti uključen u veliki genomski rearanžman prisutan u najtežoj formi bolesti (Burlet i sar, 1996; Rodrigues i sar, 1996; Burglen i sar, 1997). Međutim i manji rearanžmani mogu rezultovati nastankom teško oblika bolesti, dok je gubitak ili oštećenje gena *p44t* na oba hromozoma takođe uočen kod nekih roditelja i kontrola bez očiglednog fenotipskog efekta (Burglen i sar, 1997; Burlet i sar, 1996).

Pored toga i na nivou proteina se pokreće pitanje funkcionalne razlike TFIIH kompleksa koji sadrže bilo *p44c* ili *p44t* ili oba polipeptida. Kod SMA tip I kojima nedostaje gen *p44t* na oba hromozoma, produkt gena *p44c* je naizgled dovoljan da održava *in vitro* osnovnu transkripciju. Ipak zbog razlike u aminokiselinskim sekvencama, neophodna su dodatna istraživanja, da bi se procenila razlika u uticaju ove dve proteinske varijante, ukoliko postoji, na osnovne ili druge regulatorne funkcije TFIIH kompleksa (Burglen i sar, 1997).

Dosadašnji podaci ukazuju na činjenicu da *p44t* rearanžmani samostalno nisu kritični za razvoj SMA. Međutim, povezanost između velike delecije ovog regiona i najtežeg oblika SMA može sugerisati da je težina kliničkih simptoma u vezi i sa *p44t* genskom varijantom, samostalno ili sa drugim faktorom(ima) modifikacije (Burglen i sar, 1997; Burlet i sar, 1996; Carter i sar, 1997).

Gen *H4F5(SERF1)*<sup>45</sup> (MIM#603011) je mapiran 6,5 kb uzvodno od egzona 1 obe *SMN* kopije, što ga čini bližim *SMN* od bilo kog drugog gena u SMA kritičnom regionu. Telomerna i centromerna kopija ovog gena su identične. Ekspimiran je u svim tkivima sa najvišim nivoom RNK u testisima. Postoji i alternativno obrađeni transkript koji je duži (nastaje alterativnom obradom egzona 3) i nasuprot kraćoj izoformi transkript se pretežno nalazi u srcu, mozgu i skeletnim mišićima. Obe izoforme se ekspimiraju u centralnom nervnom sistemu uključujući kičmenu moždinu koja je primarno oštećena kod SMA. Međutim, nejasno je da li se alternativna obrada dešava na obe kopije gena. Gen *H4F5* je veoma konzerviran među sisarskim vrstama i specifična struktura njegovog genskog produkta ukazuje na moguću ulogu ovog proteina u vezivanju nukleinskih kiselina. Protein *H4F5* takođe ima homologiju sa jednom klasom proteina koji su kao i protein *SMN* zajedno lokalizovani sa snRNP i drugim komponentama u ćeliji i služe za obradu

45 Sinonim gena je *SERF1*— engl. *small EDRK-rich factor 1*

primarnih transkripata. Međutim tačna funkcija ovog proteina se još uvek ne zna (Scharf i sar, 1998).

Scharf i saradnici su otkrili deleciju mikrosatelitnog markera C212, koji je prisutan u multipnim kopijama u poslednjem intronu gena *H4F5* kod SMA tip I hromozoma, ukazujući na mogućnost da ovaj gen može biti kandidat za modifikator fenotipa kod SMA. Analiziran je broj kopija ovog markera među SMA pacijenatima različitog Evropskog i Arapskog porekla. Pronađena je redukcija ili odsustvo C212/*H4F5* alela kod 94% hromozoma, što odgovara deleciji jednog ili obe kopije ovog markera, samim tim i deleciji gena *H4F5* kod ovih osoba (Scharf i sar, 1998).

Izneti podaci sugerišu da je gen *H4F5* deletiran sa istom učestalošću kao gen *SMN1* kod SMA tip I pacijenata kao i da je učestalost delecija C212/*H4F5* u različitim SMA populacijama u korelaciji sa težinom bolesti. Zbog činjenice da je poslednji egzon gena *H4F5* 5kb bliži gena *SMN* od C212 markera, detektovane učestalosti delecija C212 mogu zapravo biti niže od pravih učestalosti delecija gena *H4F5* kod SMA tip I pacijenata (Scharf i sar, 1998).

### 1.7.2 Potencijalni faktori modifikacije SMA fenotipa van 5q13 regiona

Iako se činilo da traganje za mehanizmom koji leži u osnovi različite ekspresije bolesti treba sprovoditi u okviru dinamične strukture SMA regiona opisani su retki slučajevi kada rođena braća i sestre sa identičnim *SMN1* mutacijama, identičnim brojem kopija gena *SMN2* i identičnim 5q13 haplotipovima pokazuju značajne fenotipske razlike. One se kreću od razvijanja bolesti do potpuno zdravih osoba, što govori u prilog tome da postoje i drugi modifikujući geni koji nisu povezani sa hromozomom 5q13. U ovom kontekstu, između ostalog, razmatran je pol pacijenata — osim u par slučajeva, većina zdravih osoba sa *SMN1* delecijom su ženskog pola (Jedrzejowska i sar, 2009). Pored toga postoji značajno odstupanje među ženskim polom u SMA tip III porodicama od očekivanog segregacionog odnosa od 25% (Wirth, 2006). Helmken i saradnici su 2003. godine pokazali da potencijalni faktor modifikacije reguliše bilo stopu translacije ili stabilnost proteina SMN, jer zdrave individue sa homozigotnom *SMN1* delecijom pokazuju značajno više proteina SMN u poređenju sa svojim bolesnim bratom/sestrom. Slične razlike su nađene i za *SMN1*-interagujuće proteine<sup>46</sup> (Wirth, 2006).

---

46 Pokazano je da razlike u količini *splicing* faktora mogu omogućiti povećanje ekspresije FL transkripta sa *SMN2* i samim tim imaju udela u regulisanju fenotipskih varijabilnosti

## 1.8 Dijagnostika SMA

### 1.8.1 Klinička dijagnostika

Inicijalni korak u dijagnostikovanju SMA počinje uočavanjem slabljenja snage deteta i loših motornih sposobnosti. Ispitivanje kliničkih znakova (proksimalna mišićna slabost, podrhtavanje jezika i prstiju, gubitak tetivnih refleksa) je veoma važno i obično dovodi do dijagnoze SMA. Međutim zbog činjenice da se i druge neuromišićne bolesti mogu javiti sa istim simptomima i pokazati iste fizičke karakteristike, neophodna su dodatna dijagnostička ispitivanja. Za postavljanje dijagnoze SMA, osim kliničke slike, sprovodi se i analiza serumskih enzima, elektromiografija, merenje brzine provodljivosti neurona, mišićna biopsija (Crawford, 1996; Nigro, 2005; Kostova i sar, 2007; Wang i sar, 2007).

#### 1.8.1.1 Serumski enzimi

Pored uobičajenih laboratorijskih ispitivanja najznačajnija je analiza enzima kreatinfosfokinaze (CPK<sup>47</sup>). Na osnovu CPK nalaza može se razlikovati SMA od mišićne distrofije. Kod distrofije CPK je veoma visok, dok deca sa SMA imaju normalni ili blago povišeni CPK nivo: kod SMA tip I enzim je neizmenjen, a promene se mogu uočiti kod blažih formi SMA (Crawford, 1996; Nigro, 2005; Kostova i sar, 2007; Wang i sar, 2007).

#### 1.8.1.2 Elektromiografija (EMG)

Ovaj test proverava stanje mišića i nerava koji ih kontrolišu. EMG nalaz kod SMA ukazuje na neuropatsku leziju, denervaciju mišića bez i jednog znaka senzorne denervacije<sup>48</sup> i smanjenu amplitudu akcionog potencijala motoneurona, koji je polifaznog oblika i produženog trajanja. Javljaju se denervacione aktivnosti-fibrilacija, fascikulacija i pozitivni oštri talasi. Nalaz zavisi od nivoa i stepena lezije i faze oboljenja. Takođe se uočava i gubitak motornih jedinica tokom progresije bolesti (Buchthal i Olsen, 1970; Hausmanowa-Petrusewicz i Karwańska, 1986).

---

47 CPK – eng. creatine phosphokinase

48 Mišić je izgubio nervno napajanje zbog nefunkcionisanja motornog neurona

### 1.8.1.3 Merenje brzine provodljivosti neurona (NCV<sup>49</sup>)

Ovaj test služi za određivanje brzine kojom se kreću električni signali kroz nerv i koristi se za dijagnostiku oštećenja ili potpunog uništenja nerva kao i za procenu bolesti nerava ili mišića, uključujući miopatije. NCV je povezan sa dijametrom i stepenom mijelinizacije nerva. Ispitivanja kod SMA pacijenata obično beleže normalne motorne i senzorne brzine provodjenja (Crawford, 1996; Nigro, 2005; Kostova i sar, 2007; Wang i sar, 2007).

### 1.8.1.4 Mišićna biopsija

Iako mišićna biopsija može biti veoma specifična za SMA (dolazi do karakterističnih promena na osnovu kojih je moguće razdvojiti SMA od primarnih mišićnih oboljenja), mnogi stručnjaci je, zato što je bolna i složena procedura, odlažu dok klinička dijagnoza, EMG nalazi i genetički testovi ne potvrde dijagnozu SMA. Histološki nalaz zavisi od stadijuma progresije bolesti i potvrđuje denervaciju mišićnih vlakana i kasniju reinervaciju. Mišićna biopsija otkriva atrofiju grupe tip 1 i tip 2 mišićnih vlakana sa povremenim razbacanim veoma hipertrofiranim mišićnim vlaknima tipa 1. Uočavanje grupnih atrofija je često. Nasuprot tome uočava se i tipsko grupisanje mišićnih vlakana što indikuje reinervaciju. Postoje i znaci mišićne nezrelosti sugerišući zastoj u razvoju mišića (Crawford, 1996; Nigro, 2005; Kostova i sar, 2007; Wang i sar, 2007).

## **1.8.2 Molekularna dijagnostika**

Navedeni klinički testovi su se koristili u prošlosti za postavljanje dijagnoze SMA, a danas se koriste jedino ako molekularno genetička ispitivanja pokažu prisustvo normalnog gena *SMN1*. Otkrićem ovog gena, čija mutacija dovodi do razvoja bolesti, omogućeno je rano dijagnostikovanje SMA jednostavnim i pouzdanim molekularnim testom iz krvi obolelog deteta. Genetičke analize su omogućile postavljanje tačne dijagnoze SMA, čak i u onim slučajevima kada to na osnovu kliničke slike nije bilo moguće.

---

49 NCV— eng. *nerve conduction velocities* – brzina provodljivosti neurona

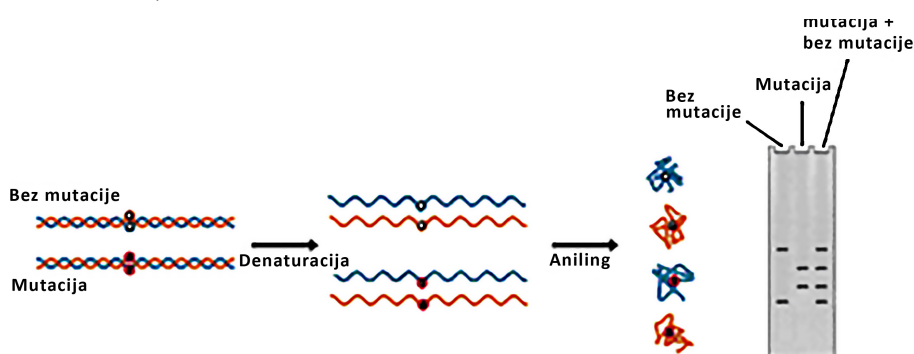


### 1.8.2.1 Detekcija homozigotne delecije gena *SMN*

Prvi korak u molekularnoj dijagnostici SMA je detekcija homozigotne delecije gena *SMN1* kao najučestalije mutacije kod ovih pacijenata. Sve metode koje se koriste sa ovim ciljem se baziraju na prepoznavanju nukleotidnih razlika u egzonima 7 i 8 *SMN* genskih kopija i danas se rutinski primenjuju dve.

Prva metoda je konformacioni polimorfizam jednolančane DNK (SSCP<sup>50</sup>) sa prajmerima opisanim kod Lefebre i saradnika (Lefebre i sar, 1995). Zasniva se na različitom putovanju jednolančanih DNK fragmenata. Sekvenca koja se analizira se prvo umnožava PCR reakcijom, a zatim denaturiše. Kada se dva jednolančana komplementarna molekula (koja nastaju denaturacijom DNK fragmenta) analiziraju na elektroforezi u nendenaturišućem poliakrilamidnom gelu (PAGE<sup>51</sup>), oni zauzimaju različitu konformaciju usled intralančanih interakcija (slika 13). Ove interakcije i finalna konformacija DNK lanaca zavise od njihove bazne sekvence. Samo jedna nukleotidna promena će promeniti konformaciju jednolančane DNK i modifikovati trodimenzionalni oblik lanca što će uticati na njegovo kretanje duž gela.

Osetljivost metode zavisi od uslova elektroforeze, temperature, prisustva glicerola, veličine fragmenta (što je manji, lakše se detektuje mutacija). Vizuelizacija jednolančanih DNK fragmenata se sprovodi bojenjem srebrom. Ovom metodom je moguće detektovati razliku u sekvenci od 1 nukleotida. Senzitivnost testa od 95% se postiže na fragmentima manjim od 250bp. Metoda je veoma jednostavna, a zahteva poređenje sa normalnim alelima kako bi se uočilo eventualno odstupanje traka u analiziranom uzorku (Orita i sar, 1989).



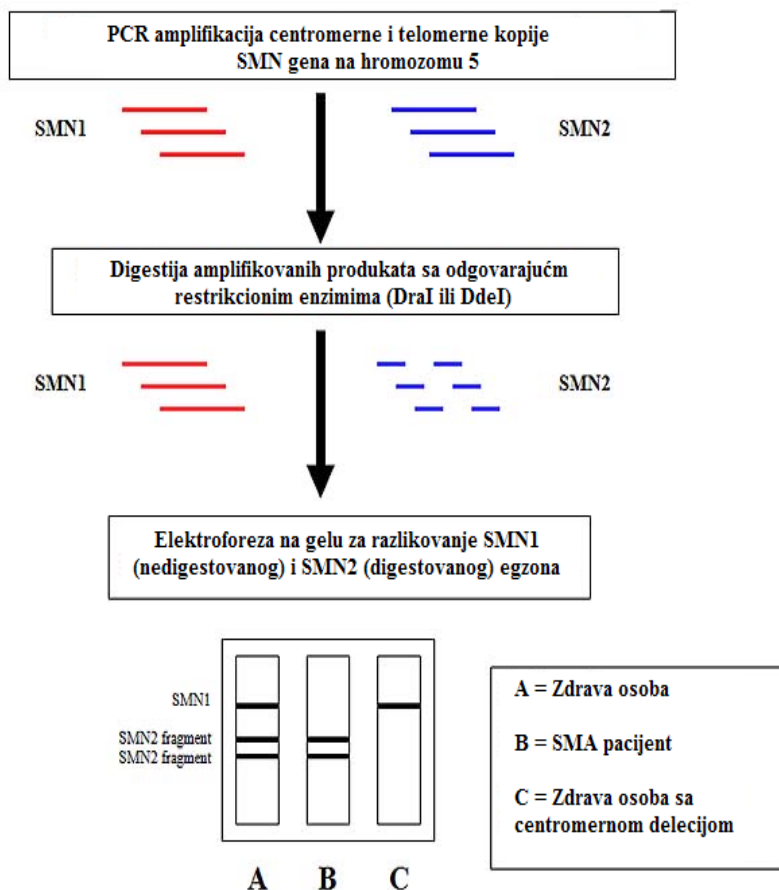
Slika 13. SSCP analiza

(izvor: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/sscp-analysis>)

50 SSCP — engl. *Single Strand Conformation Polymorphism* — konformacioni polimorfizam jednolančane DNK

51 PAGE — eng. *Polyacrylamide gel electrophoresis*— elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Druga metoda je bazirana na PCR-u i polimorfizmu dužine restrikcionih fragmenata (PCR/RFLP<sup>52</sup> metoda), Jednostavna je, brza i trenutno mnogo zastupljenija u rutinskoj dijagnostici (van der Steege i sar, 1995; Wirth i sar, 1999). Genomska DNK se podvrgava PCR umnožavanju egzona 7 i 8 centromerne i telomerne *SMN* genske kopije. PCR produkti sa svakog od ovih egzona individualno se ispituju digestijom sa adekvatnim restrikcionim enzimom (slika 14).



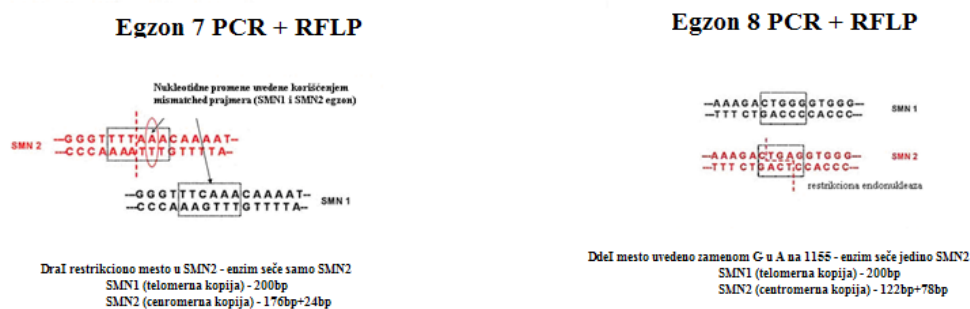
Slika 14. Princip PCR/RFLP metode  
(izvor: <http://path.upmc.edu/cases/case490.html>)

PCR produkti egzona 8 dve *SMN* genske kopije se mogu lako razlikovati s obzirom da centromerna (*SMN2*) kopija sadrži mesto prepoznavanja restrikcionog enzima *DdeI* koje je odsutno u egzonu 8 telomerne kopije (G>A<sup>53</sup>). S obzirom da ne postoji

52 RFLP— eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*— polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

53 A nukleotid lociran na poziciji 1155 cDNK gena *SMN2*

prirodno restrikciono mesto enzima u egzonu 7, koriste se *mismatched*<sup>54</sup> prajmeri za specifično uvođenje nukleotidne razlike u PCR reakciji (uvodi se promena G u A<sup>55</sup>). Uvedena nukleotidna promena u kombinaciji sa nativnom, već postojećom razlikom od jednog nukleotida<sup>56</sup> stvara mesto sečenja za enzim DraI u *SMN2* PCR produktu (alternativa je digestija Hinf I enzimom, koji seče *SMN1*) i na taj način pravimo razliku između produkata ova dva skoro identična gena (slika 15). Ovako dobijeni fragmenti se potom razdvajaju na agaroznom gelu i vizuelizuju bojenjem bojama koje se vezuju za DNK.



Slika 15. Mesta sečenja restrikcioničkih enzima u genu *SMN*

(izvor: <http://path.upmc.edu/cases/case490.html>)

Ovi direktni, jednostavni i brzi testovi, zasnovani na PCR metodi, omogućavaju ranu potvrdu klinički postavljene dijagnoze kao i ranu prenatalnu dijagnozu. Senzitivnost metoda je visoka s obzirom da ~94% SMA pacijenata ima homozigotnu deleciju gena *SMN1* i mogu se detektovati korišćenjem opisanih testova. Međutim, s obzirom da se ovim testovima ne kvantifikuje broj kopija gena, pacijenti bez homozigotne delecije se ne mogu dijagnostikovati. Ne može se detektovati heterozigotni gubitak gena *SMN1* jer će prisutna 1 kopija gena dati PCR produkt. Iz istih razloga se ne mogu detektovati ni zdravi heterozigotni nosioci delecije i razlikovati od zdrave osobe sa dve kopije (Ogino and Wilson, 2002; Smith i sar, 2007).

54 Eng. *mismatched* — neusklađeni

55 na poziciji 875 cDNA

56 Promena G>A kreira DraI mesto (TTTAAA) u *SMN2* kopiji. Treći T nukleotid iz sekvence se nalazi samo u genu *SMN2* dok je C u genu *SMN1*, tako da enzim seče samo *SMN2* amplifikovane PCR produkte

### 1.8.2.2 Detekcija homozigotne delecije gena *NAIP*

S obzirom na svoju ulogu u inhibiranju ćelijske apoptoze i činjenici da je mapiran u SMA kritičnom regionu blizu gena *SMN*, gen *NAIP* je među prvima bio povezivan sa različitom ekspresijom bolesti, tj. kao potencijalni gen modifikator. Stoga u rutinskoj dijagnostici, pored delecija gena *SMN* paralelno se ispitalo i prisustvo/odsustvo homozigotne delecije gena *NAIP* kod SMA pacijenata. U ove svrhe se koristi metoda bazirana na PCR reakciji kojom se detektuje homozigotna delecija egzona 5 (kao jedinog egzona prisutnog u kompletnoj, funkcionalnoj kopiji gena *NAIP*) kroz odsustvo PCR produkta analizom na agaroznom gelu (Roy i sar, 1995).

### 1.8.2.3 Određivanje broja kopija gena u 5q13 regionu

Ukoliko pacijent nema homozigotnu *SMN1* deleciju neophodno je koristiti kvantitativne analize za određivanje broja kopija gena, radi razlikovanja pacijenata sa jednom ili više kopija. Ovim pristupom senzitivnost testa značajno raste i dostiže ~ 99,7% jer je detekcijom jedne kopije gena *SMN1* omogućena dijagnostika pacijenata heterozigotnih nosilaca delecije jednog *SMN1* alela i moguće tačkaste mutacije na drugom alelu. Na ovaj način se identifikuju pacijenti za dodatne analize koje se ne rade rutinski, kao što je sekvenciranje kodirajućih regiona gena *SMN1* ili analiza iRNK sa *SMN1* i *SMN2*. Kod pacijenata sa 2 (ili više) kopija *SMN1* dijagnoza SMA vezane za 5q13 region se praktično može isključiti, osim u slučajevima konsangviniteta u porodici.

Drugi veliki značaj kvantitativnih testova leži u činjenici da oni omogućavaju identifikaciju zdravih nosilaca SMA mutacije (Wirth, 2000). Pored detekcije mutacija kod probanda, u cilju preciznog izračunavanja individualnog rizika i planiranja prenatalne dijagnostike, kao još uvek jedinog vida prevencije bolesti, neophodno je određivanje statusa nosioca roditelja i bliskih rođaka obolelog člana porodice. Ranije se status nosioca određivao praćenjem nasledjivanja vezanih markera. Ova dijagnostika pored toga što je indirektna, zahteva DNK uzorke obolelog deteta i dodatnih članova porodice koji nisu uvek dostupni.

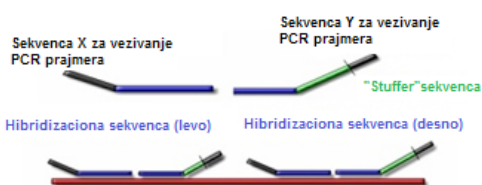
Pored određivanja broja kopija gena *SMN1* ovaj pristup je značajno primeniti i za druge gene prisutne u SMA kritičnom regionu, s obzirom na moguću ulogu ovih gena u modifikaciji fenotipa pacijenata.

Do danas je razvijeno nekoliko različitih metoda za direktno analiziranje broja kopija gena (McAndrew i sar, 1997; Chen i sar, 1999; Wirth i sar, 1999; Gerard i sar, 2000; Scheffer i sar, 2000; Feldkotter i sar, 2002; Anhuf i sar, 2003; Su i sar, 2005). Međutim

najširu primenu poslednjih godina ima MLPA<sup>57</sup> tehnika. Ona se danas smatra zlatnim standardom u molekularnoj dijagnostici SMA, pružajući lak i brz sistem za analizu SMA regiona kod obolelih, kao i za detekciju zdravih nosilaca.

MLPA je multipleks PCR test koji u jednoj reakciji analizira čak do 50 različitih DNK sekvenci (uglavnom egzoni specifičnih gena), za koje se procenjuje relativan broj kopija. Karakteristika MLPA je da se ne umnožava ciljna sekvenca, već MLPA probe koje se hibridizuju za nju. Nasuprot standardnom multipleks PCR-u ovde se koristi jedan par PCR prajmera za MLPA umnožavanje. Svaka proba se sastoji iz dve polu-probe (5' i 3' polu-probe). One sadrže sekvence specifične za ciljnu sekvencu i univerzalnu sekvencu prajmera, omogućavajući istovremeno multipleks PCR umnožavanje svih proba. Pored toga, jedna ili obe polu-probe sadrže i sekvence koje omogućavaju razlikovanje dužine same probe tokom elektroforeze (tzv. „*stuffer*” sekvence) i samim tim razlikovanje veličine produkata umnožavanja. Dobijeni produkti umnožavanja komercijalno kreiranih setova proba se kreću između 130 i 480 nt dužine i mogu se analizirati kapilarnom elektroforezom. Upoređivanjem šeme dobijenih pikova sa šemom dobijenom sa referentnog uzorka detektuju se sekvence koje pokazuju aberantan broj kopija. Metoda se sastoji iz četiri koraka (slika 16) (MRC-Holland).

1. Denaturacija i hibridizacija



DNK se denaturiše i inkubira sa mešavinom MLPA proba  
Dva oligonukleotida iz proba hibridizuju neposredno uz ciljne sekvence

2. Ligacija



Samo kada oba oligonukleotida sa proba hibridizuju za njihove ciljne sekvence  
mogu biti spojeni tokom ligacione reakcije

3. PCR sa univerzalnim prajmerima X i Y



Samo spojene probe će biti eksponencijalno amplifikovane tokom PCR reakcije

4. Analiza fragmenata



Broj ligacionih produkata probe je mera za za broj ciljnih sekvenci u uzorku  
Produktioi amplifikacije se razdvajaju korišćenjem kapilarne elektroforeze.

Slika 16. MLPA reakcija  
(izvor:<http://www.mlpa.com>)

57 MLPA — Eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – multipleks ligaciono zavisna amplifikacija proba

Primenom MLPA metode moguće je istovremeno analizirati različite sekvence u okviru i van SMA regiona. Ovakav pristup pruža i precizan kontrolni sistem, smanjujući rizik od lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Sa druge strane MLPA test nije u mogućnosti da detektuje *SMNI* tačkaste mutacije niti da otkrije prisustvo dve *SMNI* kopije na istom alelu (Stupia i sar, 2012).

Ključna tačka u korišćenju MLPA metode kao genetičkog testa u dijagnostici genskih delecija/duplikacija je interpretacija MLPA rezultata. Homozigotne ili hemizigotne delecije se jasno dokazuju kroz nedostatak specifičnog pika za ciljani gen, u prisustvu normalne amplifikacije kontrolnih proba. S druge strane, heterozigotne delecije i duplikacije proizvode različitu visinu i/ili površinu određenog pika i interpretacija ovih rezultata može biti otežana, zbog različite efikasnosti PCR reakcije za različite probe i varijacija od uzorka do uzorka. Kao posledica toga razvijene su različite metode za analizu MLPA podataka, koje omogućavaju pravilnu interpretaciju neobrađenih podataka reakcije. Među njima najviše se koristi softver *Coffalyser*, program baziran na *Excel*-u, koji u dva jednostavna koraka, kroz analizu DNK fragmenata i komparativnu analizu uzoraka, omogućava precizniju i lakšu obradu rezultata<sup>58</sup> (*Coffalyser.net*). Pored ovog, postoje i drugi softveri kreirani u iste svrhe (Stupia i sar, 2012).

#### 1.8.2.4 Detekcija tačkastih mutacija

Ukoliko je kod pacijenta dijagnostikovana jedna kopija gena *SMNI* indikovano je raditi analizu prisutne *SMNI* kopije u cilju identifikacije intragenske mutacije i konačne potvrde dijagnoze. U ove svrhe se koristi sekvenciranje gena *SMN*.

Razvijeno je više metode za određivanje tačnog redosleda baznih parova u segmentu DNK molekula, ali se najviše koriste one bazirane na Sangerovoj dideoksi metodi ili metodi terminacije sinteze koja koristi principe DNK replikacije (Sanger i sar, 1977). Metoda se prvobitno zasnivala na asimetričnoj PCR reakciji sa radioaktivno obeleženim nukleotidima, u kojoj se obično koristi jednolančani uzorak DNK kao početni „kalup”. Reakcija se završava inkorporacijom analoga nukleotida (2',3'-didezoksinukleozid-5'-trifosfati, ddNTPs<sup>59</sup>) koji ne dozvoljavaju dalju elongaciju DNK lanca. Kada se koristi

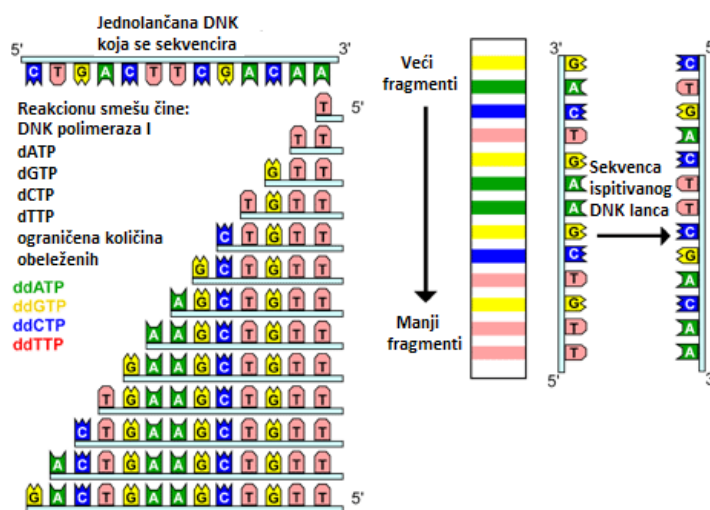
---

58 *Coffalyser* sprovodi sve korake normalizacije podataka i korekciju za opadanje dužine pikova odnosno intenziteta dužih proba (eng. *signal sloping*)

59 ddNTPs — eng. *DiDeoxyriboNucleotide TriPhosphate*— didezoksiribonukleozidtrifosfati

odgovarajuća smeša dNTPs<sup>60</sup> i jedan od četiri ddNTPs, enzimski katalizovana polimerizacija će se završiti na svakom mestu gde će se ddNTPs inkorporirati. Tako će se formirati produkti različite dužine koji se završavaju sa ddNTP na 3' — kraju koji se potom razdvajaju na elektroforezi. Četiri različite reakcije, svaka sa različitim ddNTPs, daće informaciju o kompletnoj sekvenci (slika 17).

Danas se koriste mnoge modifikacije ove metode i ona je skoro potpuno automatizovana i olakšana kombinovanjem sve četiri reakcije u jednoj, čineći ovaj proces efikasnijim. Metode nove generacije umesto radioaktivnih koriste fluorescentno obeležene ddNTP ili prajmere. Koriste se četiri različite boje i svaka od njih, kada se ekscitira, emituje jedinstvenu talasnu dužinu koja na produktu identifikuje 3' terminalni ddNTP kao A, C, G, ili T.



Slika 17. Sekvenciranje DNK

(izvor: [http://www.daviddarling.info/encyclopedia/D/DNA\\_sequencing.html](http://www.daviddarling.info/encyclopedia/D/DNA_sequencing.html))

Sekveciranjem se mogu identifikovati male intragenske delecije/insercije kao i *missense*, *nonsense*, *frameshift*, *splice site* mutacije. Ukoliko se direktnim sekvenciranjem gena *SMN* pronađe intragenska mutacija neophodno je proveriti da li se ona nalazi u *SMN1* ili *SMN2* kopiji. To zahteva dodatna ispitivanja metodama kao što je *long-range*<sup>61</sup> PCR ili subkloniranje koji omogućavaju specifičnu amplifikaciju i sekvenciranje pojedinačne kopije gena *SMN* (Parsons i sar, 1998; Wirth i sar, 1999; Clermont i sar, 2004).

60 dNTPs— eng. *DeoxyriboNucleotide TriPhosphate* — dezoksiribonukleozidtrifosfati

61 Eng. *long-range*— velikog dometa

## 1.9 SMA koje nisu vezane za 5q13 region

Postoje urođeni poremećaji motornih neurona koji nisu uzrokovani mutacijom gena *SMN*. Oni se ispoljavaju kroz ranu denervacionu slabost i uključuju neke simptome koji se preklapaju sa 5q-SMA, ali i kliničke karakteristike različite od 5q-SMA (tabela 1). Ovi atipični simptomi uključuju kontrakture, pre distalnu nego proksimalnu slabost, paralizu dijafragme sa ranim respiratornim poremećajima, i pontocerebelarnu degeneraciju. Nekoliko bolesti motornih neurona sa ispoljavanjem prvih simptoma kasnije u životu se preklapaju sa lakšim oblicima 5q-SMA. DNK testovi su dostupni za neke, ali ne za sve od ovih bolesti. Ako dete sa kliničkom slikom SMA nema *SMN1* deleciju, trebalo bi preispitati kliničku dijagnozu i uraditi dodatne dijagnostičke testove (Kolb i Kissel, 2011).

**Tabela 1.** Neke od formi SMA koje nisu uzrokovane mutacijom u genu *SMN*

SMA varijante	Nasleđivanje/lokus/gen	Klinička slika
Skapuloperonealna SMA	Autozomno dominantno/12q24.1-q24.31	Progresivna slabost skapuloperonealnih i laringealnih mišića
Pontocerebelarna hipoplazija sa SMA	Autozomno recesivna/VRK1	Cerebelarna i hipoplazija moždanog stabla, gubitak neurona u bazalnim ganglijama, kortikalna atrofija, rani početak bolesti (0-6 meseci)
X-vezana infantile SMA sa artrogripozom	X-vezana/Xp11.3-q11.2/ UBA1	Početak bolesti na rođenju ili kod novorođenih, kontrakture, rana smrt (manje od 2god.)
SMA sa respiratornim distresom tip 1	Autozomno recesivna/11q13.2-q13.4/ IGHMBP2	Rani početak bolesti (prva 3 meseca života), oštećenje u razvoju desne ili obe hemidiafragme, distalna slabost, kontrakture prstiju, "pes equines" deformitet stopala
Kongenitalna distalna SMA	Autozomno dominantna/12q23-q24	Rani početak bolesti sa kontrakturama, nije progresivna
Distalna SMA-V/ CMT2d	Autozomno dominantna/ 7p15 /GARS	Distalna SMA sa preovladavanjem gornjih ekstremiteta



## 2 CILJ RADA

Ciljevi ovog rada bili su:

*a) analize gena SMNI koja je obuhvatila:*

- detekciju homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI*, kao najčešće mutacije kod ovih pacijenata, primenom modifikovane PCR/RFLP metode u cilju postavljanja precizne molekularno genetičke dijagnoze
- ispitivanje učestalosti i distribucije detektovane homozigotne delecija gena *SMNI* u ispitivanom uzorku SMA pacijenata iz Srbije
- ispitivanje broja kopija gena *SMNI* MLPA metodom kod SMA pacijenata kod kojih prethodno navedenim analizama nije detektovana homozigotna delecija u ovom genu, a u cilju otkrivanja složenih heterozigotnih nosilaca sa delecijom jednog alela ovog gena i tačkastom mutacijom na drugom alelu
- direktno sekvenciranje egzona 6 gena *SMN* kod pacijenata sa dijagnostikovanom jednom telomernom kopijom ovog gena u cilju identifikacije intragenске mutacije koje se najčešće javljaju u ovom egzonu i konačne potvrde dijagnoze
- statistička obrada dobijenih podataka

*b) analize homozigotne delecije gena NAIP radi ispitivanja njene korelacije sa fenotipom pacijenata primenom:*

- PCR metode za umnožavanje egzona 5 gena *NAIP* na uzorku pacijenata na kojem je prethodno ispitivana homozigotna delecija gena *SMNI*
- PCR metode za umnožavanje egzona 5 gena *NAIP* na uzorku pacijenata na kojem je prethodno ispitivana homozigotna delecija gena *SMNI*

- ispitivanja učestalosti i distribucije detektovane delecije u uzorku SMA pacijenata iz Srbije
- komparativne analize homozigotne delecije gena *SMN1* i *NAIP* u cilju formiranja mogućih genotipova i analize njihove distribucije u odnosu na tip SMA radi korelacije veličine delecije sa fenotipskom ekspresijom bolesti
- statistička obrada dobijenih podataka

*c) analize broja kopija gena iz 5q13 regiona u grupi pacijenata sa homozigotnom delecijom gena *SMN1* i njihovog uticaja na fenotipsku ekspresiju bolesti primenom*

- MLPA metode za određivanje broja kopija gena *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* i ispitivanja njihove distribucije u odnosu na fenotip pacijenata (statistička obrada rezultata)
- MLPA metode za određivanje broja kopija gena *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* i ispitivanja njihove distribucije u odnosu na fenotip pacijenata (statistička obrada rezultata)
- komparativne analize broja kopija ispitivanih gena u cilju formiranja mogućih genotipova i njihove procentualne zastupljenosti kod različitih tipova SMA
- statistička obrada dobijenih podataka

*d) određivanja statusa heterozigotnih nosilaca *SMN1* delecije kod zdravih članova porodice obolelog pacijenta i davanja adekvatnog genetičkog saveta*

*e) prenatalne dijagnostike u porodicama u kojima postoji visok rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA*

## 3 MATERIJAL I METODE

### 3.1 Pacijenti

Za direktnu postnatalnu dijagnostiku homozigotnih delecija egzona gena *SMN1* PCR/RFLP metodom korišćena je genomski DNK izolovana iz limfocita periferne krvi 107 SMA bolesnika, pacijenata Neurološke službe Pedijatrijske klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ (IMD). Pacijenti su klasifikovani u određenu kategoriju SMA (tip I, II ili III) prema kriterijumima definisanim na internacionalnom konzorcijumu za spinalnu mišićnu atrofiju (Munsat and Davies, 1992). Pored ispitivane obolele dece ova analiza je obuhvatila i 100 kontrola (osobe bez porodične SMA anamneze). Pacijenti bez homozigotne delecije gena *SMN1*, kod kojih je ponovljena klinička dijagnoza potvrdila proksimalnu SMA, su dalje analizirani primenom MLPA metode za detekciju broja kopija gena *SMN1*. Kod pacijenata sa jednom telomernom kopijom gena *SMN* sekvenciran je egzon 6 ovog gena za detekciju intragenjskih mutacija.

Za ispitivanje varijabilnosti genotipa 5q13 regiona i njegove povezanosti sa fenotipskom ekspresijom bolesti prvo je na istom uzorku od 107 pacijenata i 100 kontrola analizirana homozigotna delecija gena *NAIP*. Nakon toga primenom MLPA metode je kod pacijenata sa prethodno dijagnostikovanom homozigotnom delecijom gena *SMN1* određivan broj kopija gena iz 5q13 regiona: *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5*. S obzirom na težinu bolesti i činjenicu da je kod većine ovakvih pacijenata došlo do letalnog ishoda tokom perioda koji je obuhvatila studija, ovu analizu je bilo moguće sprovesti kod 30 dostupnih ispitanika.

Studija je takođe uključila i uzorke periferne krvi 39 zdravih osoba sa porodičnom anamnezom SMA kod kojih je određivan broj kopija gena *SMN1*. Pacijenti kojima je bilo potrebno određivanje statusa heterozigotnih nosilaca *SMN1* delecije su obuhvatili: roditelje obolele dece, rođene sestre/braću, ujake/stričeve i partnere iz opšte populacije

koji planiraju potomstvo sa potencijalnim nosiocem. Parovima koji su planirali potomstvo izračunata je precizna procena rizika za dobijanje obolelog deteta u cilju donošenja adekvatne odluke za prenatalnu dijagnozu.

Istraživanje je obuhvatilo i 44 porodice iz Srbije sa prethodno obolelim SMA detetom ili sa porodičnom SMA anamnezom koje su se obratile Genetičkom savetovalištu IMD u cilju sprovođenja prenatalne dijagnostike.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Izolacija DNK

#### 3.2.1.1 Izolacija DNK iz limfocita periferne/fetalne krvi

Za ovu svrhu je korišćena izolacija DNK po metodi Millera iz 1988. godine, uz neznatne modifikacije koja se sastojala iz sledećeg (Miller i sar, 1988):

I dan

- uzorak periferne krvi (1ml antikoagulansa (4,5% EDTA/0,7%NaCl) sa 5-10ml krvi) je rastvoren u 10ml litičkog pufera, pH=7,4 (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA)
- inkubiran je zatim 30min na +4°C, pa centrifugiran (15min, 5000rpm, +4°C)
- supernatant je odbacivan, talog resuspendovan u 10ml litičkog pufera i centrifugiran (15min, 5000rpm, +4C). Postupak je ponovljen dva puta
- odbačen je supernatant, pa je talog resuspendovan u 12ml drugog litičkog pufera, pH=8,0 (10mM TrisHCl, 400mM NaCl, 2 mM EDTA), 140ml 10% proteinaza K i 800ml 10% SDS
- inkubiran je u vodenom kupatilu sa šejkerom na 37°C preko noći

II dan

- inkubiranje je nastavljeno u vodenom kupatilu sa šejkerom na 55°C, 60 min
- dodato je 4ml 6M NaCl, centrifugirano (15 min, 5000rpm, +4°C)
- supernatant je prebačen u novu epruvetu, centrifugiran pod istim uslovima

- supernatant je ponovo prebačen u novu epruvetu, dodato je 10ml apsolutnog etanola i precipitirana je DNK
- uzorak DNK je ispran u 70% etanolu i prebačen u sterilnu ependorf - epruvetu sa odgovarajućom količinom redestilovane vode
- uzorci su čuvani na +4°C ili -20°C

### 3.2.1.2 Izolacija DNK iz horionskih resica/kulture amnionskih ćelija

Za izolaciju DNK iz uzorka horionskih resica i kulture amnionskih ćelija korišćena je metoda koja se bazira na ekstrakciji uz pomoć fenola i hloroforma (Ausubel i sar, 1987). Amnionske ćelije za izolaciju DNK se mogu dobiti direktno iz punktata amnionske tečnosti. Zbog malog broja fetalnih ćelija izolovanih na ovaj način i prinos izolovane DNK je mali. Iz tog razloga obično se pristupa kultivisanju amnionskih ćelija u in vitro uslovima. Horionske resice se pre postupka izolacije prvo usitne i isperu u običnom medijumu cenrifugiranjem (2000 rpm, 10 min). Sledeći koraci za oba tipa uzorka su isti i obuhvataju:

- nakon cenrifugiranja supernatant je odbačen i dodato je 5ml CB rastvora (50mM TRIS, 100mM NaCl, 1mM EDTA), a zatim cenrifugirano (2000rpm, 10 min)
- supernatant je odbačen i talogu je dodato 1ml STE rastvora (0,1M NaCl, 10mM TRIS-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8), 50µl 10% SDS (pH 7,2) i 70 µl proteinaze K
- inkubirano je 2h na 55°C u vodenom kupatilu sa šejkerom
- nakon inkubacije materijal je raspodeljen u ependorf-epruvete i dodat je fenol u zapreminskom odnosu 1:1, zatim je cenrifugiran (12000 rpm, 10min)
- supernatant je prebačen u nove ependorf-epruvete i dodat je hloroform u zapreminskom odnosu 2:1, zatim je cenrifugiran (12000 rpm, 10min)
- supernatant je prebačen u nove ependorf-epruvete i dodat je 7,5M amonijumacetat (zapreminski odnos 2:1) i apsolutni etanol, zatim je centrifugiran (10min, 10000rpm)
- precipitirana DNK je rastvorena u odgovarajućoj količini redestilovane vode i čuvana na +4°C ili -20°C

### 3.2.2 PCR / RFLP metoda (detekcija homozigotnih delecija 7. i 8. egzona gena *SMNI*) –postnatalna i prenatalna dijagnostika

Za direktnu analizu homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI* kod SMA pacijenata i fetalnih uzoraka korišćena je delimično modifikovana PCR/RFLP metoda opisana ranije (van der Steeg i sar, 1995). Modifikacija se zasnivala na promeni koncentracija pojedinih sastojaka PCR smeše, variranja u dužini pojedinih ciklusa PCR, kao i promeni koncentracija PCR produkata i primenjenih enzima u smeši za digestiju. Modifikacija je omogućila dobijanje adekvatnih koncentracija specifičnih PCR produkata, kao i njihovu potpunu digestiju radi postizanja jasno razdvojenih traka na gelu bez nespecifičnih produkata.

#### 3.2.2.1 PCR umnožavanje egzona 7 i 8 gena *SMN*

U dve odvojene PCR reakcije se vrši umnožavanje 7. i 8. egzona gena *SMN*. Reakcione smeše ove dve reakcije, kao i PCR uslovi su identični. Jedina razlika je u primeni odgovarajućeg seta i koncentracije prajmera za egzon 7 odnosno egzon 8. Uzorak genomske DNK koncentracije 200ng je inicijalno denaturisan 5 min na 94°C i amplifikovan u 32 ciklusa (94°C, 1min, 57°C, 1min, 72°C, 1min) sa finalnom ekstenzijom na 72°C, 7min. Reakciona smeša (25µl) je sadržala sledeće komponente: odgovarajuću koncentraciju pojedinačnih prajmera (tabela 2), 0,2 mM dNTPs (*Fermentas*, Nemačka), 4,5mM MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems*, SAD), 5U Taq polimeraze (*AmpliTaq Gold*, *Applied Biosystems*, SAD), 10xPCR pufer–MgCl<sub>2</sub> (*PCR Gold Buffer*, *Applied Biosystems*, SAD) i ddH<sub>2</sub>O. PCR je izvođen u aparatu (2720 *Thermal cycler*, *Applied Biosystems*, SAD).

**Tabela 2.** PCR prajmeri za umnožavanje egzona 7 i 8 gena *SMN* (Lefebvre i sar, 1995)

Egzon gena <i>SMN</i>	Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina produkta (bp)	Koncentracija prajmera (pmol/µl)
7	R111	AGA CTA TCA ACT TAA TTT CTG ATC A	203	28
	X7-Dra	TAA GGA ATG TGA GCA CCT TCC TTC		28
8	541C960	GTA ATA ACC AAA TGC AAT GTG AA	19	26
	541C1120	CTA CAA CAC CCT TCT CAC AG		29

Kvalitet PCR produkata pre digestije se proverava elektroforezom na 0,8 % agaroznom gelu sa EtBr finalne koncentracije 0,5 µg/ml koji se koristi za vizuelizaciju produkata. Produkti su analizirani posmatranjem gela na transiluminatoru (*ETX-F20.M transilluminator*, *Vilder Lourmat*, Francuska). Dužina dobijenih PCR produkata je određivana poređenjem sa DNK standardom za veličinu (1kb, *Fermentas*, Nemačka).

### 3.2.2.2 Priprema agaroznog gela i elektroforeza

- 0,8% rastvor agaroze (w/v) u 1xTBE puferu (45mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8,0) zagrejano je do ključanja.
- U gel je dodat EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5 µg/ml. Zagrejani gel je potom ohlađen do temperature od oko 60°C.
- Ohlađeni gel je naliven u kadicu za gel i ostavljen je da polimeriše.
- PCR produkti su pomešani sa bojom (2% *Orange G* (*Sigma-Aldrich*, SAD) (w/v), 87% glicerol (v/v), 50xTAE, ddH<sub>2</sub>O) u odnosu 5:2 i nanešeni su na gel.
- Elektroforeza je vršena 0.5h u 1xTBE puferu pri konstantnom naponu od 85V u sistemu za elektroforezu (*Wide Mini-sub Cell GT*, *BioRad*, SAD).
- Gel je izlagan UV svetlu ( $\lambda=254$  nm) na transiluminatoru (*ETX-F20.M transilluminator*, *Vilder Lourmat*, Francuska) i određivan je kvalitet i veličina PCR produkata.

### 3.2.2.3 Digestija PCR produkata restrikcionim enzimima

Primenom opisane PCR reakcije su dobijeni produkti amplifikacije 7. i 8. egzona i gena *SMN1* i *SMN2*. Za razdvajanje ove dve genske kopije i za analizu prisustva/odsustva delecije telomerne kopije gena *SMN* primenjena je digestija specifičnim restrikcionim enzimima.

#### Egzon 7

Reakcione smeše za enzimsku digestiju egzona 7 gena *SMN2* enzimom DraI<sup>62</sup> je sadržala: pufer za digestiju (50mM Tris-HCl-pH7,4, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM

---

62 DraI-izolovan iz *Deinococcus radiophilus* ATCC 27603

DTT, 0,1mM PMSF, 500µl/ml BSA, 50% glicerol), 10U/µl enzima DraI (*Fermentas*, Nemačka), ddH<sub>2</sub>O, PCR produkt egzona 7.

### Egzon 8

Reakcione smeše za enzimsku digestiju egzona 8 gena *SMN2* enzimom DdeI<sup>63</sup> je sadržala: pufer za digestiju (20mM Tris-HCl-pH8,0, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 10mM 2-merkaptotanol, 50% (v/v) glicerol, 0,2% (w/v) TritonX-100), 10U/µl DdeI (*Fermentas*, Nemačka), ddH<sub>2</sub>O, PCR produkt egzona 8.

Inkubacija sa oba enzima se vrši 4h na 37 °C .

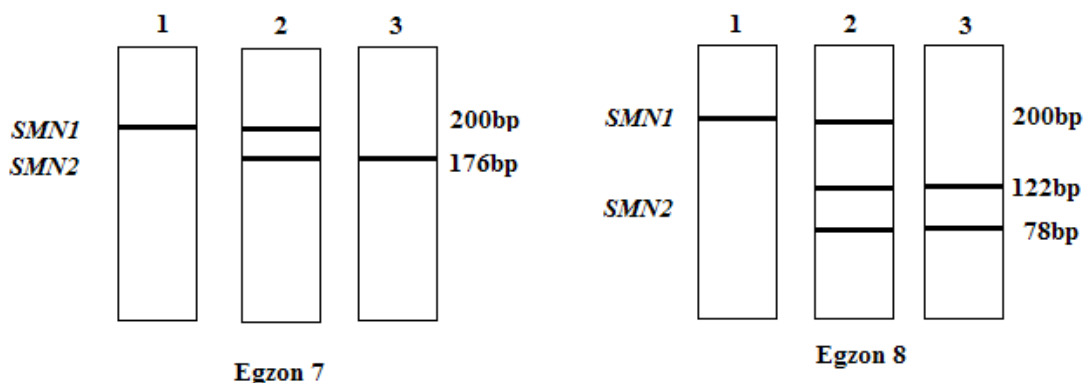
#### 3.2.2.4 Analiza produkata enzimske digestije

- Detekcija produkata enzimske digestije je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr u čija ležišta je nanošeno 10µl produkta sa 5µl boje *Orange G* (*Sigma-Aldrich*, SAD)
- U poslednje ležište na gelu je sipano 10ml DNK standarda za veličinu (1kb, *Fermentas*, Nemačka) radi određivanja dužine produkata.
- Uzorci su putovali na horizontalnoj elektroforezi, 1h pri konstantnom naponu od 85V. Vizuelizacija produkata je postizana na UV transiluminatoru (*ETX-F20.M transiluminator*, *Vilder Lourmat*, Francuska).
- Rezultati su interpretirani poređenjem sa DNK kontrolama poreklom od zdravih osoba, kao i od osoba sa delecijom u genu *SMN1* i to na sledeći način (slika 18):
  - nakon digestije sa restrikcionim enzimom DraI, produkt *SMN1* egzona 7 će ostati nedigestovan (200bp), dok će produkt *SMN2* egzona 7 biti isečen na dva fragmenta od 176bp i 24bp. Fragment od 24bp migrira sa gela ostavljajući jednu nedigestovanu traku *SMN1* egzona 7 i veći digestovani fragment sa *SMN2* egzona 7
  - nakon digestije restrikcionim enzimom DdeI produkt *SMN1* egzona 8 će biti nedigestovan (200bp) dok će produkt *SMN2* egzona 8 biti digestovan na dva fragmenta različite dužine (122 i 78 bp)

---

63 DdeI-izolovan iz *Desulfovibrio desulfuricaus* , NCIB Norway





**Slika 18.** Šematski prikaz očekivanih produkata nakon digestije restrikcionim enzimima za egzon 7 (levo) i egzon 8 (desno). 1 — nedigestovani produkt; 2 — digestovani produkt zdrave osobe; 3—digestovani produkt osobe sa homozigotnom delecijom kopije gena *SMN1*

### 3.2.3 PCR umnožavanje 5. i 13. egzona gena *NAIP* (detekcija homozigotnih delecije gena *NAIP*)

U multipleks PCR reakciji opisanoj ranije (Roy i sar, 1995) se vrši simultano umnožavanje 5. i 13. egzona gena *NAIP*. Egzon 5, prisutan samo kod telomerne, funkcionalne kopije gena *NAIP* koristi se kao indikator prisustva ovog gena. Egzon 13 je prisutan i kod normalnog i kod pseudogena i koristi se kao unutrašnja kontrola kvaliteta reakcije.

Genomska DNK koncentracije 200 ng umnožavana je u 25 $\mu$ l reakcione smeše koja je sadržala 10x PCR pufer–MgCl<sub>2</sub> (*PCR Gold Buffer, Applied Biosystems, SAD*), ddH<sub>2</sub>O, 0,2 mM dNTPs (*Fermentas, Nemačka*), 4,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems, SAD*), odgovarajuće koncentracije pojedinačnih prajmera (tabela 3), 5U Taq polimeraze (*AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, SAD*). PCR je sproveden u aparatu (*Thermal cycler, Eppendorf, Nemačka*), a uslovi reakcije su bili sledeći: inicijalna denaturacija uzorka (94°C, 5min); 30 ciklusa (94°C, 1min; 60°C, 1min; 72°C, 1min); finalna ekstenzija (72°C, 10min)

**Tabela 3.** Prajmeri korišćeni za umnožavanje egzona 5 i 13 gena *NAIP* (Roy i sarad., 1995)

<i>Egzoni gena NAIP</i>	<i>Oznaka prejmera</i>	<i>Sekvenca (5'-3')</i>	<i>Dužina produkta (bp)</i>	<i>Koncentracija prajmera (pmol/μl)</i>
5	1863	CTC TCA GCC TGC TCT TCA GAT	435	25
	1864	AAA GCC TCT GAC GAG AGG ATC		26
13	1258	ATG CTT GGA TCT CTA GAA TGG	241	27
	1343	CCA GCT CCT AGA GAA AGA AGG		29

Detekcija PCR produkata je vršena na 2% agaroznom gelu sa EtBr (horizontalna elektroforeza, 85V, 1h) na koji je nanošeno 5 μl boje (*orange G*, *Sigma-Aldrich*, SAD) i 10 μl produkta. Vizuelizacija je postizana na UV transiluminatoru (*ETX-F20.M transiluminator*, *Vilder Lourmat*, Francuska). Delecija je detektovana kroz odsustvo PCR produkata sa egzona 5 gena *NAIP*, dok je uspešnost reakcije potvrđena prisustvom produkata 13. egzona ovog gena. Rezultati su upoređivani sa kontrolama koje su predstavljale kako osobe bez delecije tako i osobe sa već dijagnostikovanom delecijom ispitivanog egzona.

### 3.2.4 MLPA analiza (određivanje broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *NAIP* (*BIRC1*), *GTF2H2* (*BTHp44*) i *H4F5* (*SERF1B*))

MLPA metoda za ispitivanje broja kopija gena iz SMA regiona je sprovedena korišćenjem seta proba — MLPA Kit P021-A2 SMA dizajniranim u *MRC-Holland*, Holandija. Ovaj set proba sadrži 16 proba specifičnih za ceo SMA region (5q12.2–q13.3): po 1 proba za egzone 1, 4, 6 i 8 *SMN1* i *SMN2*; 2 probe za C-u-T tranziciju u egzonu 7 (po jedna za *SMN1* i *SMN2*); 2 probe za G-u-A tranziciju u egzonu 8 (po jedna za *SMN1* i *SMN2*); 2 probe za gen *BIRC1* (*NAIP*) (jedna specifična samo za *NAIP* i druga specifične i za *NAIP* i za pseudogen (*NAIPψ*)); 3 probe za gen *GTF2H2*(*BTF2p44*); 1 proba za gen *SERF1B*(*H4F5*); 1 proba za gen *CDH6* (K-cadherin); 1 proba za gen *RAD17* (tabela 4). Pored toga ovaj set sadrži i 21 kontrolnu probu koje su locirane na drugim autozomima i funkcionišu kao referente probe.

MLPA metoda sa ovako dizajniranim setom proba je u ovom istraživačkom radu korišćena za praćenje broja kopija gena *SMN1* kod SMA pacijenata bez homozigotne delecije i kod zdravih osoba sa porodičnom anamnezom SMA u cilju detekcije heterozigotnih nosilaca delecije ovog gena. Pored toga ova metoda je kod dela pacijenata sa homozigotnom *SMN1* delecijom korišćena za determinaciju broja kopija i svih ostalih gena iz 5q13 regiona radi detaljnije analize genotipske varijabilnosti SMA kritičnog regiona i njene korelacije sa fenotipom pacijenata.

**Tabela 4.** Probe specifične za određene sekvence gena u 5q13 regionu koje se nalaze u SALSAL MLPA P021 setu proba

<i>Dužina (nt)</i>	<i>SALSAL MLPA probe u 5q13 regionu</i>	<i>Specifičnost probe</i>
202	<i>RAD17</i> proba 01257-L00184	locirana unutar 300 kb od <i>SMN1</i>
328	<i>GTF2H2</i> proba 01262-L00971	detektuje C>G tranziciju egzon 10*
218	<i>GTF2H2</i> proba 01813-L00818	detektuje G>A tranziciju egzon 7*
185	<i>GTF2H2</i> proba 01256-L00972	detektuje obe <i>GTF2H2</i> varijante *
238	<i>NAIP</i> proba 01259-L00811	detektuje samo kompletan gen <i>NAIP</i> koji je lociran pored <i>SMN1</i> . Nasuprot njega <i>NAIP<math>\psi</math></i> kopija je locirana blizu <i>SMN2</i> i ne sadrži sekvencu egzona 5 koja se detektuje ovom probom.
346	<i>NAIP</i> proba 01263-L00812	detektuje sekvencu egzona 13 gena <i>NAIP</i> . Ova sekvencija je prisutna u svim kopijama gena <i>NAIP</i> (tj. i u <i>NAIP</i> i u <i>NAIP<math>\psi</math></i> formi) s obzirom da postoje višestruke kopije nekompletnog gena <i>NAIP</i> u 5q11.
294	<i>SMN1</i> proba 01812-L01373	proba za egzon 8 — pokazuje broj <i>SMN1</i> kopija
364	<i>SMN1/2</i> proba 01814-L00807	detektuje <i>SMN1</i> + <i>SMN2</i> odn. detektuje sekvencu egzona 8 koja je identična u obe <i>SMN1</i> i <i>SMN2</i> kopije; može koristiti da se proceni broj kopija egzona obe <i>SMN</i> forme kombinovano u odnosu na normalne kontrole
270	<i>SMN1</i> proba 01260-L00966	proba za egzon 7 – pokazuje broj kopija gena <i>SMN1</i>

419	<i>SMNI</i> proba 01815-L00810	detektuje ( <i>SMNI</i> + <i>SMN2</i> ) egzon 6
400	<i>SMNI</i> proba 01816-L00809	detektuje ( <i>SMNI</i> + <i>SMN2</i> ) egzon 4
382	<i>SMNI</i> proba 01265-L00808	detektuje ( <i>SMNI</i> + <i>SMN2</i> ) egzon 1
454	<i>SERF1B</i> proba 01269-L00813	detektuje egzon 1 ove sekvence (najbliži <i>SMNI</i> )
276	<i>SMN2</i> proba 01260-L00967	proba za egzon 7– pokazuje broj kopija <i>SMN2</i>
300	<i>SMN2</i> proba 01812-L01372	proba za egzon 8 kopija – pokazuje broj kopija <i>SMN2</i>
148	<i>CDH6 (K-kadherin)</i>	služi kao kontrola za priustvo celog regiona

\*Tri *GTF2H2* probe su uključene da determinišu broj kopija dve postojeće *GTF2H2* varijante. 185nt *GTF2H2* proba detektuje sekvencu egzona 4 koja je prisutna u obe varijante 1 i 2. 328nt *GTF2H2* proba specifična za varijantu 1: detektuje C>G tranziciju u egzonu 10 i specifična je za varijantu sa C (nasuprot G) u egzonu 10. 218nt *GTF2H2* proba specifična za varijantu 2: detektuje G>A tranziciju u egzonu 7 i specifična je za varijantu G (nasuprot A) u egzonu 7.

#### 3.2.4.1 MLPA reakcija

MLPA reakcija je bila izvedena u PCR aparatu (*Thermal cycler; Eppendorf, Nemačka*). Za njeno izvođenje se koristio izmenjeni i pojednostavljeni protokol definisan od strane proizvođača<sup>64</sup> (*MRC-Holland, Holandija*) i obuhvatio je sledeće korake za oba seta proba:

##### *I dan — DNK denaturacija i hibridizacija*

- 50-250 ng DNK rastvorene u TE ili dd H<sub>2</sub>O su denaturisane (5 min, 98°C)
- na 25°C, u svaku epruvetu sa denaturisanim DNK uzorkom je raspoređena hibridizaciona smeša koja je sadržala: MLPA pufer (KCl, Tris-HCl, EDTA i PEG-6000 pH 8,5) i mešavinu proba (sintetički oligonukleotidi, Tris-HCl, EDTA pH 8,0) u zapreminskom odnosu 1:1 i inkubirana (1 min, 95°C; 16 – 20 h, 60°C).

##### *II dan — Ligaciona reakcija*

- temperature uzoraka sa 60°C su spuštene na 54°C i svaki uzorak je raspoređen u ligacionu smešu (*Ligase-65*) koja je sadržala: ddH<sub>2</sub>O, ligacioni pufer A

64 Eng. *One-tube protocol*-protokol u jednoj epruveti

(NAD, bakterijskog porekla, pH 3,5) + ligacioni pufer B (Tris-HCl, nejonski deterđenti, MgCl<sub>2</sub> pH 8,5) u zapreminskom odnosu 1:1. Zatim je dodat *Ligase-65* enzim (Glicerol, BRIJ (0,05 %), EDTA, beta-merkaptotanol (0,1%), KCl, Tris-HCl pH 7,5, enzim Ligaza-65 bakterijskog porekla)

- da bi se sprovela ligacija inkubacija se nastavila (15 min, 54°C), za kojom je sledila inaktivacija enzima *Ligase-65* zagrevanjem (5 min, 98°C), zatim je temperatura spuštena na 20°C
- produkti ligacione reakcije su čuvani na sobnoj temperature nekoliko sati ili na +4°C do nedelju dana.

### *PCR reakcija*

Kompletnom produktu ligacije je dodato 10 µl PCR smeše koja je sadržala: dd-H<sub>2</sub>O, SALSA PCR smešu prajmera (sintetički oligonukleotidi, od kojih je jedan fluorescentno obeležen (FAM), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0,04 %) pH 8), SALSA Polimeraza (Glicerol, BRIJ (0,5 %), EDTA, DTT (0,1 %), KCl, Tris-HCl, polimeraza enzim bakterijskog porekla pH 7,5).

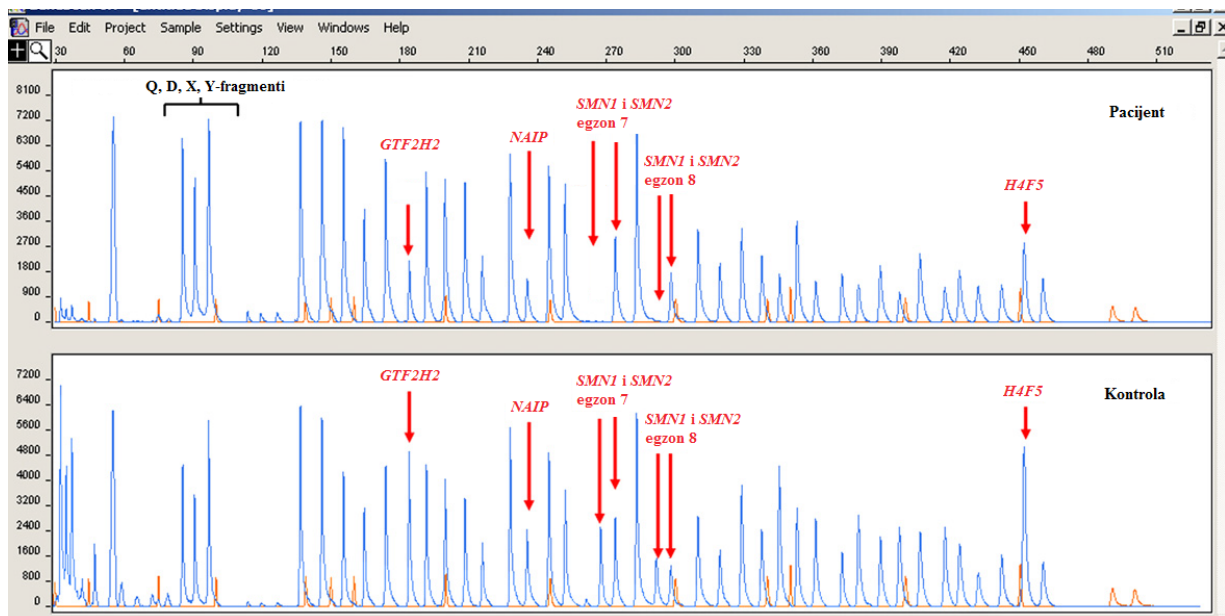
PCR program se sastojao od: 35 ciklusa (30s, 95°C; 30s, 60°C; 60s, 72°C). Nakon finalne ekstenzije (20 min, 72°C) reakcija se završava na 15°C. Produkti PCR reakcije su čuvani na +4°C ili između -25°C i -15°C zaštićeni od svetla.

#### 3.2.4.2 Razdvajanje produkata kapilarnom elektroforezom

U ovom istraživanju korišćena je kapilarna elektroforeza ABI 3500 genetičkom analizatoru (eng. *Genetic Analyzer Applied Biosystems International Inc.*, Kalifornija, SAD). Za razdvajanje MLPA produkata na ovom aparatu neophodna je kapilara od 50cm i polimer POP 7.

Nakon PCR reakcije 0,7 µl PCR produkta je pomešano sa 0,2 µl 500 LIZ internim standardom veličine produkata (*Applied Biosystems International Inc.*, Kalifornija, SAD) (filter set aparata je G5) i 9 µl formamidom. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani (2 min, 80°C) pa su potom brzo ohladjeni, nakon čega su sipani u ležišta na ploči za kapilarnu elektroforezu.

Uslovi elektroforeze su bili — injekciona voltaža: 1,6 kV; injekciono vreme: 15 sec; voltaža kretanja produkata kroz kapilaru: 10 kV; vreme kretanja produkata kroz kapilaru: 2600 sec nakon čega su se analizirali dobijeni MLPA profili za svakog pacijenta (slika 19).



**Slika 19.** Primer MLPA profila SMA pacijenta i kontrole poreklom od zdrave osobe. U poređenju sa kontrolom kod pacijenta se javlja redukovana visina pika za egzon 10 gena *GTF2H2* (pik 6), egzon 5 gena *NAIP* (pik 12), egzon 1 gena *H4F5* (pik 36) i potpuno odsustvo pikova 15 i 18 koji odgovaraju 7 i 8 gena *SMN1* respektivno.

### 3.2.4.3 Obrada podataka dobijenih MLPA reakcijom

Podaci dobijeni nakon kapilarne elektroforeze su bili prikupljeni i selektovani pomoću softvera *Genemapper* verzija 4.0 (*Applied Biosystems International Inc.*, Kalifornija, SAD), a potom analizirani i interpretirani korišćenjem softvera *Coffalyser* verzija 9 (*Coffalyser. Net*, Holandija). U određivanju broja kopija gena za svaku probu specifičnu za određene sekvence analiziranih gena iz SMA kritičnog regiona, kao i za kontrolne probe, korišćeni su rasponi prikazani u tabeli 5, dobijeni nakon obrade rezultata u pomenutom softveru.

**Tabela 5.** Srednja vrednost, raspon i standardna devijacija prikazana za svaku probu specifičnu za SMA kritični region i za kontrolne probe u grupi normalnih kontrola nakon MLPA analize

<i>Proba</i>	<i>Gen</i>	<i>Broj kopija gena</i>	<i>Srednja vrednost</i>	<i>Raspon</i>	<i>SD</i>
1260-L0966	<i>SMN1-7</i>	2	0.96	0.84–1.06	0.089
1812-L1372	<i>SMN1-8</i>	2	1.02	0.89–1.13	0.085
1260-L0967	<i>SMN2-7</i>	2	0.98	0.83–1.09	0.090
1812-L1373	<i>SMN2-8</i>	2	1.01	0.94–1.10	0.057
1814-L0807	<i>SMN1+SMN2</i>	4	1.00	0.92–1.09	0.062
1265-L0808	<i>SMN1+SMN2</i>	4	1.06	0.94–1.19	0.116
1816-L0809	<i>SMN1+SMN2</i>	4	1.02	0.86–1.17	0.131
1815-L0810	<i>SMN1+SMN2</i>	4	1.01	0.84–1.15	0.136
1263-L0812	<i>NAIP+NAIP<math>\psi</math></i>	4	1.02	0.90–1.15	0.099
1259-L0811	<i>NAIP</i>	2	0.99	0.88–1.16	0.108
N-cadherin-like 1269-L0813	<i>SERF1(H4F5)</i>	2	0.93	0.82-1.05	0.075
1256-L0972	<i>GTF2H2(BTF2p44)-11</i>	2	1.01	0.85-1.17	0.098
1813-L0818	<i>GTF2H2(BTF2p44)-8</i>	2	0,98	0.82-1.14	0.114
1262-L0971	<i>GTF2H2(BTF2p44)-5</i>	2	1,03	0.87-1.19	0.105
<b>Kontrolne probe</b>			1	0.80–1.24	0.112

Korišćeni softver omogućava analizu tako što se za svaki uzorak računa relativna visina pika (RPH<sup>65</sup>). RPH za svaku probu unutar istog testa je dobijana tako što je visina pika svake specifične probe bila normalizovana deljenjem sa kombinovanim visinama kontrolnih proba. RPH svake probe je potom bila poređena sa RPH iste probe u normalnim uzorcima (najmanje tri) da bi se dobio odnos visine pika za svaku probu. Kontrolni uzorci su dobijeni iz krvi osoba koje imaju dva alela — svaki sa jednom kopijom *SMN1*, *SMN2*, telomerni *NAIP*, telomerni *H4F5* i dve varijante gena *GTF2H2*. U *Coffalyser* analizi veličina pika pokazuje normalan broj kopija kada je odnos 0,7–1,3 u poređenju sa

65 RPH — engl. *relative peak heights* — relativne visine pika

normalnom kontrolom; 1 kopiju kada pokazuje odnos  $<0,7$ ; višak kada pokazuje odnos  $>1,3$  i nedostatak odnosno homozigotnu deleciju kada pokazuje odnos jednak 0. Uzimajući u obzir ovu korelaciju, normalan pik ukazuje na prisustvo dve kopije gena, osim za probe specifične za egzone 1, 4, 6 i 8 obe kopije gena (*SMN1* i *SMN2*). Za ove probe normalan pik predstavlja četiri genske kopije *SMN1+SMN2*. Isto je i za probu specifičnu za *NAIP* i njegov pseudogen koja takođe ukazuje na četiri (*NAIP+NAIP $\psi$* ) kopije gena.

Svi uzorci su analizirani najmanje dva puta.

### 3.2.5 Analiza tačkastih mutacija u egzonu 6 gena *SMN*

#### 3.2.5.1 PCR umnožavanje egzona 6 gena *SMN*

PCR-om je umnožavan kodirajući egzon 6 gena *SMN*. Korišćeni prajmeri, njihove sekvence, kao i veličina produkta PCR-a prikazani su u tabeli (tabela 6):

PCR smeša u ukupnoj zapremini od 50  $\mu$ l je sadržala: 1 $\times$ PCR pufer–MgCl<sub>2</sub> (*PCR Gold Buffer, Applied Biosystems, SAD*), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems, SAD*), 200  $\mu$ M *dNTPs* (*Fermentas, Nemačka*), 0,5  $\mu$ M uzvodni i 0,5  $\mu$ M nizvodni prajmer, 0,03 U/ $\mu$ l *Taq* DNK polimeraze (eng. *AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, SAD*) i 0,5 do 1 DNK matrice.

PCR je izvođen u ABI 9700 PCR aparatu (*ABI 9700 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD*) po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C; 30 ciklusa: 1 min na 94°C; 1 min na 60°C; 1 min na 72°C; finalna ekstenzija 10 min na 72°C.

Tabela 6. PCR prajmeri za umnožavanje egzona 6 gena *SMN*

Egzon gena <i>SMN</i>	Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina produkta (bp)	Referenca
6	s6a	GATAATTCCCCACACCTC	143	Burglen i sar, 1996
	s6b	TGTCAGGAAAAGATGCTGAGT		Burglen i sar, 1996



Produkti umnožavanja su čuvani na 4°C. Dobijeni PCR produkti prečišćavani su upotrebom QIAquick PCR Purification Kit-a (*Qiagen*, Nemačka). Kvantifikacija prečišćenih PCR produkata vršena je upotrebom ImageJ programa (NIH, <http://rsb.info.nih.gov>), a u poređenju sa DNK standardima poznate koncentracije (100 bp *ladder*, *Fermentas*, Nemačka).

### 3.2.5.2 Sekvenciranje egzona 6 gena *SMN*

Sekvenciranje egzona 6 gena *SMN* izvršeno je upotrebom metode PCR modifikacije metode terminacije sinteze (eng. *thermal cycling sequencing method*). Smeše su pripremane u ukupnoj zapremini od 5 µl i sadržale su: 0,75 ng PCR produkta, 0,8 pmol odgovarajućeg prajmera i 2 µl *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit-a* (*Applied Biosystems*, SAD).

Reakcija sekvenciranja izvođena je u ABI 9700 PCR mašini (*ABI 9700 Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*, SAD) po sledećem protokolu: 1 min na 96°C; 25 ciklusa: 10 s na 96°C; 5 s na 50°C; 4 min na 60°C.

Produkti amplifikacije su čuvani na 4°C do prečišćavanja i analize.

### 3.2.5.3 Prečišćavanje reakcije sekvenciranja i analiza na automatskom DNK sekvenatoru

Prečišćavanje reakcije sekvenciranja je sprovedeno na sledeći način:

- 5 µl 125mM EDTA i 60 µl 96% etanola dodavano je u svaku reakciju sekvenciranja.
- smeša je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi i nakon toga centrifugirana 30 min na 6000 rpm na 4°C
- supernatant je odliven
- u talog je dodato 60 µl 70% etanola
- smeša je ponovo centrifugirana 15 min na 5000 rpm na 4°C
- supernatant je odliven
- talog je sušen 2 min na 90°C
- nakon toga u talog je dodato 15 µl HiDi Formamida (*Applied Biosystems*, SAD)

- uzorci su denaturisani 2 min na 95°C, ohlađeni 2 min na 4°C i prebačeni na mikrotitrarsku ploču sa 96 bunarića i stavljeni u mašinu za sekvenciranje (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD*)

Sekvence su očitavane automatski, uz korišćenje *Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems, SAD)* i *BioEdit v.7.0.9.* programa (Tom Hall, *Ibis Biosciences, SAD*). Varijacije u sekvenci su potvrđene sekvenciranjem iz oba smera.

### 3.2.6 Bayesova analiza za procene rizika

Ova analiza je prvo korišćena za izračunavanje posteriornog rizika za određeni fenotip koji će pacijent razviti na osnovu broja *SMN2* kopija. Za izračunavanje su korišćene učestalosti *SMN2* kopija dobijene na ispitivanom uzorku SMA pacijenata iz Srbije. Pored toga Bayesova analiza je korišćena za konačnu procenu rizika u grupi zdravih osoba, nakon određivanja broja kopija gena *SMN1* u cilju određivanja statusa heterozigotnih nosilaca, koristeći učestalosti alela i genotipova iz velike studije koja je obuhvatila podatke iz različitih populacija (Ogino i sar, 2004b). Ove analize su omogućile procenjivanje preciznog individualnog rizika za status heterozigotnog nosioca *SMN1* delecije kao i rizika za dobijanje obolelog deteta u različitim situacijama.

### 3.2.7 Statističke metode

Raspodela učestalosti homozigotnih delecija gena *SMN1* i *NAIP*, kao i broja kopija gena *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* po različitim kliničkim tipovima ispitivanih SMA pacijenata su analizirani korišćenjem Hi-kvadrat( $\chi^2$ ) testa i Fisherovog testa tačne verovatnoće. Primenjenim statističkim testovima ispitivana je nulta hipoteza da ne postoji razlika u učestalostima ispitivanih parametara između SMA tip I, tip II i tip III u analiziranom uzorku pacijenata sa SMA. Smatra se da između određenih grupa bolesnika postoji statistički značajna razlika u učestalostima (odbacuje se polazna hipoteza) ukoliko je vrednost verovatnoće manja od 0,05 ( $p^{66}(P^{67}) < 0,05$ ).

---

66 Verovatnoća Hi kvadrat testa

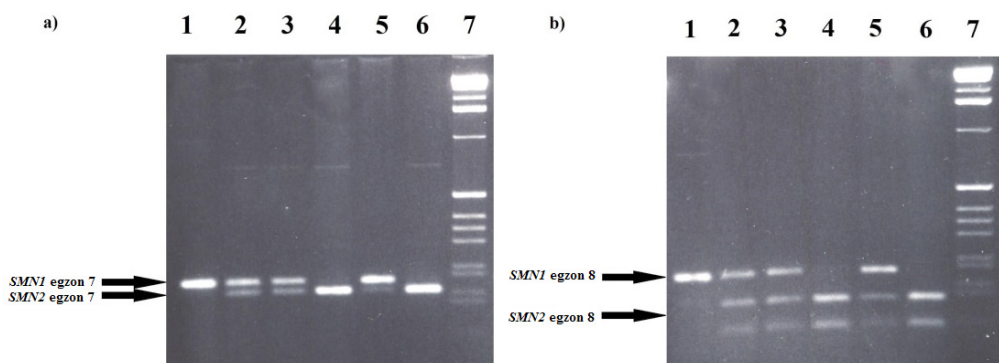
67 Fisherova tačna verovatnoća

## 4 REZULTATI

### 4.1 Analiza gena *SMNI* kod pacijenata obolelih od SMA

#### 4.1.1 Detekcija homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI* (PCR/RFLP metoda)

Prvi deo istraživačkog rada je obuhvatio molekularnu analizu homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI* kao najčešće mutacije kod SMA pacijenata radi potvrde klinički postavljene dijagnoze (slika 20).



**Slika 20.** Elektroforeza na agaroznom gelu koja pokazuje produkte egzona 7 (a) i 8 (b) gena *SMN* dobijene PCR-RFLP metodom. (1): nedigestovani produkt; (2 i 3): uzorci dva pacijenta bez homozigotne delecije; (4): pacijent sa homozigotnom delecijom egzona *SMNI*; (5): kontrolni uzorak (bez homozigotne delecije); (6): kontrolni uzorak (sa homozigotnom delecijom egzona *SMNI*); (7): 1kb DNK marker

Analiza je sprovedena primenom PCR/RFLP metode kod 107 SMA pacijenata iz Srbije (56 dečaka i 51 devojčica). Sa dijagnozom SMA tip I upućeno je 58/107 (54,2%) pacijenata, sa dijagnozom SMA tip II 35/107 (32,7%) i sa SMA tip III 14/107 (13,1%) obolele dece (tabela 7). Odnos polova u SMA tip I (ž/m<sup>68</sup>= 23/35) i SMA tip II (ž/m=17/18) grupi pacijenata je bio ujednačen, dok je u SMA tip III (ž/m=11/3) učestalost devojčica bila znatno viša (tabela 7). U analizu je uključeno i 100 kontrolnih uzoraka poreklom od zdravih osoba.

68 ž/m-broj pacijenata ženskog pola/broj pacijenata muškog pola

**Tabela 7.** Pacijenti sa SMA analizirani PCR/RFLP metodom za detekciju homozigotne delecije gena *SMNI*

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>I</i>		<i>II</i>		<i>III</i>	
<b>Pol</b>	ž	m	ž	m	ž	m
<b>Broj pacijenata, n(%)</b>	23(39,7)	35(60,3)	17(48,6)	18(51,4)	11(78,6)	3(21,4)
<b>Total, n(%)</b>	58(54,2)		35(32,7)		14(13,1)	

Molekularna analiza sprovedena na prikazanom uzorku SMA pacijenata je pokazala prisustvo homozigotne delecije gena *SMNI* kod 87/107 pacijenata (81,3%) (tabela 8). Delecija egzona 7 i 8 gena *SMNI* je bila prisutna kod 82/107(76,6%), dok je 5/107 (4,7%) pacijenata imalo samo deleciju egzona 7 (tabela 9). Nijedan kontrolni uzorak nije imao ispitivane delecije.

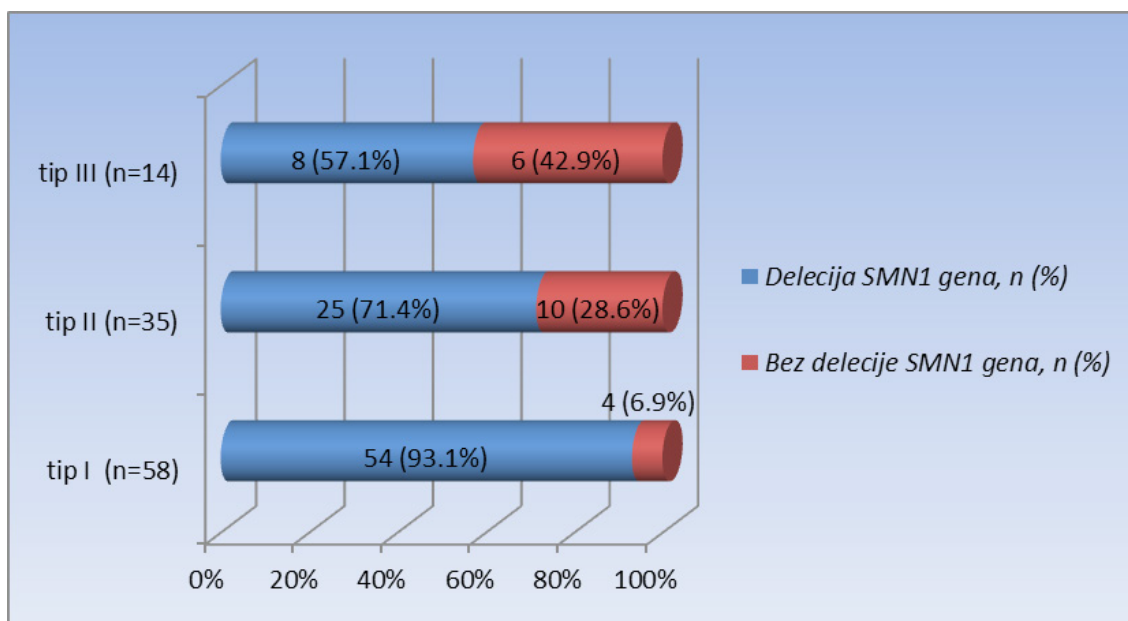
#### 4.1.2 Distribucija homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi SMA pacijenata iz Srbije

Učestalost homozigotne delecije gena *SMNI* (egzona 7 ili oba egzona 7 i 8) bila je najveća u grupi pacijenata sa SMA tipom I tj. najtežim oblikom bolesti – 93,1% (54/58), dok je u grupi pacijenata sa SMA tip II i III bolesti ova učestalost bila niža: 71,4% (25/35), odnosno 57,1% (8/14) (tabela 8). Statistička značajnost ove razlike je pokazana primenom Hi— kvadrat testa ( $p < 0.01$ ) (tabela 8, slika 21).

**Tabela 8.** Raspodela učestalosti homozigotne delecije gena *SMNI* po tipovima SMA

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I, II, III</i>
<b>Delecije gena <i>SMNI</i>, n (%)</b>	54 (93,1)	25 (71,4)	8 (57,1)	<b>87 (81,3)</b>
<b>Bez delecije gena <i>SMNI</i>, n (%)</b>	4 (6,9)	10 (28,6)	6 (42,9)	<b>20 (18,7)</b>
<b>Broj pacijenata, n</b>	<b>58</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>107</b>
<b>Hi kvadrat test</b>	$\chi^2=37,3$	$df^{69}=2$		$p<0,01$

69 stepen slobode

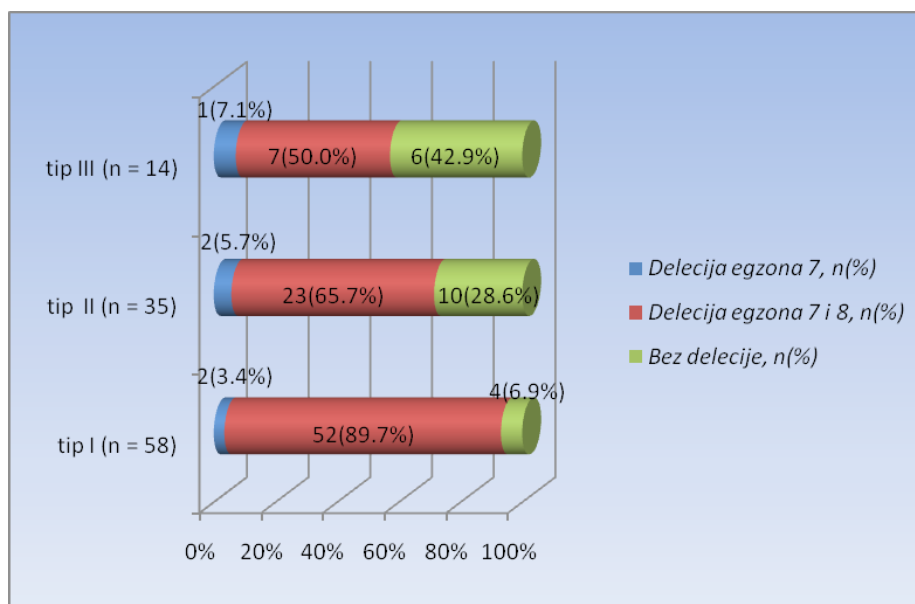


**Slika 21.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti pacijenata sa i bez homozigotne delecije gena *SMN1* unutar pojedinačnih tipova SMA

U cilju ispitivanja učestalosti homozigotne delecije egzona 7 i delecije egzona 7 i 8 u različitim tipovima SMA, primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji delecija egzona 7 samostalno ili u kombinaciji sa egzonom 8 u odnosu na SMA tip ( $P= 0.0923$ ) (slika 22, tabela 9).

**Tabela 9.** Raspodela učestalosti homozigotne delecije egzona 7 i delecije oba egzona 7 i 8 po tipovima SMA

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I, II, III</i>
<b>Delecija egzona 7, n (%)</b>	2 (3,4)	2 (5,7)	1 (7,1)	<b>5 (4,7)</b>
<b>Delecija egzona 7 i 8, n (%)</b>	52 (89,7)	23 (65,7)	7 (50,0)	<b>82 (76,6)</b>
<b>Bez delecije, n (%)</b>	4 (6,9)	10 (28,6)	6 (42,9)	<b>20 (18,7)</b>
<b>Total, n (%)</b>	<b>58 (54,2)</b>	<b>35 (32,7)</b>	<b>14 (13,1)</b>	<b>107</b>
<b>Fisherov test tačne verovatnoće</b>				<b>P=0,0923</b>



**Slika 22.** Procentualna zastupljenost delecije egzona 7 i delecije oba egzona 7 i 8 unutar pojedinačnih SMA tipova

#### 4.1.3 Analiza broja kopija gena *SMNI* u grupi pacijenata bez homozigotne delecije ovog gena (MLPA metoda)

U grupi od 20/107 analiziranih SMA pacijenata nije uočeno prisustvo homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI*. U cilju otkrivanja potencijalnih složenih heterozigotnih nosilaca sa delecijom jednog alela ovog gena i tačkastom mutacijom na drugom alelu, kod 13/20 (65%) pacijenata iz ove grupe (4/13-SMA tip I, 8/13-SMA tip II, 1/13 SMA tip III), kod kojih je preispitana klinička dijagnoza potvrdila proksimalnu SMA, određivan je broj prisutnih kopija gena *SMNI* primenom MLPA metode. U 3/13 (23,1%) slučajeva (1/13 pacijent sa SMA tip I i 2/13 sa SMA tip II), detektovana je samo jedna kopija egzona 7 i 8 gena *SMNI* i potvrđena je heterozigotnost. Preostalih 10/13 (76,9%) pacijenata je imalo dve kopije ovog gena (tabela 10).

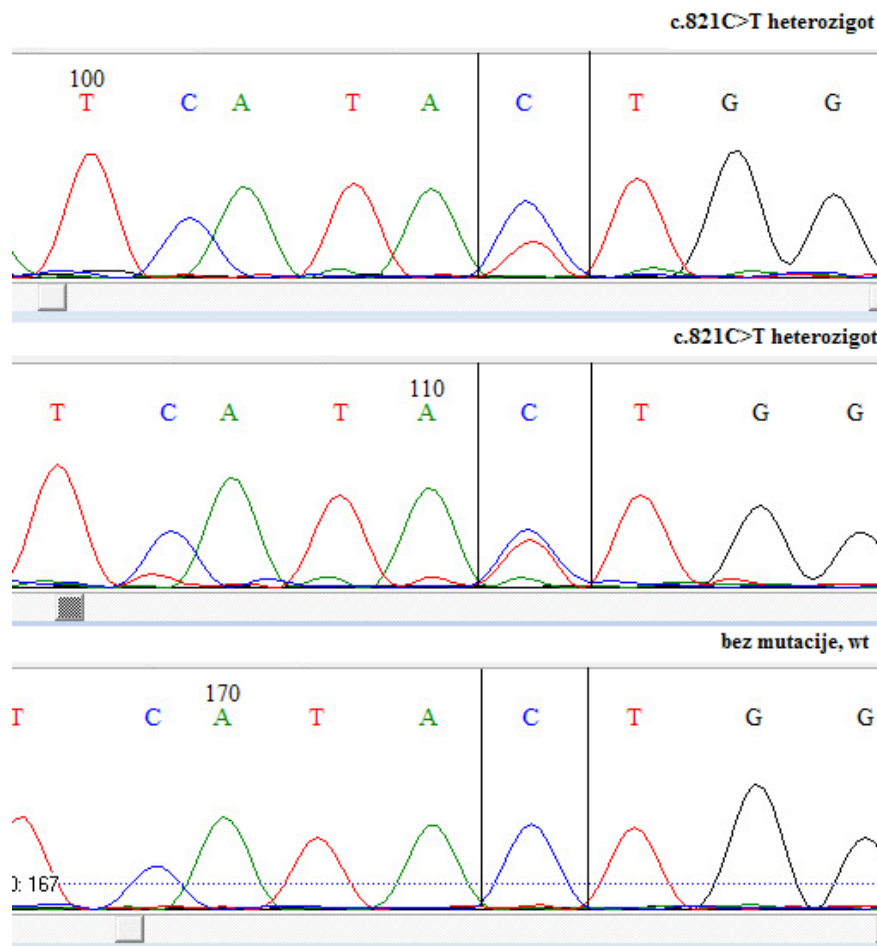
**Tabela 10.** Broj kopija gena *SMNI* u ispitivanoj grupi pacijenata bez homozigotne delecije ovog gena

Klinički SMA tip	I	II	III	I, II, III
<b>1 kopija <i>SMNI</i>, n (%)</b>	1 (25,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	<b>3 (23,1)</b>
<b>2 kopije <i>SMNI</i>, n (%)</b>	3 (75,0)	6 (75,0)	1 (100,0)	<b>10 (76,9)</b>
<b>Total, n (%)</b>	<b>4(30,8)</b>	<b>8(61,5)</b>	<b>1(7,7)</b>	<b>13</b>

#### 4.1.4 Detekcija tačkastih mutacija u egzonu 6 gena *SMN*

Kod 3/13 ispitivanih pacijenata bez homozigotne delecije gena *SMN1* je prethodnom analizom potvrđena heterozigotnost kroz detekciju samo jedne kopije ovog gena. U cilju konačne potvrde dijagnoze kod ovih pacijenata, direktnim sekvenciranjem egzona 6 gena *SMN* se ispitivalo potencijalno prisustvo intragenskih mutacija s obzirom da su one najčešće prisutne u ovom egzonu.

Kod 2 pacijenta koja nisu bili u srodstvu, a klinički su bili klasifikovani kao SMA tip II, identifikovana je tačkasta mutacija c.821C>T (p.Thr274Ile). Kod trećeg pacijenta sa SMA tip I nije identifikovana mutacija u ispitivanom egzonu. Sekvenca egzona 6 gena *SMN* sa c.821C>T mutacijom i bez nje kod tri ispitivana pacijenta prikazana je na slici 23.

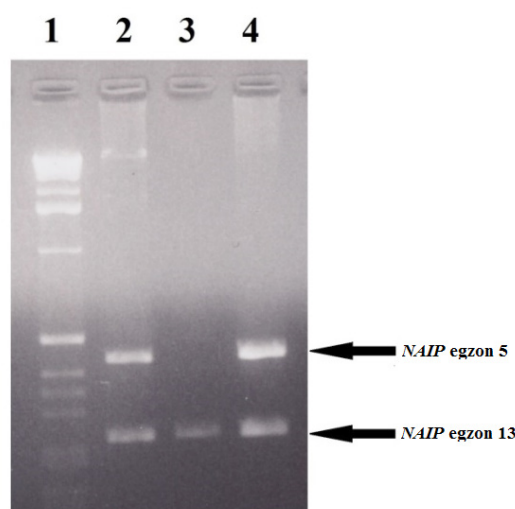


**Slika 23.** Sekvenca egzona 6 gena *SMN* kod dva SMA tip II pacijenta sa heterozigotnom c.821C>T mutacijom i jednog SMA tip I pacijenta bez mutacije

## 4.2 Analiza homozigotne delecije gene *NAIP* i njena korelacija sa fenotipom

### 4.2.1 Detekcija homozigotne delecije egzona 5 gena *NAIP* (PCR metoda)

Na istom uzorku od 107 SMA bolesnika kao i 100 kontrolnih uzoraka poreklom od zdravih osoba ispitivano je prisustvo/odsustvo homozigotne delecije gena *NAIP* (slika 24).



**Slika 24.** Elektroforeza na agaroznom gelu koja prikazuje PCR produkte egzona 5 i 13 (interna kontrola) gena *NAIP*. 1– 1kb DNK marker; 2– pacijent (bez homozigotne delecije gena *NAIP*); 3– kontrolni uzorak (homozgotna delecija gena *NAIP*); 4– kontrolni uzorak (bez homozigotne delecije gena *NAIP*)

Dobijeni rezultati primenom PCR metode su pokazali da je egzon 5 ovog gena bio deleciran kod 23/107 (21,5%) ispitivanih SMA pacijenata (tabela 11). Homozigotna delecija egzona 5 ovog gena je takođe detektovana i kod 1/100 (1%) ispitivanih kontrolnih uzoraka.

### 4.2.2 Distribucija homozigotne delecije gena *NAIP* u grupi SMA pacijenata iz Srbije

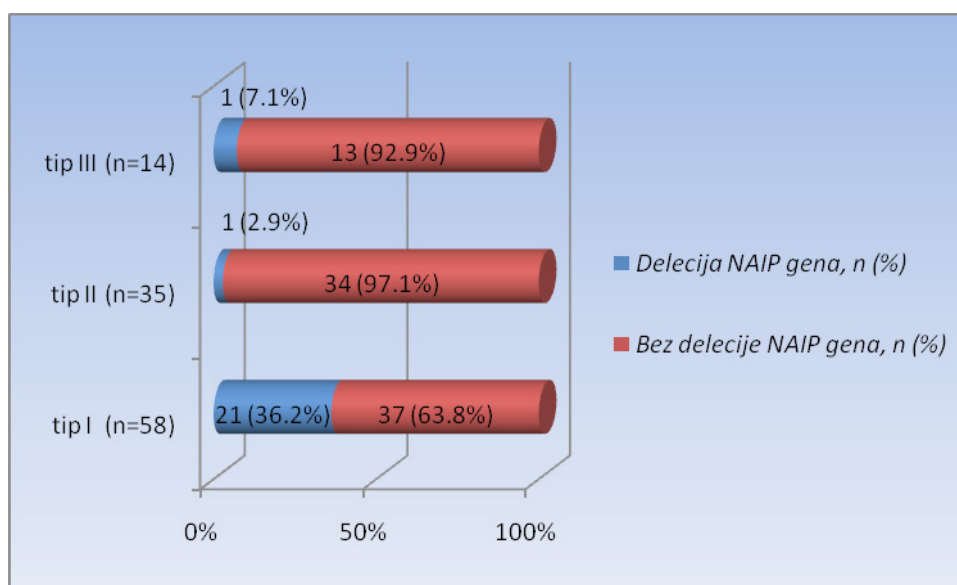
Učestalost homozigotne delecije gena *NAIP* kod ispitivanih SMA pacijenata bila je najveća u grupi sa SMA tipom I, tj. najtežim oblikom bolesti – 36,2% (21/58), dok je u grupi pacijenata sa SMA tip II i tip III bolesti ova učestalost iznosila 2,9% (1/35) odnosno



7,1% (1/14) (tabela 11). Statistička značajnost ove razlike je pokazana primenom Hi-kvadrat testa ( $p < 0.01$ ) (tabela 11, slika 25).

**Tabela 11.** Raspodela učestalosti homozigotne delecije gena *NAIP* po tipovima SMA

Klinički SMA tip	I	II	III	I, II, III
Delecije gena <i>NAIP</i> , n (%)	21 (36,2)	1 (2,9)	1 (7,1)	23 (21,5)
Bez delecije gena <i>NAIP</i> , n (%)	37 (63,8)	34 (97,1)	13 (92,9)	84 (78,5)
Broj pacijenata, n	58	35	14	107
Hi kvadrat test	$\chi^2 = 26,28$	df = 2		$p < 0,01$



**Slika 25.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti pacijenata sa i bez homozigotne delecije gena *NAIP* u okviru pojedinačnih tipova SMA.

#### 4.2.3 Komparativna analiza homozigotne delecije gena *SMN1* i *NAIP* i korelacija sa fenotipom pacijenata

Za uspostavljanje korelacije između veličine delecije i kliničke težine bolesti prvo je analiziran kombinovani homozigotni delecioni obrazac oba gena korišćenjem modela predloženog od strane Rodriguesa 1996. godine (Rodrigues i sar, 1996). Ovaj model je predstavljen u tabeli 12 koja prikazuje distribuciju osam mogućih genotipova

gena *SMNI* i *NAIP* u odnosu na SMA tip I, II i III u cilju uspostavljanja moguće genotip-fenotip korelacije. Obrazac uključuje *SMNI* egzon 7, *SMNI* egzon 8, *NAIP* egzon 5. Redosled gena je predstavljen prema modelu predloženom od Lefebvrea 1995. godine: cen-*SMNI*-*NAIP*-tel (Lefebvre i sar, 1995).

**Tabela 12 .** Analiza genotip-fenotip korelacije zasnovane na analizi homozigotnih delecija gena *SMNI* i *NAIP*

		Genotip:							
		Gen	A	B	C	D	E	F	G
	eg.7 <i>SMNI</i>	Del*	Del	Del	N	N	N	Del	N
	eg.8 <i>SMNI</i>	Del	Del	N	N	N	Del	N	Del
	<i>NAIP</i>	Del	N**	N	N	Del	N	Del	Del
Fenotip:	<b>SMA I</b> (n = 58)	21 (36,2%)	31 (53,4%)	2 (3,4%)	4 (6,9%)	0	0	0	0
	<b>SMA II</b> (n = 35)	1 (2,9%)	22 (62,9%)	2 (5,7%)	10 (28,6%)	0	0	0	0
	<b>SMA III</b> (n = 14)	1 (7,1%)	6 (42,9%)	1 (7,1%)	6 (42,9%)	0	0	0	0
	<b>Kontrole***</b> (n = 100)	0	0	0	99 (99,0%)	1 (1,0%)	0	0	0

\*Del – homozigotna delecija; \*\*N – bez homozigotne delecije; \*\*\*Kontrole – zdrave osobe koje nisu u srodstvu.

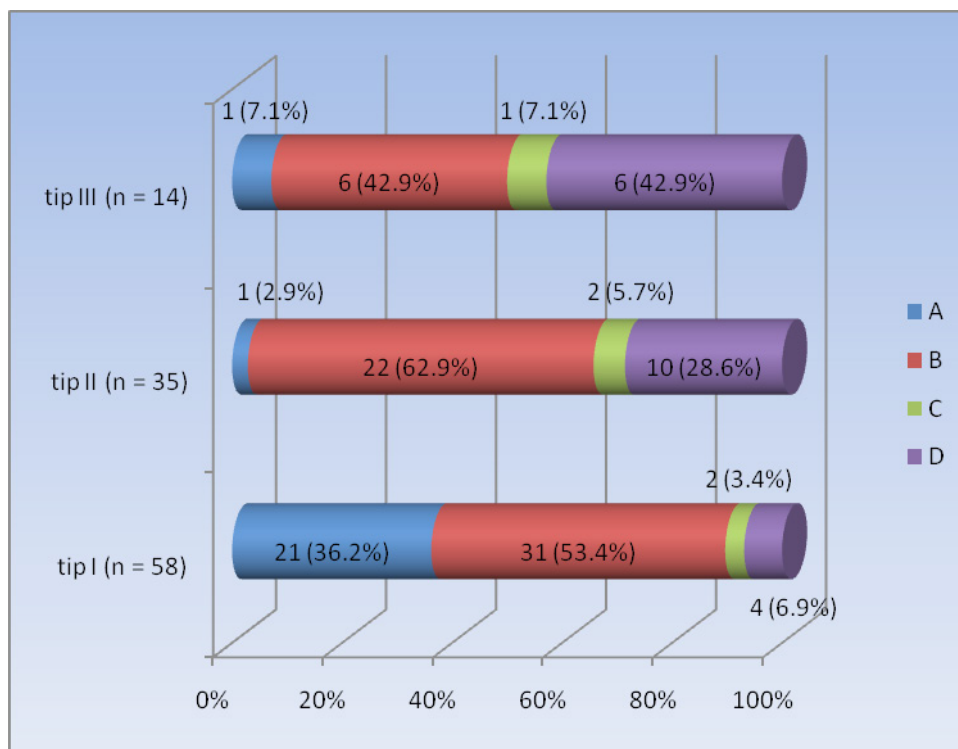
Analiziranih 107 SMA pacijenata iz Srbije su svrstani u četiri genotipa (tabela 12). Statistička analiza je pokazala da postoji visoko značajna razlika u distribuciji različitih genotipova u odnosu na fenotip pacijenata ( $p < 0.01$ ), pri čemu je najzastupljeniji genotip B, nezavisno od tipa, s obzirom da je uočen kod 59/107 (55,1%) analiziranih SMA pacijenata (slika 26).

Genotip A sa velikim delecijama svih analiziranih egzona gena *SMNI* i *NAIP* je nađen kod 21/58 (36,2%) analiziranih pacijenata sa SMA tip I. Proširena genska delecija je bila izuzetno retka kod pacijenata sa blažim fenotipom: 1/35 (2,9%) sa SMA tip II i 1/14 (7,1%) sa SMA tip III (tabela 12, genotip A).

Kod pacijenata sa blažim formama SMA sa većom učestalošću su se javljale manje delecije predstavljene sa genotipovima B i C (slika 26). Genotip B je u najvećem procentu — 22/35 (62,9%) detektovan kod pacijenata sa tipom II SMA. Genotip C, koji podrazumeva deleciju samo egzona 7, je bio prisutan kod 2/58 (3,4%) pacijenata sa SMA tip I i 2/35 (5,7%) pacijenata sa SMA tip II. Međutim, ovaj genotip je bio učestaliji u grupi bolesnika sa SMA tip III — 1/14 (7,1%) (tabela 12).

Genotip D (ni jedan ispitivan egzon nije deleciran) je bio najučestaliji kod pacijenata sa SMA tipom III — 6/14 (42,9%) u poređenju sa SMA tip I i II gde je ta učestalost iznosila 4/58 (6,9%), odnosno 10/35 (28,6%) (slika 26, tabela 12).

U uzorku od 107 analiziranih SMA pacijenata iz Srbije nisu uočene obolele osobe sa genotipovima E, F, G, ili H. Genotip E, koji označava homozigotnu deleciju samo egzona 5 gena *NAIP*, uočen je samo kod jedne zdrave osobe iz kontrolnog uzorka (tabela 12).

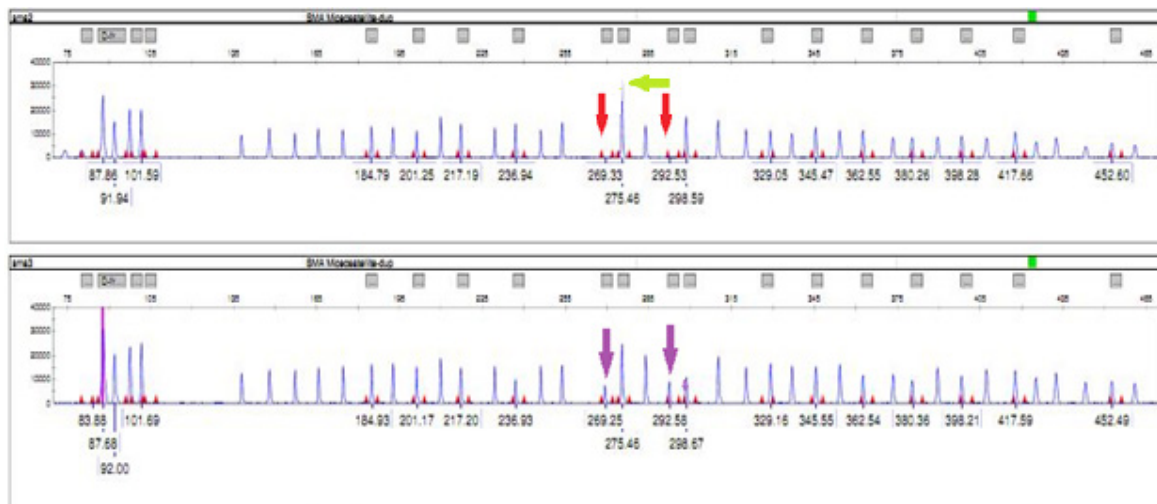


**Slika 26.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti nađenih genotipova (A, B, C i D) zasnovanih na analizi homozigotne delecije gena *SMNI* i *NAIP* unutar pojedinačnih tipova SMA.

### 4.3 Analiza broja kopija gena iz 5q13 SMA regiona i korelacija sa fenotipom pacijenata (MLPA metoda)

U ovom delu istraživačkog rada, ispitivan je eventualni uticaj broja prisutnih kopija svih gena iz 5q13 regiona na genotipsku varijabilnost, kao i fenotipsku ekspresiju bolesti kod SMA pacijenata u cilju otkrivanja potencijalnih gena modifikatora.

U ove svrhe korišćena je MLPA metoda, a MLPA set proba je dizajniran tako da omogućava simultanu analizu broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* (slika 27 i 28). Za ovu vrstu analize bilo je dostupno 30 pacijenata (15 dečaka i 15 devojčica), koji su imali predhodno dijagnostikovanu homozigotnu deleciju gena *SMN1*: kod 28/30 (93,3%) pacijenata je bila prisutna delecija oba ispitivana egzona (7 i 8), dok su 2/30 (6,7%) pacijenta imala samo deleciju egzona 7. MLPA metoda je potvrdila ove rezultate za gena *SMN1* (0 kopija za egzon 7 i 8 gena *SMN1*), a pored toga i pokazala da se kod 2/30 (6,7%) pacijenata prisutni egzon 8 gena *SMN1* javlja u 1 kopiji (tabela 13, pacijenti 15 i 24).



**Slika 27.** Elektroferogrami MLPA analize dva ispitivana pacijenta. Gore –SMA pacijent sa homozigotnom delecijom egzona 7 i 8 gena *SMN1* i amplifikacijom gena *SMN2* (umnožavanje gena – zelena strelica, homozigotna delecija gena (0 kopija) – crvene strelice); Dole-rođeni brat SMA pacijenta koji nosi deleciju egzona 7 i 8 jednog *SMN1* alela (1 kopija-ljubičasta strelica)

REZULTATI

	Probe target Info	Reference Samples							
		SMA 230R	SMA 232	SMA 239R	SMA 241	SMA 248	SMA 4R1	SMA 4R2	sma7
0	05-070283492 - SMN1-7	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.98	0.99	0.98
1	05-070284207 - SMN1-8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.02	1.02	1.10
2	05-070283492 - SMN2-7	0.96	0.85	1.00	0.90	0.89	0.99	0.99	1.06
3	05-070284207 - SMN2-8	1.13	1.08	1.06	1.15	1.10	1.01	1.01	1.07
4	05-068728004 - RAD17-17	0.93	0.99	0.91	1.06	0.86	0.98	0.97	0.99
5	05-070222765 - SERF1B-up	0.43	0.33	0.52	0.58	0.66	0.83	0.83	0.89
6	05-070286523 - SMN1-1	0.45	0.61	0.55	0.93	0.83	1.13	1.13	0.92
7	05-070274297 - SMN1-4	0.37	0.45	0.37	0.54	0.46	0.85	0.84	0.95
8	05-070277686 - SMN1-6	0.48	0.43	0.55	0.66	0.64	1.05	1.06	0.91
9	05-070284051 - SMN1-8	0.41	0.35	0.36	0.45	0.44	0.84	0.83	1.07
10	05-070311576 - NAIP-13	0.64	0.18	0.48	0.62	0.61	0.93	0.92	1.12
11	05-070342912 - NAIP-5	0.00	0.05	0.00	0.51	0.46	0.94	0.95	1.01
12	05-070379600 - GTF2H2-11	0.76	0.00	0.47	0.98	0.91	0.99	0.99	0.82
13	05-070388964 - GTF2H2-8	0.99	0.77	0.67	0.97	0.81	0.97	0.96	1.19
14	05-070392436 - GTF2H2-5	0.75	0.52	0.70	1.05	1.12	1.07	1.06	0.98
15	02-05088270 - Reference*	0.99	0.98	0.99	0.99	0.99	1.01	1.01	1.00
16	02-071430713 - Reference*	1.03	1.09	1.00	0.94	0.93	0.96	0.95	1.14
17	03-010163206 - Reference*	1.03	1.08	1.12	1.05	1.14	1.00	1.01	0.94
18	03-099790262 - Reference*	0.86	0.75	0.91	0.80	0.79	0.96	0.97	0.96
19	03-156388991 - Reference*	1.09	1.00	1.05	0.89	1.00	1.00	1.00	1.13
20	05-031341104 - Reference*	0.80	0.99	0.79	0.94	0.79	0.90	0.89	0.93
21	07-087012074 - Reference*	0.98	1.21	0.98	0.93	1.00	0.97	0.97	1.00
22	08-038434093 - Reference*	1.04	1.09	1.02	0.99	0.94	0.97	0.98	1.04
23	08-117726435 - Reference*	1.04	0.92	1.02	1.00	1.01	0.98	0.98	1.03
24	08-141781922 - Reference*	1.03	1.10	1.06	1.04	1.07	1.00	1.00	1.02
25	10-001411275 - Reference*	0.94	0.93	1.05	1.03	1.10	0.95	0.95	1.01
26	11-065185750 - Reference*	0.93	0.85	0.92	0.98	0.96	0.97	0.97	0.93
27	12-068835439 - Reference*	0.87	0.83	0.89	0.89	0.87	0.94	0.95	0.93
28	12-120977176 - Reference*	0.83	1.00	0.95	1.07	1.18	1.11	1.10	0.82
29	13-110169589 - Reference*	0.92	0.88	1.00	1.05	1.08	1.01	1.00	0.91
30	13-110755885 - Reference*	1.04	1.16	0.96	0.99	1.04	1.01	1.00	1.05
31	17-016792947 - Reference*	1.01	1.11	1.10	1.04	0.95	1.05	1.05	1.01
32	17-039013588 - Reference*	0.89	0.97	0.90	1.09	1.06	1.06	1.05	0.91
33	18-055720855 - Reference*	1.14	1.13	1.09	1.00	1.18	1.07	1.07	1.01
34	18-075328472 - Reference*	1.14	0.86	1.05	1.03	1.20	1.05	1.04	0.98
35	21-014675469 - Reference*	1.12	1.06	0.99	1.05	0.76	0.98	0.99	1.13
36	21-026191764 - Reference*	0.98	1.00	1.04	0.99	0.96	1.02	1.02	1.02

Slika 28. Primer analize broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* (*SERF1B*) tri pacijenta i tri normalne kontrole korišćenjem softvera *Coffalyser*: žuto – 0 kopija gena (homozigotna delecija gena); crveno – 1 kopija gena

Osnovne kliničke informacije kao i rezultati dobijeni MLPA metodom pojedinačnih gena su prikazani u tabeli 13. SMA tip I je dijagnostikovao kod 13/30 (43,3%) pacijenata (ž/m=8/5). Prosečna starost pojave prvih simptoma je bila 0,1 godina, u rasponu od 0,1 do 0,3, dok je prosečni životni vek bio 0,4 godina u rasponu od 0,2 do 0,7. Klinički tok je bio sličan kod svih pacijenata — ni jedan pacijent nije imao kontrolu glave i stabilnost trupa. U ovoj grupi sa SMA tip I, 3/13 (23,1%) pacijenata su bila na kućnoj mehaničkoj ventilaciji (MV) uz aspirator sekreta (tabela 13, pacijenti 10, 11, 12). SMA tip II je bio dijagnostikovao kod 12/30 (40%) ispitivanih pacijenata (ž/m=3/9). Prosečna starost pojave prvih simptoma je bila 0.8 godina u rasponu od 0.3 do 1.3 godina. Po jačoj snazi trupa se izdvajao 1/12 (8,3%) SMA tip II pacijenata — pored mogućnosti samostalnog sedenja oslanjao se na noge do 14. meseca uz podršku (tabela 13, pacijent 18). U okviru ove grupe 1/12 (8,3%) pacijent je imao perkutanu endoskopsku gastrostomu (PEG), bio je traheotomisan i imao aparat za kućnu MV (tabela 13, pacijent 15). SMA tip III je dijagnostikovao kod 5/30 (16,7%) (f/m=3/2). Prosečan uzrast pojave prvih simptoma je 3,2 godina u rasponu od 1 do 8 godina. Mogućnost hodanja su izgubila 2/5 (40%) pacijenata iz ove grupe — jedan sa 5, a drugi sa 10 godina.

REZULTATI

**Tabela 13.** Kliničke karakteristike i broj prisutnih kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* kod ispitivanih SMA pacijenata iz Srbije

Br	Tip SMA	Pol	Vreme pojave prvih simptoma	Maksimum motornih funkcija	Vreme smrti (s) ili poslednje kontrole (pk)	SMN1 (7/8)*	SMN2	NAIP	GTF2H2 (BTFp44)	SERF1B (H4F5)
1	I	m	na rođenju	bez kontrole glave	3. mesec(s)	0/0	2	1	2	2
2	I	ž	na rođenju	lice hipomimično, bez kontrole glave	4. mesec(s)	0/0	2	0	2	2
3	I	ž	na rođenju	bez kontrole glave/ bez stabilnosti trupa	8. mesec(s)	0/0	2	0	2	2
4	I	ž	3. mesec	bez kontrole glave	7. mesec(pk)	0/0	2	1	2	2
5	I	m	2. mesec	bez kontrole glave	4. mesec(s)	0/0	2	1	2	2
6	I	m	na rođenju	bez kontrole glave	5. mesec(s)	0/0	2	0	0	2
7	I	m	na rođenju	bez kontrole glave	3. mesec(s)	0/0	2	0	0	2
8	I	ž	na rođenju	bez kontrole glave/ teška hipotonija	4. mesec(s)	0/0	2	0	2	2
9	I	ž	na rođenju	bez kontrole glave	5. mesec(s)	0/0	2	1	2	1
10	I	ž	na rođenju	bez kontrolu glave / na kućnoj MV/ aspirator sekreta	4. mesec(pk)	0/0	2	0	0	1
11	I	m	na rođenju	bez kontrole glave/ klasifikovana kao Ia /na kućnoj MV**/ aspirator sekreta	2. mesec(s)	0/0	2	0	2	1
12	I	ž	na rođenju	bez kontrole glave/ klasifikovana kao Ia /bila na MV	3. mesec(s)	0/0	2	0	0	1
13	I	ž	na rođenju	bez kontrole glave	7. mesec(s)	0/0	2	0	1	1
14	II	ž	8. mesec	samo držala glavu	3.godine(pk)	0/0	2	1	1	2
15	II	ž	14. mesec	sedi od 9. meseca/ stajala i hodala uz držanje od 13.do 18.meseca/imala PEG***/traheoto- misana /ima aparat za kućnu MV	5.godina(pk)	0/1	3	1	2	2

REZULTATI

16	II	ž	4. mesec	imala kontrolu glave	2.godine(pk)	0/0	3	1	2	1
17	II	m	7. mesec	ima kontrolu glave/ sedi samostalno povijen napred	3.godine(pk)	0/0	3	1	2	2
18	II	m	15. mesec	lakši oblik/kontrola glave postignuta sa 4. meseca/sedi od 9,5. meseci/ oslanja se na noge uz držanje od 14. meseca	5.godina(pk)	0/0	4	2	2	2
19	II	ž	12. mesec	mogla da drži gla- vu, ali nije sedela	2.godine(pk)	0/0	2	1	2	1
20	II	m	8 mesec	držao glavu od 3. meseca/sedeo od 7. meseca nestabilno	4.godine(pk)	0/0	3	0	2	1
21	II	m	14. mesec	sedi od 9. meseca/ stajao i hodao uz držanje od 13. do 18. meseci	5.godina(pk)	0/0	3	1	1	1
22	II	m	12. meseca	mogla da drži gla- vu i stabilno sedi	3.godine(p)	0/0	3	1	1	1
23	II	m	9. meseca	ima kontrolu glave i kratkotrajno sa- mostalno sedi	2.godine(pk)	0/0	3	1	1	2
24	II	m	9. meseca	imao kontrolu glave i sedeo nestabi- lno sam	2.godine(pk)	0/1	3	2	2	2
25	II	m	oduvek usporen	ima kontrolu glave i samostalno sedi	4.godine(pk)	0/0	3	1	2	2
26	III	m	8. godina	hoda/ sada teže hoda uz i niz stepe- nice/ide u školu	14.godina(pk)	0/0	4	2	2	2
27	III	m	1. godina	hoda/ide u školu	7.godine(pk)	0/0	3	2	1	2
28	III	ž	7. godina	klasifikovan kao IIIb/ prestala da hoda sa 10,5/ide u školu	14.godina(pk)	0/0	4	2	2	2
29	III	ž	5. godina	hodala i trčala do 5. godina/ ide u školu/ u kolicima	9.godina(pk)	0/0	4	2	2	2
30	III	ž	3. godina	hoda gegavo/teže trči/ ne može da ustane iz čučnja bez pomoći/ide u školu	8.godina(pk)	0/0	3	1	1	2

\* ispitivani su egzoni 7 i 8 gena *SMN1* (egzon 7/egzon 8); \*\*MV-mehanička ventilacija; \*\*\*PEG— per-  
kutana endoskopska gastrostoma;\*\*\*

#### 4.3.1 Analiza broja kopija gena *NAIP* i njihova distribucije u odnosu na tip SMA

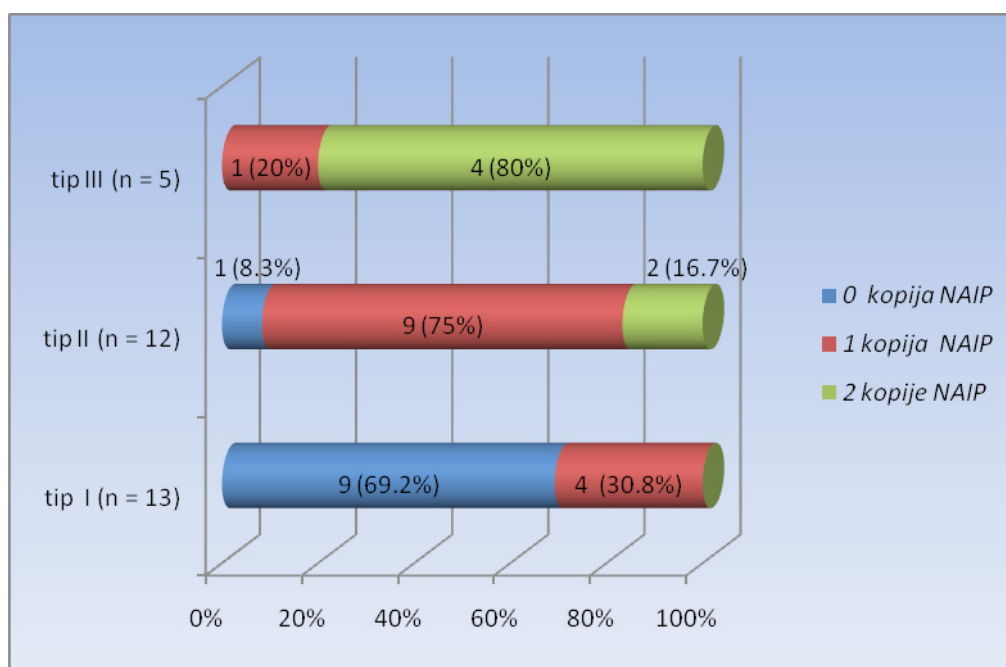
Analiza broja kopija ovog gena kod 30 analiziranih pacijenata je pokazala potpuno odsustvo (0 kopija) kod 10/30 (33,3%), jedna kopija je dijagnostikovana kod najvećeg broja ispitivanih pacijenta — 14/30 (46,7%), dok su dve kopije nađene kod 6/30 (20%) SMA pacijenata (tabela 14).

Statistička analiza, primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće, na ispitivanom uzorku pacijenata je pokazala visoko značajnu negativnu korelaciju između broja kopija ovog gena i fenotipa pacijenata ( $P=0$ ) (tabela 14, slika 29): potpuno odsustvo ovog gena (0 kopija) je bilo uočeno kod najvećeg broja pacijenata sa najtežim oblikom bolesti: SMA tip I – 9/13 (69,2%), dok je kod lakših oblika detektovano samo kod 1/12 (8,3%) pacijenata sa SMA tip II bolesti i ni jednog pacijenta sa SMA tip III. Jedna kopija je bila najučestalija u grupi SMA tip II pacijenata — 9/12 (75%), u poređenju sa 4/13 (30,8%) SMA tip I i 1/5 (20%) SMA tip III pacijenata. Dve kopije gena su bile daleko najučestalije u grupi SMA tip III pacijenata – 4/5 (80%), dok su iste uočene kod samo 2/12 (16,7%) pacijenata sa SMA tip II bolesti. Ovaj broj kopija nije detektovan ni kod jednog SMA tip I pacijenta (tabela 14, slika 29).

**Tabela 14.** Distribucija broja kopija gena *NAIP* u odnosu na tip SMA

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>Broj kopija NAIP</i>			<i>Total</i>
	0	1	2	
<b>Tip I</b>	9(69,2%)	4(30,8%)	0(0,0%)	<b>13</b>
<b>Tip II</b>	1(8,3%)	9(75,0%)	2(16,7%)	<b>12</b>
<b>Tip III</b>	0(0,0%)	1(20,0%)	4(80,0%)	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>10(33,3%)</b>	<b>14(46,7%)</b>	<b>6(20,0%)</b>	<b>30</b>
<b>Fisherov test tačne verovatnoće</b>				<b>P=0</b>





Slika 28. Grafički prikaz procentualne zastupljenosti broja kopija gena *NAIP* unutar pojedinih tipova SMA

#### 4.3.2 Analiza broja kopija gena *SMN2* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

Broj kopija gena *SMN2* se u ispitivanom uzorku od 30 pacijenata kretao u intervalu od 2 do 4 sa sledećim učestalostima: dve kopije gena su nađene kod polovine pacijenata ( 15/30 ili 50%), tri kopije kod 11/30 (36,7%), dok su četiri kopije bile prisutne kod 4/30 pacijenta (13,3%). Nije pronadjen ni jedan slučaj sa homozigotnom *SMN2* delecijom (tebela 15, slika 30).

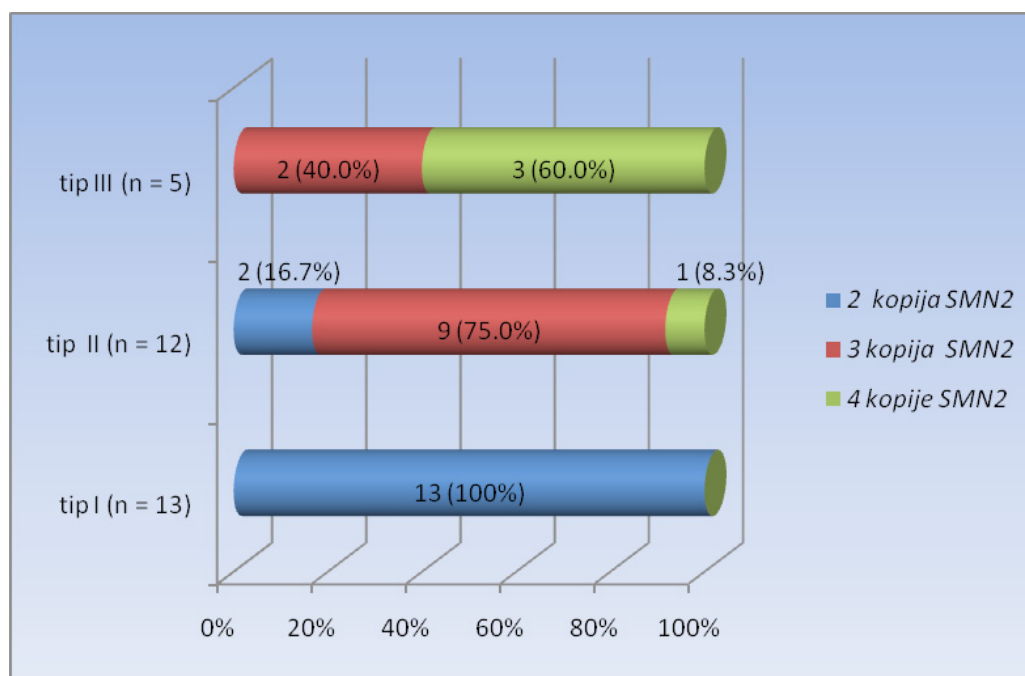
Nakon određivanja tačnog broja kopija gena *SMN2* u analiziranoj grupi SMA bolesnika, analiziran je njihov uticaj na kliničku sliku i ekspresiju bolesti. U grupi od 30 ispitivanih SMA pacijenata dve genske kopije su nađene kod svih analiziranih pacijenti sa akutnom formom -13/13 (100%) SMA tip I pacijenata u poređenju sa samo 2/12 (16,7%) analiziranih pacijenata sa SMA tip II i ni jednim SMA tip III pacijentom. Tri genske kopije su nađene kod 9/12 (75,0%) SMA tip II pacijenata i kod 2/5 (40%) pacijenata sa SMA tip III. Četiri genske kopije su bile najčešće kod najlakšeg oblika bolesti — detektovane su kod 3/5 (60%) analiziranih SMA tip III pacijenata u poređenju sa samo 1/12 (8,3%) analiziranih SMA tip II pacijenata. Primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće dobijena je statistički visoko značajna razlika ( $P=0$ ) distribucije *SMN2* broja kopija u odnosu na tipove SMA — broj kopija gena *SMN2* je bio značajno niži kod SMA tip I pacijenta nego kod SMA tip II/III pacijenata (tabela 15, slika 30).

## REZULTATI

Na osnovu broja *SMN2* kopija, koristeći Bayesovu formulu, u ispitivanoj grupi izračunat je procentualni posteriorni rizik za razvijanje određenog tipa SMA za pacijente sa *SMN1* homozigotnom delecijom. Rizik da pacijent razvije SMA tip I ukoliko ima 2 *SMN2* kopije iznosi 86,7%, da razvije SMA tip II ukoliko ima 3 kopije – 81,8%, dok pacijent sa 4 kopije ima rizik od 75% da razvije SMA tip III.

**Tabela 15.** Distribucija broja kopija gena *SMN2* u odnosu na tip SMA

Klinički SMA tip	Broj kopija <i>SMN2</i>			Total
	2	3	4	
<b>Tip I</b>	13(100,0%)	0(0,0%)	0(0,0%)	<b>13</b>
<b>Tip II</b>	2(16,7%)	9(75,0%)	1(8,3%)	<b>12</b>
<b>Tip III</b>	0(0,0%)	2(40,0%)	3(60,0%)	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>15(50,0%)</b>	<b>11(36,7%)</b>	<b>4(13,3%)</b>	<b>30</b>
<b>Fisherov test tačne verovatnoće</b>				<b>P=0</b>



**Slika 30.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti broja kopija gena *SMN2* unutar pojedinih tipova SMA

### 4.3.3 Komparativna analiza broja kopija gena *SMN1*, *SMN2* i *NAIP*

U grupi od 30 analiziranih pacijenata broj dobijenih kopija gena *SMN1*, *SMN2* i *NAIP* je kod svakog pacijenta zajedno upoređen sa prisutnim tipom SMA. Kao rezultat ove komparativne analize je dobijeno 6 mogućih genotipova prisutnih u analiziranoj grupi SMA bolesnika (tabela 16). Ovako sprovedena simultana analiza je pokazala da je manji broj kopija gena *NAIP* pratio i manji broj kopija gena *SMN2* kao i teža klinička slika:

— jedina dva genotipa kod SMA tip I pacijenata su bili: genotip 0 *SMN1* – 2 *SMN2* – 0 *NAIP* prisutan samo u ovoj grupi i detektovan kod 9/13 (69%) pacijenata ovog SMA tipa i genotip 0 *SMN1* – 2 *SMN2* – 1 *NAIP* detektovan kod preostala 4/13 (31 %) SMA tip I pacijenta

— osnovni genotip u grupi SMA tip II pacijenata je bio 0 *SMN1* – 3 *SMN2* – 1 *NAIP* s obzirom da je nađen kod 7/12 (58,3%) pacijenata

— kod SMA tip III je bio dominantan genotip 0 *SMN1* – 4 *SMN2* – 2 *NAIP* detektovan kod 3/5 (60%) SMA tip III pacijenata.

**Tabela 16.** Kombinovani genotipovi dobijeni na osnovu broja kopija gena *SMN2* i *NAIP* i njihova raspodela po različitim tipovima SMA

	Genotip <i>SMN1-SMN2-NAIP</i>	Pacijenti n (%)	Klinički tip SMA		
			Tip I	Tip II	Tip III
1	0-2-0	9 (30,0%)	9	0	0
2	0-2-1	6 (20,0%)	4	2	0
3	0-3-0	1 (3,3%)	0	1	0
4	0-3-1	8 (26,7%)	0	7	1
5	0-3-2	2 (6,7%)	0	1	1
6	0-4-2	4 (13,3%)	0	1	3
<b>Total</b>		30	13	12	5

#### 4.3.4 Analiza broja kopija gena *GTF2H2* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

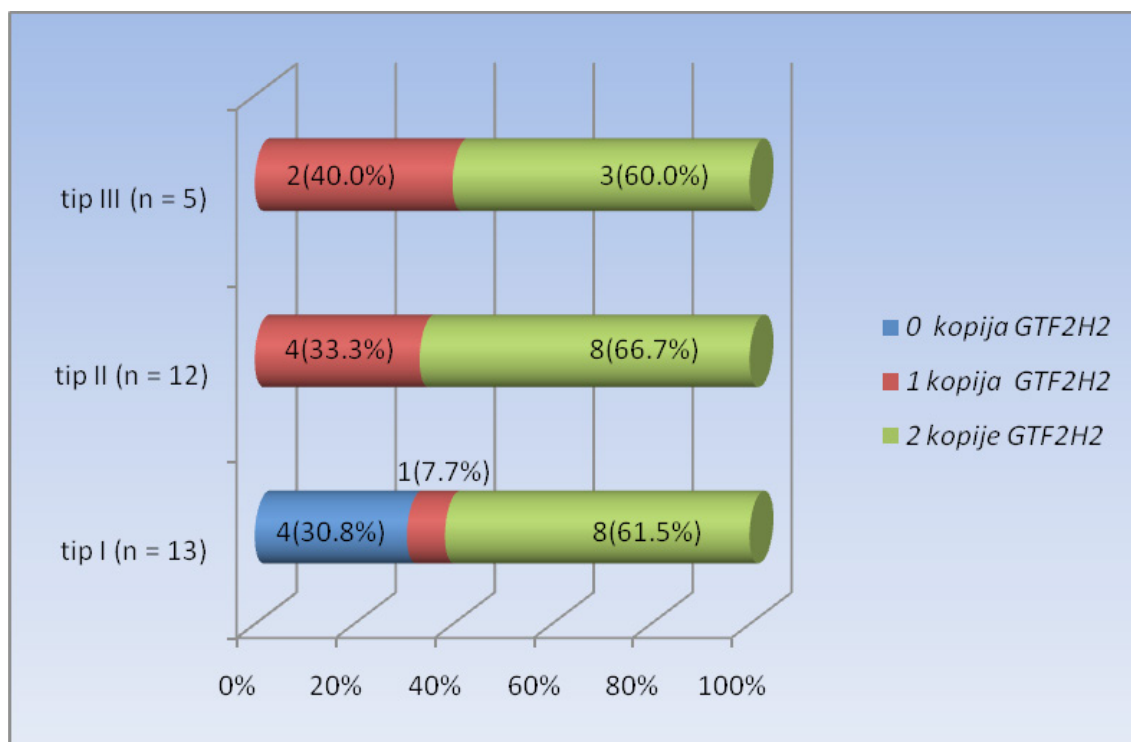
Primenjenim MLPA setom proba bilo je moguće analizirati i egzon 10 telomerne kopije i egzon 7 centromerne kopije gena *GTF2H2*. S obzirom da centromerna kopija, praćena probom specifičnom za egzon 7, nije pokazivala značajnije variranje u ispitivanom uzorku SMA pacijenata, analiziran je samo egzon 10 telomerne kopije ovog gena.

Homozigotna delecija gena *GTF2H2* je uočena kod 4/30 (13,3%) analiziranih pacijenata, dok je jedna kopija detektovana kod 7/30 (23,3%) pacijenata. Preostalih 19/30 (63,3%) pacijenata je imalo normalan broj kopija gena (tabela 17). Analiza distribucije po različitim tipovima SMA je pokazala da je većina pacijenata u sva tri tipa SMA imala normalan broj kopija ovog gena. U grupi analiziranih pacijenata sa SMA tip I kod 4/13 (30,8%) je nađeno potpuno odsustvo (0 kopija) ovog gena, dok je jedna kopija bila prisutna kod 1/13 (7,7%) pacijenata. Kod blažih oblika bolesti homozigotna delecija gena nije detektovana ni kod jednog pacijenta, dok je učestalost jedne kopije bila slična – 4/12 (33,3%) pacijenata sa SMA tip II i 2/5 (40%) pacijenata sa SMA tip III (tabela 17, slika 31).

Analiza rezultata primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji broja kopija gena *GTF2H2* u odnosu na tipove SMA ( $P=0.107$ ) (tabela 17, slika 31).

**Tabela 17.** Distribucija broja kopija gena *GTF2H2* u odnosu na tip SMA

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>Broj kopija GTF2H2</i>			<i>Total</i>
	0	1	2	
<b>Tip I</b>	4(30,8%)	1(7,7%)	8(61,5%)	<b>13</b>
<b>Tip II</b>	0(0,0%)	4(33,3%)	8(66,7%)	<b>12</b>
<b>Tip III</b>	0(0,0%)	2(40,0%)	3(60,0%)	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>4(13,3%)</b>	<b>7(23,3%)</b>	<b>19(63,3%)</b>	<b>30</b>
<b>Fisherov test tačne verovatnoće</b>				<b>P=0</b>



**Slika 31.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti broja kopija gena *GTF2H2* unutar pojedinih tipova SMA

#### 4.3.5 Komparativna analiza gena *GTF2H2*, *NAIP* i *SMN2*

Komparativna analiza gena *GTF2H2*, *NAIP* i *SMN2* je pokazala prisustvo sledećih mogućih genotipova kod analiziranih bolesnika sa SMA tip I, II ili III (tabela 18):

- sva četiri pacijenata koji su imalo potpuni nedostatak *GTF2H2* su ujedno imali i homozigotnu deleciju gena *NAIP* sa 2 kopije gena *SMN2* (genotip 0 *SMN1*-2 *SMN2*-0 *NAIP*) i bili su klinički dijagnostikovani kao SMA tip I
- jedna kopija gena, dijagnostikovana kod 7/30 pacijenata, se najčešće nalazila unutar genotipa 0 *SMN1*-3 *SMN2*-1 *NAIP*. U ovoj grupi 4/7 (57,1%) pacijenata su bila dijagnostikovana kao SMA tip II

**Tabela 18.** Kombinovani genotipovi na osnovu broja kopija gena *SMN2*, *NAIP* i *GTF2H2* i njihova raspodela po različitim tipovima SMA

	Genotip <i>SMN1-SMN2-NAIP- GTF2H2</i>	Pacijenti n (%)	Klinički tip SMA		
			Tip I	Tip II	Tip III
<b>1</b>	0-2-0-0	4(13,3%)	4	0	0
<b>2</b>	0-2-0-1	1(3,3%)	1	0	0
<b>3</b>	0-3-1-1	5(16,7%)	0	4	1
<b>4</b>	0-3-2-1	1(3,3%)	0	0	1
<b>5</b>	0-2-0-2	4(13,3%)	4	0	0
<b>6</b>	0-2-1-2	6(20,0%)	4	2	0
<b>7</b>	0-3-0-2	1(3,3%)	0	1	0
<b>8</b>	0-3-1-2	3(10,0%)	0	3	0
<b>9</b>	0-3-2-2	1(3,3%)	0	1	0
<b>10</b>	0-4-2-2	4(13,3%)	0	1	3
<b>Total</b>		30	13	12	5

#### 4.3.6 Analiza broja kopija gena *H4F5* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

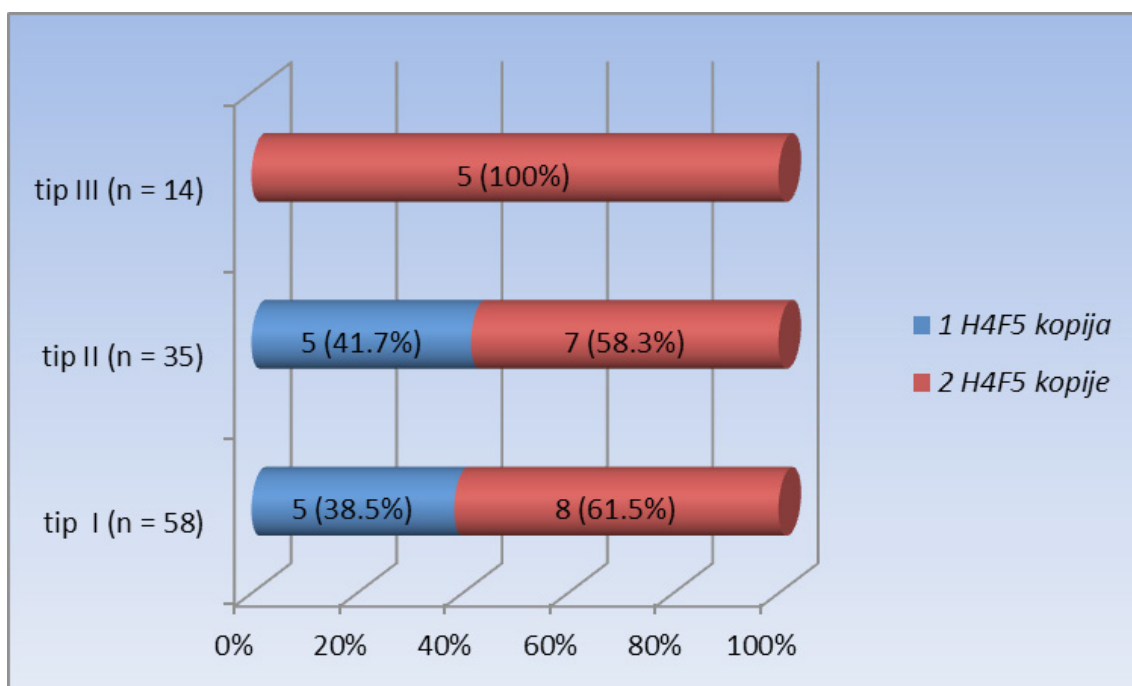
U invertovanom ponovku SMA regiona centralno je lociran gen *H4F5*, predstavljen sa *SERF1B* probom u korišćenom MLPA setu proba. U analiziranom uzorku nije pronađena homozigotna delecija ovog gena ni kod jednog od 30 ispitivanih *SMN1*-deletiranih pacijenata. Pored toga 10/30 (33,3%) pacijenata je imalo jednu kopiju dok su svi ostali (20/30 ili 66,7%) imali normalan broj kopija ovog gena (2 kopije) (tabela 19). U grupi pacijenata sa jednom kopijom ovog gena 5/13 (38,5%) je pripadalo SMA tipu I i 5/12 (41,7%) SMA tipu II. Svi analizirani SMA tip III pacijenti su imali normalan broj kopija ovog gena (tabela 18, slika 31). Primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće nije

pronađena statistički značajna razlika između broja kopija gena *H4F5* i učestalosti tipova SMA ( $P=0.268$ ) (tabela 19, slika 32).

S obzirom na prikazane rezultate, komparativna analiza sa rezultatima drugih ispitivanih gena nije pružila mogućnost formiranja ni jednog značajnog genotipa koji bi se tumačio sa aspekta uticaja na fenotip pacijenata, po uzoru na prethodno opisane. Iz tog razloga ovaj tip analize nije razmatran u ovom radu.

**Tabela 19.** Distribucija broja kopija gena *H4F5* u odnosu na tip SMA

<i>Klinički SMA tip</i>	<i>Broj kopija H4F5</i>		<i>Total</i>
	1	2	
<b>Tip I</b>	5(38,5%)	8(61,5%)	<b>13</b>
<b>Tip II</b>	5(41,7%)	7(58,3%)	<b>12</b>
<b>Tip III</b>	0(0,0%)	5(100,0%)	<b>5</b>
<b>Total</b>	<b>10(33,3%)</b>	<b>20(66,7%)</b>	<b>30</b>
<b>Fisherov test tačne verovatnoće</b>			<b>P=0,268</b>



**Slika 32.** Grafički prikaz procentualne zastupljenosti broja kopija gena *H4F5* unutar pojedinih tipova SMA

#### 4.4 Određivanje statusa heterozigotnih nosilaca *SMNI* delecije kod zdravih članova porodice obolelog i davanje genetičkog saveta

Primenom MLPA metode za određivanje broja kopija gena *SMNI* analizirano je 39 zdravih osoba u porodicama obolelih pacijenata, radi određivanja statusa heterozigotnog nosioca *SMNI* delecije i izračunavanja individualnih rizika za dobijanje obolelog potomstva. Uzorak su činili: 23 roditelja obolele dece, 8 rođenih sestara/braće (prethodni rizik da su nosioci iznosi 2/3), dva ujaka/strica (prethodni rizik da su nosioci iznosi 1/2) i 6 partnera iz opšte populacije koji planiraju potomstvo sa potencijalnim nosiocem (prethodni rizik da su nosioci iznosi 1/50). Radi lakše analize ispitanici su podeljeni u sledeće grupe:

- roditelji obolelog deteta koje nije dostupno za dalje analize (bez molekularno genetičke potvrde bolesti)
- partner iz opšte populacije, planira potomstvo sa osobom koja ima rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA
- bliski rođaci obolelog deteta sa homozigotnom delecijom gena *SMNI*

##### 4.4.1 Roditelji obolelog deteta koje nije dostupno za dalje analize (bez molekularno genetičke potvrde bolesti)

Analiza na status heterozigotnog nosioca *SMNI* delecije u ovoj grupi je obuhvatala 23 ispitanika koje je činilo 11 parova kao i jedan otac obolelog deteta koji ima novog partnera (tabela 20, slika 33). Kod 3/11 porodica status nosioca sa jednom kopijom gena *SMNI* je bio potvrđen kod jednog od roditelja, dok su kod drugog roditelja detektovane dve kopije gena (tabela 20, ispitanik 2). U jednoj porodici oba roditelja su imala dve kopije i naizgled nisu bili nosioci (tabela 20, ispitanik 3). Kod preostalih ispitanika status nosioca je potvrđen kroz detekciju jedne kopije gena *SMNI* (tabela 20, ispitanik 1). U odsustvu drugih informacija interpretacija rezultata dve prisutne kopije gena *SMNI* kod jednog ili oba roditelja obolelog deteta može biti problematična (tabela 20, ispitanici 2 i 3). Razlog je pre svega taj što procena rizika za status heterozigotnog nosioca, a samim tim i rizika za dobijanje obolelog potomstva, u ovakvim slučajevima u mnogome zavisi od toga da li je bolest kod probanda uopšte povezana sa genom *SMNI* i stoga će ova činjenica biti detaljnije razmatrana u diskusiji.



**Tabela 20.** Rezultati analize broja kopija gena *SMNI* i rizici za status nosioca SMA mutacije kod roditelja sa obolelim detetom bez molekularno genetičke potvrde bolesti

Ispitanici	Broj kopija <i>SMNI</i>		Status		Rizik (P1 i P2)	
	P1*	P2**	P1*	P2**	Prethodni	Finalni
1 7 porodica	1	1	nosilac	nosilac	1	1
2 3 porodice	1	2	nosilac	nije nosilac	1	P1=1 P2***
3 1 porodica	2	2	nije nosilac	nije nosilac	1	***
4 otac	1	/	nosilac	/	1	1

\*P1-partner 1; \*\*P2-partner 2; \*\*\*različite mogućnosti finalnog rizika za ove slučajeve će biti diskutovane

#### 4.4.2 Partner iz opšte populacije planira potomstvo sa osobom koja ima rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA

U ovoj grupi analizirano je šest osoba (tabela 21, slika 33). Status nosioca kroz prisustvo jedne kopije gena *SMNI* je potvrđen samo u 1/6 slučaja (tabela 21, ispitanik 6). Prisustvo dve kopije gena *SMNI* uočeno je kod preostalih 5/6 ispitanika (tabela 21, ispitanici 1-5) što ukazuje na to da oni nisu heterozigotni nosioci delecije ovog gena. Verovatnoća da su ove zdrave osobe ipak nosioci SMA mutacije ukoliko nemaju porodičnu SMA anamnezu i imaju dve kopije gena *SMNI* je izračunata primenom Bayesove analize u kojoj su korišćene učestalosti *SMNI* alela i genotipova iz objedinjene studije Oginoa i saradnika (tabela 22) (Ogino i sar, 2004b).

**Tabela 21.** Rezultati broja kopija gena *SMNI* i rizici za status nosioca SMA mutacijekod analiziranih partnera iz opšte populacije

Ispitanici	Broj kopija <i>SMNI</i>	Status	Rizik za nosioca	
			Prethodni	Finalni
1	2	nije nosilac	1/50	1/825
2	2	nije nosilac	1/50	1/825
3	2	nije nosilac	1/50	1/825
4	2	nije nosilac	1/50	1/825
5	2	nije nosilac	1/50	1/825
6	1	nosilac	1/50	1

Tabela 22. Učestalosti *SMNI* alela i genotipova (Ogino i sar, 2004b)

<i>SMNI</i> alel			Oznaka	Opšta populacija	Tip I <sup>a</sup>	Tip II <sup>a</sup>	Tip III <sup>a</sup>
'0-kopija' (bolest)			<i>a</i>	$1.32 \times 10^{-2}$	$1.33 \times 10^{-2}$	$1.32 \times 10^{-2}$	$1.30 \times 10^{-2}$
'1-kopija' (normalan)			<i>b</i>	$9.49 \times 10^{-1}$	$9.49 \times 10^{-1}$	$9.49 \times 10^{-1}$	$9.49 \times 10^{-1}$
'2— kopije' (normalan)			<i>c</i>	$3.78 \times 10^{-2}$	$3.78 \times 10^{-2}$	$3.78 \times 10^{-2}$	$3.78 \times 10^{-2}$
'1 <sup>D</sup> -kopija' (bolest) <sup>c</sup>			<i>d</i>	$2.41 \times 10^{-4}$	$1.52 \times 10^{-4}$	$2.78 \times 10^{-4}$	$4.09 \times 10^{-4}$
<i>Status</i>	<i>Genotip</i> <sup>b</sup>	<i>Broj kopija</i>	<i>Oznaka</i>	<i>Opšta populacija</i>	<i>Tip I</i> <sup>a</sup>	<i>Tip II</i> <sup>a</sup>	<i>Tip III</i> <sup>a</sup>
Nije-nosilac	'2+2'	4	<i>c</i> <sup>2</sup>	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.43 \times 10^{-3}$
	'2+1'	3	<i>2bc</i>	$7.18 \times 10^{-2}$	$7.18 \times 10^{-2}$	$7.18 \times 10^{-2}$	$7.18 \times 10^{-2}$
	'1+1'	2	<i>b</i> <sup>2</sup>	$9.00 \times 10^{-1}$	$9.00 \times 10^{-1}$	$9.00 \times 10^{-1}$	$9.00 \times 10^{-1}$
Nosilac	'2+1 <sup>D</sup> '	3	<i>2cd</i>	$1.83 \times 10^{-5}$	$1.15 \times 10^{-5}$	$2.10 \times 10^{-5}$	$3.09 \times 10^{-5}$
	'2+0'	2	<i>2ac</i>	$9.98 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-3}$	$9.95 \times 10^{-4}$	$9.85 \times 10^{-4}$
	'1+1 <sup>D</sup> '	2	<i>2bd</i>	$4.58 \times 10^{-4}$	$2.89 \times 10^{-4}$	$5.27 \times 10^{-4}$	$7.76 \times 10^{-4}$
Obolio	'1+0'	1	<i>2ab</i>	$2.50 \times 10^{-2}$	$2.52 \times 10^{-2}$	$2.50 \times 10^{-2}$	$2.47 \times 10^{-2}$
	'1 <sup>D</sup> +1 <sup>D</sup> '	2	<i>d</i> <sup>2</sup>	$5.82 \times 10^{-8}$	$2.31 \times 10^{-8}$	$7.70 \times 10^{-8}$	$1.67 \times 10^{-7}$
	'1 <sup>D</sup> +0'	1	<i>2ad</i>	$6.37 \times 10^{-6}$	$4.04 \times 10^{-6}$	$7.30 \times 10^{-6}$	$1.06 \times 10^{-5}$
	'0+0'	0	<i>a</i> <sup>2</sup>	$1.74 \times 10^{-4}$	$1.76 \times 10^{-4}$	$1.73 \times 10^{-4}$	$1.70 \times 10^{-4}$

<sup>a</sup> Relativne učestalosti alela za svaki SMA tip, koje se mogu koristiti kada je prisutan rizik za 1<sup>D</sup> alel zbog postojanja probanda sa klinički tipičnom SMA datog tipa. <sup>b</sup> Genotip je označen sa '(*SMNI* alel na jednom hromozomu 5)+(*SMNI* alel nadrugom hromozomu 5)'. <sup>c</sup> Alel koji označava kopiju gena sa tačkastom mutacijom (Ogino i sar, 2004b).

Uslovna verovatnoća da su ovakve osobe nosioci (što podrazumeva genotipove '2+0' i '1+1<sup>D</sup>') je  $(2ac+2bd)/(2ab+2ac+2bd+2cd)=0,0549$ . Udeo osoba sa dve *SMNI* kopije koje nisu nosioci iznosi:  $b^2/(b^2+2bc+c^2)=0,9247$ . Uzimajući za prethodni rizik da su ovakve osobe nosioci 1/50 (opšta populacija), Bayesova analiza je dala finalni rizik, tzv. relativnu verovatnoću, za status nosioca koji iznosi  $1/825^{70}$  (tabela 21).

70  $(1/50 \times 0.0549)/(0.0549 \times 1/50 + 0.9247 \times 49/50) = 1/825$

#### 4.4.3 Bliski rođaci obolelog deteta sa homozigotnom delecijom gena *SMN1*

Ovu grupu je činilo deset ispitanika od kojih su 8/10 bili rođeni braća/sestre, 1/10 ujak i 1/10 stric obolelog deteta (tabela 23, slika 33). U grupi analiziranih braća/sestara probanda sa homozigotnom *SMN1* delecijom kod 4/8 je detektovana jedna kopija gena *SMN1* pa je i status heterozigotnog nosioca delecije ovog gena bio potvrđen (tabela 23, ispitanici 1-4). Kod preostalih 4/8 braće/sestara obolelog deteta analiza je pokazala prisustvo dve kopije gena (tabela 23, ispitanici 5-8). U ovom slučaju grupa mogućih nosilaca je uključivala samo '2+0' genotip i iznosila je  $2ac/(2ab+2ac+2bd+2cd)$  ili približno 0,038. Koristeći prethodni rizik od 2/3 da su ovakve osobe nosioci i uslovnu verovatnoću da nisu nosioci sa dve kopije gena *SMN1* od 0,9247 izračunatu u prethodnoj grupi, Bayesova analiza je dala relativnu verovatnoću da je ova osoba nosilac od 0,076 ili približno  $1/13^{71}$  (tabela 23, ispitanici 5, 6 i 7). Kod 1/4 ispitanika sa dve kopije gena su testirani i roditelji i svaki od roditelja je nosio jednu kopiju ovog gena (tabela 23, ispitanik 8). S obzirom da ni jedan roditelj nema alel sa dve kopije gena, verovatnoća za '2+0' genotip proističe isključivo iz *de novo* stope mutacija kod ovog ispitanika. U ovom slučaju rizik da je ovakva osoba nosioc je praktično isključen samo na osnovu prisustva dve kopije gena *SMN1* dokazane kvantitativnom analizom.

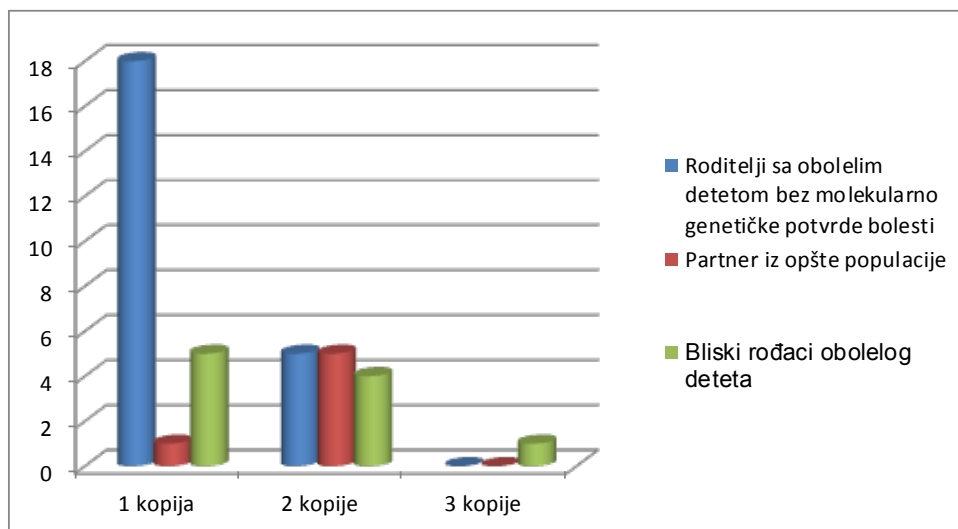
Kao što je navedeno u ovu grupu su svrstani i ujak i stric dva SMA deteta sa homozigotnom *SMN1* delecijom. Ujak je imao 3 kopije gena *SMN1* čime je bilo sa jedne strane potvrđeno da nije nosilac, a sa druge da na jednom alelu nosi dve kopije gena *SMN1* (tabela 23, ispitanik 9). Nasuprot njemu, MLPA analiza je pokazala da je stric imao jednu kopiju gena čime je njegov status nosioca potvrđen (tabela 23, ispitanik 10).

**Tabela 23.** Rezultati broja kopija gena *SMN1* kod bliskih rođaka obolele dece

Ispitanici	Broj kopija <i>SMN1</i>	Status	Prethodni rizik	Finalni rizik	
1	brat/sestra	1	nosilac	2/3	1
2	brat/sestra	1	nosilac	2/3	1
3	brat/sestra	1	nosilac	2/3	1
4	brat/sestra	1	nosilac	2/3	1
5	brat/sestra	2	nije nosilac	2/3	1/13
6	brat/sestra	2	nije nosilac	2/3	1/13
7	brat/sestra	2	nije nosilac	2/3	1/13
8	brat/sestra	2	nije nosilac	2/3	isključen kroz analizu roditelja*
9	ujak	3	nije nosilac	1/2	isključen
10	stric	1	nosilac	1/2	1

\*kod oba roditelja je detektovana po jedna kopija gena *SMN1*

71  $(2/3 \times 0.038) / (2/3 \times 0.038 + 0.9247 \times 1/3) = 1/13$



Slika 33. Broj kopija gena *SMNI* detektovan kod tri izdvojene grupe analiziranih pacijenata

#### 4.5 Prenatalna dijagnostika

Prenatalna analiza je urađena na 66 fetalna uzorka kod 44 porodice sa rizikom za dobijanje potomstva obolelog od SMA, primenom direktne PCR/RFLP metode za detekciju homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMNI*. U 12/44 porodica prenatalna dijagnostika je rađena dva puta, u 3/44 porodice tri puta i 1/44 porodica četiri puta. Slučaj 1/44 je bio dvojajčana blizanačka trudnoća (tabela 24). Fetalni uzorci su dobijeni biopsijom horionskih resica (CVS<sup>72</sup>) u 56/66 (84,8%) slučajaja; iz amnionske tečnosti (AF<sup>73</sup>) u 8/66 (12,1%) slučajeva i iz fetalne krvi dobijene kordocentezom (UCB<sup>74</sup>) u 2/66 (3,0%) slučajaja (tabela 24).

Tabela 24. Broj i tip prenatalnih analiza sprovedenih u ispitivanom uzorku rizičnih porodica

Broj ponavljanja PA*	Broj porodica	Broj fetalnih uzoraka	Tip PA, n(%)		
			CVS	AC	UCB
1	27	27	19 (70,4%)	6 (22,2%)	2 (7,4%)
2	12	24	22 (91,7%)	2 (8,3%)	0 (0,0%)
3	3	9	9 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
4	1	4	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
blizanci	1	2	2 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>66</b>	<b>56 (84,8%)</b>	<b>8 (12,1%)</b>	<b>2 (3,0%)</b>

\*PA— prenatalna analiza

72 CVS – eng. *chorionic villus sample* – uzorak horionskih resica

73 AF – eng. *amniotic fluid* – amnionska tečnost

74 UCB – eng. *umbilical cord blood* – krv iz pupčane vrpce

Analizirane porodice su klasifikovane u tri grupe:

- a. *Porodice sa najmanje jednim obolelim detetom sa potvrđenom homozigotnom delecijom gena SMNI.* U ovoj grupi, koja je obuhvatila 36 porodice, prenatalna dijagnoza je sprovedena na 56 fetalna uzorka od kojih je 11/56 (19,6%) bilo obolelo (tabela 25). Oba fetusa iz jednog slučaja blizanačke trudnoće su pripadala ovoj grupi i kod oba je detektovana delecija.
- b. *Porodice sa bar jednim obolelim detetom bez molekularno genetičke potvrde bolesti.* Ova grupa je uključila 5 porodica, a prenatalna dijagnoza je bila urađena na 7 fetusa. U ovom uzorku, 2/7 (28,6%) fetusa je bilo obolelo s obzirom da je kod njih dijagnostikovano prisustvo homozigotne delecije gena SMNI (tabela 25).
- c. *Porodice u kojima jedan od partnera ima porodičnu SMA anamnezu koja podrazumeva postojanje obolelog člana porodice sa homozigotnom SMNI delecijom.* U ovoj grupi, gde su klasifikovane 3 porodice, prenatalna dijagnoza je bila urađena na 3 fetalna uzorka i ni jedan od njih nije bio oboleo (tabela 25).

**Tabela 25.** Rezultati prenatalne analize sprovedene u ispitivanom uzorku rizičnih porodica

Grupa porodice	Broj porodica	Broj fetalnih uzoraka	Delecija SMNI egzona 7 i 8	Bez delecije SMNI egzona 7 i 8
<b>a</b>	36	56	11(19,6%)	45 (80,4%)
<b>b</b>	5	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)
<b>c</b>	3	3	0 (0,0%)	3 (100,0%)
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>66</b>	<b>13 (19,7%)</b>	<b>53 (80,3%)</b>

Udružena analiza sve tri grupe je pokazala da je homozigotna delecija gena SMNI bila prisutna kod 13/66 (19,7%) ispitivanih fetalnih uzoraka.

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 Analiza gena *SMN1* kod pacijenata obolelih od SMA

Od 1990. godine je poznato da su sve tri recesivne forme SMA povezane sa q13 regionom hromozoma 5. Prvo je delecija ovog regiona dovedena u vezu sa SMA, a 1995. godine je pronađen gen-uzročnik bolesti, nazvan gen *SMN* (Lefebvre i sar, 1995). Danas je poznato da nedostatak egzona 7 (samostalno ili zajedno sa egzonom 8) telomerne kopije gena *SMN* (*SMN1*) dovodi do SMA nezavisno od tipa bolesti. Detektovanje malih delecija i tačkastih mutacija u genu *SMN1*, kod pacijenata koji nisu nosili homozigotne delecije ovih egzona, je definitivno potvrdilo činjenicu da je gen *SMN* odgovoran za nastanak SMA (Wirth i sar, 2000).

Zahvaljujući ovim otkrićima, kao i ubrzanom razvitku novih molekularnih tehnologija, danas se sa sigurnošću može reći da DNK dijagnostički testovi predstavljaju najbolji i najpouzdaniji metod za identifikaciju mutacija koje uzrokuju 5q SMA i potvrdu kliničke dijagnoze.

#### 5.1.1 Detekcija homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMN1* (PCR/RFLP metoda)

Podaci dobijeni iz studija sprovedenih na SMA pacijentima iz različitih populacija širom sveta pokazali su da kod približno 94% SMA pacijenata izostaju obe kopije gena *SMN1* (Wirth, 2000). Upravo iz ovih razloga, prvi korak u ovom istraživačkom radu bio je određivanje učestalosti homozigotnih delecija egzona 7 i 8 gena *SMN1* kod 107 pacijenta obolelih od SMA iz Srbije. Pacijenti su prema težini kliničke slike bili svrstani u tri SMA tipa— SMA tip I, SMA tip II i SMA tip III. Kao i u drugim publikovanim studijama i u ovoj studiji SMA tip I je bio najučestaliji sa 54,2%, a potom slede SMA tip II sa 32,7% zastupljenosti i SMA tip III sa 13,1% zastupljenosti (tabela 7) (Pearn, 1973; Emery, 1991).

Za direktnu detekciju odsustva gena *SMNI* danas se koriste različite metode koje se zasnivaju na postojećim nukleotidnim razlikama između sekvenci egzona 7 i 8 telomerne i centromerne kopije ovog gena. U ovom radu je korišćena delimično modifikovana kvalitativna PCR/RFLP metoda, prvi put opisana od strane van der Steegea i saradnika, kojom se detektuje prisustvo/odsustvo egzona 7 i 8 gena *SMN* (van der Steege i sar, 1995). Promene pojedinih parametara omogućile su da se ovako modifikovanom metodom na brz, jednostavan i ekonomičan način može dijagnostikovati većina SMA pacijenata, tako da je ona rutinski primenljiva u svakodnevnoj laboratorijskoj dijagnostici. Zbog velike osetljivosti korišćenjem i manjih količina izolovane DNK njena primena je neprocenjiva i u prenatalnoj dijagnostici.

Rezultati dobijeni na ispitivanom uzorku SMA pacijenata iz Srbije, korišćenjem PCR/RFLP metode, su pokazali prisustvo homozigotne delecije gena *SMNI* kod 81% obolelih (87/107) (tabela 7). U radu Miskovic i saradnici ovi podaci su delom bili objavljeni (Miskovic i sar, 2011).

Dobijeni rezultati pokazuju nešto niže učestalosti homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi ispitanika iz Srbije u poređenju sa istim dobijenim u većini drugih Evropskih populacija (tabela 26). Ovakvi rezultati su međutim u saglasnosti sa učestalostima homozigotnih delecija u populacijama susednih zemalja: 74% u Hrvatskoj, 77% u Makedoniji i 85% u Bugarskoj (Sertic i sar, 1997; Jordanova i sar, 1998; Kocheva i sar, 2007). U ispitivanoj grupi delecija koja obuhvata oba egzona (7 i 8) je bila mnogo učestalija (~77%) od delecije samo egzona 7 (~5%) (tabela 9). I u drugim do sada objavljenim studijama delecija samo egzona 7 uočena je kod približno 7% SMA (Cobben i sar, 1995; Hahnen i sar, 1995; Rodrigues i sar, 1995).

Uprkos nižoj učestalosti, dobijeni rezultati pokazuju visok procenat zastupljenosti homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi SMA pacijenata analiziranih u ovoj studiji i stoga nedvosmisleno potvrđuju da delecija ovog gena predstavlja glavni uzrok SMA u Srbiji.

### **5.1.2 Distribucija homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi SMA pacijenata iz Srbije**

SMA pacijenti mogu pripadati različitim kliničkim fenotipovima koji se rangiraju od teških do blagih formi i klasifikovani su u tri tipa – SMA tip I, II i III. U cilju određivanja distribucije homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi SMA pacijenata iz Srbije izračunate su učestalosti detektovane delecije za svaki tip SMA. Dobijeni rezultati pokazuju da je prisustvo delecije najčešće u grupi klinički najtežih SMA tip I pacijenata (93,1%), u poređenju sa pacijentima sa blažim oblicima ove bolesti (71,4% kod SMA tip II i 57,1% za

SMA tip III) (tabela 8). Ovi rezultati su u saglasnosti sa publikovanim rezultatima u literaturi koji pokazuju da učestalost ove delecije u SMA tip I iznosi 92–100%, u SMA tip II 82–100% i u SMA tip III 78–100% (Cobben i sar, 1995; Hahnen i sar, 1995; Lefebvre i sar, 1995; Rodrigues i sar, 1995) (tabela 26). Prikazane sličnosti ili razlike u distribuciji homozigotne delecije gena *SMNI* detektovane u različitim grupama ispitivanih SMA pacijenata su verovatno u vezi sa različitim učestalostima *SMNI* alela koji dovode do bolesti u određenoj populaciji. Upravo iz ovog razloga, statistički značajnu razliku u učestalosti homozigotne *SMNI* delecije koja je dobijena u grupama pacijenata sa različitim tipovima SMA iz Srbije, moguće je objasniti prisustvom veće učestalosti nedeletiranih *SMNI* alela u našoj populaciji. Ovakav zaključak je naravno ispravan ukoliko bi kod svih pacijenata bez prisustva homozigotne delecije klinička reevaluacija pokazala da se zaista radi o SMA.

**Tabela 26.** Učestalosti homozigotnih delecija gena *SMNI* nađenih kod SMA tip I-III pacijenata

Reference	Tip SMA	Homozigotna delecije <i>SMNI</i> egzona (%)		
		Egzoni 7 i 8	Samo egzon 7	Bez delecije
<b>Lefebvre i sar, 1995</b>	I-III	93 (213/229)	6(13/229)	1 (3/229)
<b>Rodrigues i sar, 1995</b>	I	96 (49/51)	2(1/51)	2(1/51)
	II	93 (54/58)	5(3/58)	2 (1/58)
	III	84(26/31)	13 (4/31)	3 (1/31)
<b>Cobben et i sar, 1995</b>	I	92 (45/49)	0 (0/49)	8 (4/49)
	II	88 (30/34)	6 (2/34)	6 (2/34)
	III	90 (18/20)	5 (1/20)	5 (1/20)
<b>Hahnen i sar, 1995; Wirth i sar, 1999;</b>	I	91 (247/270)	7 (18/270)	7 (11/270)
	II	83 (103/124)	10 (13/124)	7 (8/124)
	III	68 (89/131)	15 (19/131)	18 (23/131)
<b>Velasco i sar, 1996</b>	I	96 (27/28)	4 (1/28)	0 (0/28)
	II	79 (22/28)	4 (1/28)	18 (5/28)
	III	89 (8/9)	11 (1/19)	0 (0/9)
<b>Simard i sar., 1997</b>	I	68 (19/22)	18 (1/22)	9 (2/22)
	II	100 (13/13)	0 (0/13)	0 (0/13)
	III	72 (18/25)	4 (1/25)	24 (6/25)
<b>Ukupno za svaki tip SMA</b>	I <sup>a</sup>	91 (379/418)	5 (21/418)	4 (18/418)
	II <sup>a</sup>	87 (222/257)	7 (19/257)	6 (16/257)
	III <sup>a</sup>	74 (159/216)	12 (26/216)	14 (31/216)
<b>Ukupno za sve tipove SMA</b>	I, II, III	87 (975/1122)	7 (79/1122)	6 (68/1122)

<sup>a</sup>Ove ukupne vrednosti isključuju podatke objavljene od strane Lefebvre i saradnika jer učestalosti nisu date za svaki tip SMA pojedinačno (Lefebvre i sar, 1995).



Dobijeni rezultati u ovom radu ipak ukazuju na to da je *SMNI* lokus deletiran kod većine SMA pacijenata nezavisno od težine bolesti. Pored toga, analiza distribucije delecije egzona 7 *SMNI* samostalno i delecije oba egzona 7 i 8 je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u tome koji tip delecije je prisutan u različitim SMA tipovima. Ovaj podatak potvrđuje da je nedostatak samo egzona 7 dovoljan da dovede do razvoja SMA bilo kog tipa.

### **5.1.3 Analiza broja kopija gena *SMNI* u grupi pacijenata bez homozigotne delecije ovog gena (MLPA metoda)**

Kao što je poznato, uzrok nastanka SMA u najvećem procentu pacijenata je prisustvo homozigotne delecije gena *SMNI*, dok su tačkaste mutacije mnogo ređe odgovorne za nastanak ove bolesti. Rezultati objavljeni u studiji Wirth i saradnika, dobijeni analizom 525 SMA pacijenata, pokazuju da je homozigotna delecija gena *SMNI* uočena kod 92% obolele dece, dok su tačkaste mutacije bile prisutne samo kod 3,4%, a kod 4,6% nije detektovana ni jedna mutacija (Wirth i sar, 1999). S obzirom na ovako visoku učestalost homozigotnih *SMNI* delecija, a u skladu sa Hardy-Weinberg ravnotežom, za većinu (99,7%) pacijenata se očekuje da nose bar jedan od homologih hromozoma sa  $\Delta 7SMNI$  alelom (Wirth i sar, 1999). Iz gore navedenih podataka može se zaključiti da bi pacijenti bez homozigotne delecije, a za koje ne postoje informacije o konsagvinitetu, trebalo da budu složeni heterozigoti koji nose deleciju gena *SMNI* na jednom homologom hromozomu i tačkastu mutaciju u genu *SMNI* na drugom.

Međutim, primenom samo PCR/RFLP metode ne mogu se otkriti složeni heterozigoti sa jednom *SMNI* kopijom, jer se oni ne mogu razlikovati od pacijenata sa dve kopije. U ove svrhe je neophodno sprovesti kvantitativnu analizu broja kopija prisutnog gena *SMNI*.

U analiziranoj grupi od 107 SMA pacijenata iz Srbije bez homozigotne delecije bilo je 20 pacijenata. Nakon ponovljenih kliničkih ispitivanja, kod 13 pacijenata bez homozigotne delecije dodatni klinički, elektromiografski i histopatološki podaci su potvrdili dijagnozu proksimalne SMA. S obzirom da se molekularne promene kod ovih SMA pacijenata ili ne mogu uočiti korišćenjem primenjene kvalitativne PCR/RFLP metode, ili se one nalaze van ispitivanih egzona, oni su dalje analizirani primenom

MLPA metode u cilju određivanja broja kopija egzona 7 i 8 gena *SMNI*. Tako je, kod 3/13 pacijenata iz ove grupe nađena jedna kopija gena i na taj način potvrđena heterozigotnost koja bi se i očekivala kod SMA pacijenata bez homozigotne delecije (tabela 10).

Preostalih deset pacijenata bez homozigotne delecije je imalo dve kopije gena *SMNI*. Uzimajući u obzir da je učestalost alela sa tačkastom mutacijom približno 1:3000, učestalost SMA pacijenata sa dve tačkaste mutacije bila bi približno 1:35000000. Na osnovu Hardy-Weinbergove ravnoteže se stoga može pretpostaviti da pacijenti sa 5q13-vezanom SMA koji imaju dva nedeletirana *SMNI* alela ne postoje u porodicama kod kojih nema podataka o konsagvinitetu (Wirth i sar, 1999). Iz tih razloga, kod pacijenata sa 2 (ili više) kopije *SMNI*, dijagnoza 5q-vezane SMA se praktično može isključiti (Feldkotter i sar, 2002). Zapravo identifikacija dve kopije *SMNI* kod bolesnih pacijenata se može tumačiti na dva načina. Prvi način je da ovakvi pacijenti imaju SMA koja nije vezana za 5q13-region, pa bi stoga trebalo razmatrati i druge poremećaje motornih neurona kao što su spinalna mišićna atrofija sa respiratornim distresom, X-vezana SMA, distalna SMA i juvenilna amiotrofična lateralna skleroza (Wilson i sar, 2003). Drugo moguće objašnjenje bilo bi da, kod pacijenata sa 2 kopije *SMNI*, i drugi geni, oni koji kodiraju SMN-interagujuće proteine, mogu biti odgovorni za razvoj fenotipa sličnog SMA (Wirth i sar, 2000).

#### **5.1.4 Detekcija tačkastih mutacija u egzonu 6 gena *SMN***

S obzirom da su podaci iz literature pokazali da je učestalost zdravih osoba sa jednom kopijom gena u opštoj populaciji približna učestalosti obolelih osoba sa *SMNI*-vezanom SMA koje imaju jednu kopiju gena (2% vs 3,4%), identifikacija jedne kopije gena u slučaju tri pacijenta nije predstavljala sigurnu potvrdu SMA dijagnoze (Wirth i sar, 1999). Iz tog razloga, jedini način da se kod ovih pacijenata potvrdi klinička dijagnoza SMA je identifikacija tačkaste mutacije u genu *SMNI*. Do danas je opisano više od 60 tačkastih mutacija u genu *SMNI*, ali broj SMA pacijenata bez homozigotne delecije koji nose intragenSKU *SMNI* mutaciju još uvek nije precizno definisan (Wirth i sar, 2000; Yu-jin i sar, 2012). Uzimajući u obzir ove činjenice, nešto nižu učestalost homozigotnih delecija gena *SMNI* detektovanu kod ispitivanih pacijenata iz Srbije, kao i statistički značajnu razliku u

učestalosti ove delecije u odnosu na tip SMA, analiza tačkastih mutacija je veoma važna u ovoj grupi. Tako, značaj ovih analiza bi se ogledao kako u konačnoj potvrdi dijagnoze tako i u preciznoj proceni rizika u ovim porodicama.

Iako su tačkaste mutacije raspoređene duž cele kodirajuće sekvence gena *SMN1* većina je lokalizovana u okviru visoko konzerviranog regiona egzona 6 (Hahnen i sar, 1997; Talbot i sar, 1997; Wirth i sar, 1999; Yu-jin i sar, 2012). S toga je u ovom radu ispitivana sekvenca ovog egzona u cilju identifikacije tačkastih mutacija kod tri pacijenta kod kojih je potvrđena heterozigotnost *SMN1* delecije.

Do danas opisane intragenske mutacije u genu *SMN1* su pripadale tipu malih delecija, inverzija, *non-sense*, *frameshift*, *missense* i *splice site* mutacija (Wirth, 2000). Sekvenciranje egzona 6 gena *SMN* primenjeno u ovoj studiji je otkrilo prisustvo c.821C>T (p.Thr274Ile) mutacije kod 2/3 analizirana pacijenta sa statusom heterozigotne delecije gena *SMN1*. Detektovana mutacija je po tipu *missense* mutacije i prvi put je opisana kod Hahnen i saradnika 1997. godine (Hahnen i sar, 1997). Ona je, posle p.Y272C *missense* mutacije, druga najčešća intragenska mutacija kod SMA pacijenata i do danas je identifikovana u mnogim populacijama (Hahnen i sar, 1997; Parsons i sar, 1998; Wirth i sar, 1999; Skordios i sar 2001; Sun i sar, 2005; Zapletalová i sar, 2007; Alias i sar, 2009).

U zavisnosti od položaja tačkaste mutacije u kodirajućoj sekvenci gena *SMN1* ona će imati i različit uticaj na funkciju proteina SMN, a samim tim i na kliničku sliku SMA. Pokazano je da većina *missense* mutacija redukuje kapacitet proteina SMN u samooligomerizaciji (Lorson i sar, 1998). c.821C>T (p.T274I) mutacija je lokalizovana na kraju egzona 6, u okviru YG dodekapeptidnog motiva gena *SMN*, u regionu koji je visoko konzerviran i stoga predstavlja važan funkcionalni domen proteina SMN. I pored toga, aminokiselinska promena izazvana ovom mutacijom (hidrofobni izoleucin je substituisan hidrofilnim treoninom), iako ima uticaj na funkciju proteina SMN, istu ne remeti značajno. Analize ove promene su pokazale samo malu redukciju u aktivnosti vezanoj za izgradnju Sm proteinskog kompleksa (Shpargel i sar, 2005). Tako, c.821C>T mutacija verovatno i korelira sa blažim fenotipskim karakteristikama kod SMA pacijenata (Lorson i sar, 1998). Oba ispitivana pacijenta kod kojih je identifikovana ova mutacija su i razvila SMA tip II što je u saglasnosti sa do sada objavljenim podacima po kojima se c.821C>T mutacija najčešće sreće kod blažih oblika SMA (SMA tip II i

SMA tip III) (Hahnen i sar, 1997; Parsons i sar, 1998; Skordios i sar 2001; Zapletalova i sar, 2007; Alias i sar, 2009).

Za interpretaciju rezultata ove analize važno je međutim imati u vidu da se primenjenim direktnim sekvenciranjem egzona 6 ne može odrediti da li ja inaktivirajuća mutacija u *SMN1* ili *SMN2* kopiji gena. Ukoliko je mutacija identifikovana kod obolelih osoba, da bi se tvrdilo da je ona zaista prisutna u *SMN1* kopiji neophodno je stoga:

- utvrditi da li je prema literaturnim podacima inaktivirajuća mutacija već opisana u genu *SMN1* ili
- koristiti druge metode koje omogućavaju specifičnu analizu *SMN1* kopije (Rudnik-Schoneborn i sar, 2012; Prior i Russman, 2013).

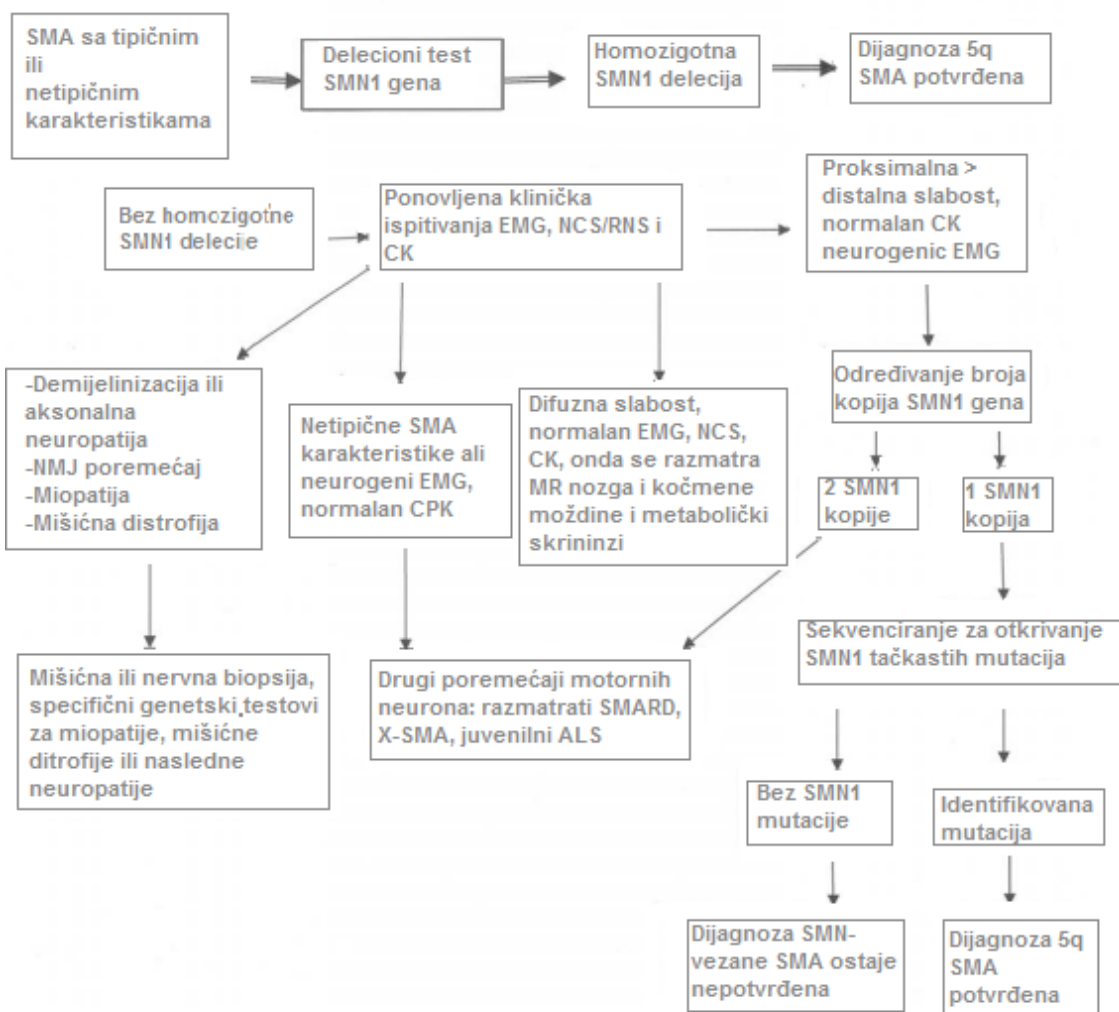
S obzirom da se radi o veoma čestoj mutaciji kod SMA pacijenata, i s obzirom na njenu korelaciju sa blažom kliničkom slikom kod ispitivanih pacijenata u ovoj studiji, može se zaključiti sa velikom sigurnošću da je ona locirana u prisutnoj *SMN1* kopiji. Samim tim ona predstavlja i potvrdu bolesti kod ispitanika.

Ukoliko se sekvenciranjem ne identifikuje ni jedna mutacija to je dovoljno za zaključak da intragenska mutacija nije prisutna u ispitivanoj kodirajućoj sekvenci gena *SMN1*. Kod SMA tip I pacijenta kod koga sekvenciranje egzona 6 nije pokazalo prisustvo nijedne mutacije, u cilju potvrde dijagnoze, neophodno je sekvencirati i ispitati ostale egzone gena *SMN1*.

Na osnovu svih iznetih rezultata analize gena *SMN1*, koji su dobijeni poštovanjem predloženog pristupa u dijagnostikovanju ovog oboljenja od strane Komiteta za standardizovanje nege SMA pacijenata<sup>75</sup>, može se zaključiti da u ispitivanoj populaciji SMA pacijenata iz Srbije mutacije u genu *SMN1* predstavljaju glavni uzročnik ove bolesti (slika 34).

---

75 eng. *Standard of Care Committee*— Komitet za standardizovanje nege SMA pacijenata



**Slika 34.** Dijagnostički algoritam za SMA i druge neuromišićne poremećaje. Na dijagramu su prikazani koraci u dijagnostičkoj proceduri kod pacijenata sa kliničkim simptomima SMA. EMG<sup>76</sup>; NCS<sup>77</sup>; RNS<sup>78</sup>; CK<sup>79</sup>; NMJ<sup>80</sup>; MRI<sup>81</sup>; SMARD<sup>82</sup>; X-SMA<sup>83</sup>; ALS<sup>84</sup> (Izvor: Wang i sar, 2007)

76 EMG – eng. *electromyography* — elektromiografija

77 NCS – eng. *nerve conduction study* — studija nervne provodljivosti

78 RNS – eng. *repetitive nerve stimulation* — repetitivna stimulacija nerva

79 CK – eng. *creatine kinase* — kreatinkinaza

80 NMJ – eng. *neuromuscular junction* — neuromišićna sinapsa

81 MRI – eng. *magnetic resonance imaging* — magnetna rezonanca

82 SMARD – spinalna mišićna atrofija sa respiratornim distresom

83 X-SMA – X-vezana SMA

84 ALS – amiotrofična lateralna skleroza

## 5.2 Analiza homozigotne delecije gena *NAIP* i njena korelacija sa fenotipom

Homogenost molekularne osnove nije u saglasnosti sa fenotipskom varijabilnošću SMA. Uprkos mnogim istraživanjima o različitoj fenotipskoj ekspresiji bolesti efekti mnogih potencijalno modifikujućih faktora i dalje su nejasni.

Varijabilnost fenotipa kod SMA pacijenata je u početku bila povezivana sa veličinom delecije u SMA regionu (Lefebvre i sar, 1995). Wirth i saradnici su u svojoj studiji tako i pokazali, korišćenjem analize mikrosatelitnih markera SMA regiona, da je veličina delecije povezana sa težinom kliničke slike (Wirth i sar, 1995). Izgledalo je da velike delecije, koje uključuju susedne gene, dovode do težeg oblika bolesti.

Paralelno sa otkrićem gena *SMN* u SMA kritičnom regionu identifikovan je i gen *NAIP* koji se dugo smatrao potencijalnim kandidatom za uzročnika SMA. Međutim vrlo brzo je otkriveno da odsustvo ovog gena nije dovoljno da dovede do razvoja bolesti, pa se on počeo dovoditi u vezu samo sa težinom njene fenotipske ekspresije. Ovo objašnjenje se smatralo verovatnim s obzirom da je gen lociran u SMA kritičnom regionu i da pripada grupi inhibitora apoptoze, tako da njegovo oštećenje može biti uključeno u gubitak motornih neurona kičmene moždine (Wang i sar, 1997).

S obzirom na gore navedene podatke, najveći broj studija u koje su bili uključeni SMA pacijenti iz različitih populacija je, osim analize gena *SMN*, paralelno istraživao i ulogu gena *NAIP* u SMA patogenezi. Ispitivanja su pre svega išla u pravcu učestalosti i distribucije homozigotne delecije ovog gena radi određivanja veličine delecije koja bi pored *SMN1* obuhvatila i *NAIP*. To je bio i jedan deo istraživanja u ovom radu.

### 5.2.1 Detekcija homozigotne delecije egzona 5 gena *NAIP* (PCR metoda)

Procena genotipa na osnovu veličine homozigotne delecije je kompleksna jer je definisanje strukture gena *NAIP* otežano zbog prisustva mnogobrojnih kopija njegovih degradovanih pseudogena u okviru SMA-kritičnog regiona. Kao i druge sekvence u okviru ovog regiona, broj kopija ovih pseudogena veoma varira od hromozoma do hromozoma. Region egzona 5–6 *NAIP* je jedini region gena koji obično nedostaje u kopijama pseudogena, tako da se sve analize sprovode praćenjem prisustva/odsustva egzona 5 ovog gena (Roy i sar, 1995).

U ovom istraživanju prisustvo/odsustvo homozigotne delecije je vršeno analizom egzona 5 gena *NAIP* korišćenjem PCR metode prvi put opisane od strane Roya i saradnika sa prajmerima specifičnim za ovaj egzon (Roy i sar, 1995). Prema literaturnim podacima učestalost ove delecije značajno varira među populacijama različitog etničkog porekla. Učestalost od 66-68% se sreće u populaciji pacijenata iz Španije, Finske, Turske i Kanade, dok je ova učestalost manja u Južnoj Africi, Kini, Slovačkoj, Japanu i kreće se od 17% do 40% (Rodrigous i sar, 1996; Velasco i sar, 1996; Chang i sar, 1997; Simard i sar, 1997; Erdem i sar, 1999; Stevens i sar, 1999; Zatkova i sar, 2000; Akutsu i sar, 2002). Značajno veća učestalost ove delecije je uočena u Arapskim populacijam u poređenju sa populacijama drugog etničkog porekla i ona iznosi i do 100% (El-Harouni i sar, 2001). Rezultati iz prikazane studije sprovedene na pacijentima iz Srbije su pokazali da 21,5% analiziranih SMA pacijenata ima, pored delecije gena *SMNI* i deleciju u genu *NAIP* (tabela 11). Ova učestalost je među najnižima do sada objavljenim, ali je slična učestalostima u zemljama u okruženju: 27% u Makedoniji, 15% u Hrvatskoj, 26% u Bugarskoj (Sertic i sar, 1997; Jordanova i sar, 1998; Kocheva i sar, 2007).

Prema objavljenim podacima delecije gena *NAIP* su uočene i u ~2% zdravih osoba bez bilo kakvih fenotipskih znakova SMA, što potvrđuje pretpostavku da odsustvo ovog gena samo nije dovoljno da dovede do nastanka bolesti (Lefebvre i sar, 1995). Dobijeni rezultati na uzorku ispitanika iz Srbije su u saglasnosti sa ovim literaturnim podacima, s obzirom da je *NAIP* delecija detektovana i kod 1% analiziranih osoba iz kontrolnih uzoraka.

### **5.2.2 Distribucija homozigotne delecije gena *NAIP* u grupi SMA pacijenata iz Srbije**

Prema podacima iz literature homozigotna delecija egzona 5 gena *NAIP* (specifičnog za telomernu, funkcionalnu kopiju gena) se prevashodno vezuje za najteži oblik bolesti jer je nađena u približno 50% tip I SMA pacijenata, dok je sa 18% prisutna kod SMA tip II i III pacijenata (Emery i sar, 1991; Lefebvre i sar, 1995; Roy i sar, 1995). I u studiji sprovedenoj na populaciji SMA pacijenata iz Srbije ispitivana delecija je povezana sa težinom kliničke slike. Naime, postoji statistički visoko značajna razlika u učestalosti delecije gena *NAIP* u odnosu na tip SMA ( $p < 0.01$ ). U populaciji pacijenta iz Srbije je

ovaj gen najčešće deletiran u grupi pacijenata sa SMA tip I (36,2%) što je u korelaciji sa drugim objavljenim podacima (tabela 11).

Prikazani rezultati dobijeni analizom gena *NAIP* u populaciji SMA pacijenata iz Srbije, iako niži, potvrđuju da se delecija gena *NAIP* dešava mnogo češće kod SMA pacijenata nego u zdravim kontrolama (21% vs 1%). Tako se nameće zaključak da je *NAIP* delecija povezana upravo sa *SMNI* – deletiranim hromozomom kod značajnog procenta SMA pacijenata. Uzimajući u obzir ovu činjenicu, kao i asocijaciju učestalosti delecije ovog gena i fenotipa pacijenata, dobijeni rezultati na ispitivanom uzorku jasno ukazuju na moguću ulogu gena *NAIP* u modifikaciji težine kliničke slike.

### **5.2.3 Komparativna analiza homozigotne delecije gena *SMNI* i *NAIP* i korelacija sa fenotipom pacijenata**

U cilju boljeg definisanja genotip — fenotip korelacije kroz određivanje veličine delecije, nakon pojedinačne analize homozigotne delecije gena *SMNI* i *NAIP*, analizirana je i učestalost homozigotnih delecija koje uključuju oba gena. U te svrhe su kreirani mogući genotipovi koji obuhvataju različite kombinacije prisustva/odsustva oba gena. Ovako sprovedena analiza je pokazala da postoji statistički značajna korelacija ( $p < 0,01$ ) između distribucije ovih genotipova u različitim fenotipskim grupama pacijenata.

Velika delecija koja obuhvata oba gena je nađena kod 23 pacijenta, sa daleko najvećom učestalošću u grupi SMA tip I pacijenata (genotip A, tabela 12). Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju na to da su velike delecije specifične za teži oblik SMA (Burlet i sar, 1996). Nasuprot tome, ovakva korelacija nije nađena kod pacijenata sa delecijama samo gena *SMN* (genotip B i C, tabela 12), s obzirom da je sličan delecioni obrazac prisutan u približno 50% naših pacijenata sa SMA tip I i nešto više od 50% pacijenata sa SMA tip II. Navedeni podaci pokazuju da se o genotip-fenotip korelacija ne može zaključivati samo na osnovu rezultata dobijenih analizom delecija gena *SMNI*, te da fenotipske razlike među ovim pacijentima mogu biti rezultat drugih genetičkih mehanizama.

Genotip C u prikazanoj studiji je najučestaliji u grupi pacijenata sa SMA tip III, odnosno nedostatak samo egzona 7 gena *SMNI* je najčešći kod najlakšeg oblika bolesti (tabela 12). Odsustvo samo egzona 7 se objašnjava činjenicom da je kod ovakvih pacije-



nata nedostatak gena *SMN1* nastao kao posledica genske konverzije koja rezultuje u himernom genu koji se sastoji od centromerne kopije egona 7 povezane sa telomernim egzonom 8 (Lefebvre i sar, 1995; Hahnen i sar, 1996b; van der Steege i sar, 1996; Campbell i sar, 1997; DiDonato i sar, 1997). Ovaj podatak se slaže sa otkrićem da genska konverzija *SMN1* u *SMN2*, koja za posledicu ima i povećanje broja *SMN2* kopija, dominira u blažim formama bolesti (Campbell i sar, 1997).

Rezultati dobijeni analizom pacijenata sa SMA tip III su pokazali da 42,9% ovakvih pacijenata nema delecije oba ispitivana gena (genotip D, tabela 12). Ovo je u saglasnosti sa podacima u literaturi koji navode da je učestalost alela vezanog za bolest bez delecionih mutacija najveća kod SMA tip III (Ogino i sar, 2002). Među ovim pacijentima su se nalazili i pacijenti kod kojih je potvrđena heterozigotnost (nosioci delecije jednog *SMN1* alela) (tabela 10). Međutim, značajan broj pacijenata je imao dve kopije ovog gena. Prema studiji Wirth i saradnika kod približno 1,9 % pacijenata sa tip I, 1,6% sa tip II i čak 13% tip III tipičnom SMA (uključujući i rezultate elektromiograma i mišićne biopsije), u osnovi bolesti stoje verovatno drugi geni, a ne gen *SMN1*. (Wirth i sar, 1999).

Genotip E (samo delecija gena *NAIP*) nije detektovan ni kod jednog SMA pacijenta, ali je detektovan je kod 1% kontrolnih uzoraka što govori u prilog već pomenutoj činjenici da prisustvo samo delecije ovog gena nije dovoljno da dovede do razvoja bolesti. Genotipovi F, G i H nisu uočeni među analiziranim pacijentima.

Ukupno, u ispitivanom uzorku najzastupljeniji genotip je tipa B, što još jednom potvrđuje činjenicu da su homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMN1* najučestalije kod SMA pacijenata nezavisno od tipa kao i da su mutacije u genu *SMN1* glavni uzročnik nastanka ove bolesti (tabela 12).

### **5.3 Analiza broja kopija gena iz 5q13 SMA regiona i korelacija sa fenotipom pacijenata (MLPA metoda)**

SMA kritični region se sastoji od dva slična segmenta – centromernog i telomernog. Gen *SMN1* je mapiran u telomernom, dok se njegov ekvivalent, gen *SMN2*, nalazi u centromernom segmentu. U ovom regionu postoji i nekoliko drugih gena: pored gena *NAIP* identifikovani su i geni *H4F5* i *GTF2H2*. SMA lokus kod čoveka je veoma kompleksan region koji uz pomenute gene sadrži i veći broj njihovih pseudogena i ponovljene

sekvence koji čitav region čine genetički nestabilnim i komplikuju njegovu analizu (Roy i sar, 1995; Bürglen i sar, 1997; Scharf i sar, 1998).

U ovom radu je je analiziran i broj kopija gena iz 5q13 regiona u uzorku od 30 SMA pacijenata iz Srbije, kod kojih je prethodno PCR/RFLP metodom dokazana homozigotna delecija gena *SMN1*. Za određivanje broja kopija gena iz SMA kritičnog regiona je korišćena MLPA metoda. Set proba primenjen u ovoj analizi, korišćenjem jednog para PCR prajmera, simultano amplifikuje do 38 različitih DNK sekvenci. Ovaj pristup je omogućio da se u jednoj reakciji detektuju jedinstvene sekvence egzona 7 i 8 *SMN1* i *SMN2* genske kopije, kao i njihove zajedničke sekvence u egzonima 1, 4, 6, i 8 (*SMN1* i *SMN2*). Pored toga u istoj reakciji su analizirani i lokusi u regionu oko gena *SMN* koji obuhvataju pored *NAIP* i druga dva gena, potencijalna modifikatora bolesti — *GTF2H2* i *H4F5* kao i 22 kontrolne sekvence čime se omogućava veća preciznost dobijenih rezultata.

Primenom ovog pristupa određivan je broj kopija gena *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* i njihova distribucija po različitim tipovima SMA. Pored toga nakon pojedinačne analize svakog gena sprovedena je i komparativna analiza gde su pojedinačni rezultati međusobno korelirani. Određivanjem broja kopija potencijalno modifikujućih gena iz SMA kritičnog regiona, omogućena je analiza uticaja ovih parametara na fenotip, kao i preciznije definisanje opsega delecije kako u homo– tako i u heterozigotnom stanju. Zahvaljujući svemu tome detaljnije je proučena veze između varjabilnosti genotipa SMA kritičng regiona i težine SMA.

Prema podacima dostupnim iz literature, u ovom radu su prvi put prikazani sveobuhvatni rezultati analize gena iz 5q13 regiona i njihovog uticaja na kliničku sliku SMA u uzorku pacijenata iz Srbije.

### **5.3.1 Analiza broja kopija gena *NAIP* i njihova distribucije u odnosu na tip SMA**

Rezultati dobijeni analizom gena *NAIP* u ispitivanom uzorku SMA pacijenata u ovom radu kao i rezultati sličnih studija, nedvosmisleno potvrđuju da je učestalost homozigotne delecije gena *NAIP* povezana češće sa težim oblicima SMA nego sa intermedijernom ili blagom formama bolesti. Shodno tome, većina ovakvih slučajeva nastaje kao rezultat delecija velikog obima, koje su veličine preko 70 kb i obuhvataju i *SMN1* i

gen *NAIP* (Abdelbasset i sar, 2012). Ovakvi podaci ipak ne potvrđuju da je gen *NAIP per se* povezan sa težinom bolesti, iako njegova delecije može biti prognostički indikator za SMA (Akutsu i sar, 2002).

Postoje dve mogućnosti koje mogu da objasne ulogu gena *NAIP* u SMA patogenezi:

- a) *NAIP* je slučajno deletiran zajedno sa *SMNI* kopijom, s obzirom da je lociran u neposrednoj blizini gena *SMN* i njegovo prisustvo ili odsustvo nema efekat na fenotip bolesti (Campbell i sar, 1997; Jedrzejowska i sar, 2009). Potvrda ovog stava je činjenica da je delecija egzon 5 gena *NAIP* uočena kod približno 2% SMA nosioca i stoga može biti povezana i sa normalnim fenotipom (Roy i sar, 1995).
- b) *NAIP* delecija može doprineti težini fenotipa stvarajući efekte koji se adiraju na onaj nastao kao posledica delecije gena *SMNI*. Ova pretpostavka je podržana različitim eksperimentalnim dokazima. Pre svega, *NAIP* ima homologiju u sekvenci sa bakulovirnim proteinom inhibitorom apoptoze i stoga se smatra da ima važne fiziološke funkcije (Roy i sar, 1995). Neki autori pretpostavljaju da gubitak funkcije gena *NAIP* sprečava inhibiciju masovne smrti nervnih ćelija na početku bolesti, dovodeći do težeg oblika bolesti (Liston i sar, 1996). Posmatrano zajedno navedeni podaci su u saglasnosti sa ulogom *NAIP* kao negativnog regulatora apoptoze motornih neurona što, kada je produkt gena *NAIP* deficitaran ili nedostaje, doprinosi težini SMA fenotipa (Wang i sar, 1997). Ova otkrića bi mogla biti od značaja za razjašnjenje potencijalne funkcionalne uloge ovog gena u SMA patogenezi.

Slično prethodnoj analizi gena *NAIP* PCR/RFLP metodom i određivanje broja kopija primenom MLPA metode u analiziranom uzorku SMA pacijenata je jasno pokazalo povezanost delecije ovog gena sa SMA. Odsustvo ili redukcije broja kopija (0 i 1 kopija) gena *NAIP* je detektovana kod čak 80% analiziranih SMA pacijentima nezavisno od tipa (tabela 14). Dalje, MLPA analiza je otkrila da većina SMA pacijenata iz Srbije, odnosno skoro polovina ili 46,7%, zapravo ima samo 1 kopiju ovog gena (tabela 14). Navedeni podaci su u saglasnosti sa literaturom u kojoj se navodi da se ovaj procenat kreće između 60% i 95% (Scarciolla i sar, 2006). Nešto niža učestalost homozigotne delecije gena *NAIP* ustanovljena prethodnom PCR analizom se stoga može objasniti kvalitativnom prirodnom metode.

Rezultati MLPA analize gena *NAIP* na ispitivanom uzorku od 30 pacijenata su takođe pokazali da se prosečan broj kopija gena *NAIP* značajno razlikuje između tri SMA tipa ( $p < 0.05$ ) tako što opada kod težih oblika bolesti. Približno 70% SMA tip I pacijenata nije imalo nijednu kopiju ovog gena, dok su preostali imali samo jednu kopiju. Nasuprot tome ni jedan pacijent sa SMA tip III nije imao 0 kopija gena *NAIP*, što je pokazano i u prethodnoj analizi baziranoj na PCR-u. Jedna kopija ovog gena se sreće daleko najčešće među pacijentima sa SMA tip II, dok su dve kopije prisutne kod većine SMA tip III pacijenata (tabela 14). Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da u analiziranoj grupi SMA pacijenata iz Srbije postoji jasna korelacija između broja kopija gena *NAIP* i SMA fenotipa. Prikazana negativna korelacija je u saglasnosti sa većinom do sada objavljenih studija u drugim populacijama koje su se bavile ovom problematikom (Campbell i sar, 1997; Wang i sar, 1997; Savas i sar, 2000; Akutsu i sar, 2002; Harada i sar, 2002; Arkblad i sar, 2006; Scarciolla i sar, 2006; Huang i sar, 2007; Tran i sar, 2008; Watihayati i sar, 2009; Amara i sar, 2012; He i sar, 2013).

Pošto je primenom MLPA metode moguće detektovati i heterozigotne delecije ovog gena, moguće je detektovati prisustvo velike delecije koje uključuju oba *SMN1* i gena *NAIP* na jednom alelu i male delecije koje uključuju samo *SMN1* na drugom alelu. Kao što je već pomenuto većina analiziranih SMA pacijenata sa homozigotnom *SMN1* delecijom u ovoj studiji, nezavisno od težine bolesti, pripada ovoj kategoriji (nose 1 kopiju gena *NAIP*) indikujući prisustvo gena na jednom hromozomu i njegovo odsustvo na drugom.

S obzirom da se manji broj kopija gena *NAIP* mnogo češće sreće među najteže obolelim pacijentima Taylor i saradnici su u svojoj studiji analizirali fenotip u grupi SMA tip I pacijenata (Taylor i sar, 1998) ali nisu dokazali povezanost prisustva ili odsustva gena *NAIP* sa uzrastom u kome se bolest javlja, niti sa dužinom preživljavanja pacijenata u ovoj grupi. Na osnovu toga autori zaključuju da je moguće da ovaj gen nema efekat na kliničku težinu bolesti unutar grupe pacijenata sa SMA tip I. I u ovom istraživanju se delimično došlo do sličnog zapažanja. Svi analizirani SMA tip I pacijenti nezavisno od gena *NAIP* su imali sličan klinički tok u smislu pojave prvih simptoma kao i dužine preživljavanja. Pacijenti kojima nedostaje gen *NAIP* su imali fenotip teškog oblika bolesti sa pojavom prvih simptoma odmah na rođenju uključujući i dva pacijenta koji su bili subklasifikovani kao Ia s obzirom na izuzetno tešku kliničku sliku (tabela 13, pacijenti 11

i 12). Nasuprot tome među četiri SMA tip I pacijenta koji imaju gen *NAIP* i koji takođe razvijaju težak oblik bolesti izdvajaju se dva pacijenta sa blažim kliničkim tokom i pojavom prvih simptoma nešto kasnije (od 2. i 3. meseca) (tabela 13, pacijenti 4 i 5). S obzirom na mali uzorak ne može se sa sigurnošću tvrditi da u prikazanoj grupi SMA tip I pacijenata postoji povezanost između nedostatka gena *NAIP* i rapidnog pogoršanja bolesti.

### 5.3.2 Analiza broja kopija gena *SMN2* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

Fenotipska varijabilnost SMA danas se najviše povezuje sa različitim brojem prisutnih kopija gena *SMN2* (Burghes i sar, 1997). Nekoliko grupa je testiralo ovu hipotezu koristeći različite tehnike, uključujući ispitivanje delecija alela višestruko kopiranog markera C272, koji je sadržan u okviru 5' kraja svakog gena *SMN* (DiDonato i sar, 1994; Melki i sar, 1994; Lefebvre i sar, 1995; Wirth i sar, 1995). Korelacija prisustva manje C272 alela kod SMA tip I pacijenata u poređenju sa tipovima II i III sugerise da je smanjen broj kopija C272 alela (samim tim i gena *SMN*) u asocijaciji sa težinom kliničke slike (Campbell i sar, 1997). Poslednjih godina, naglim razvojem novih tehnika za kvantitativno određivanje broja prisutnih kopija gena, utvrđeno je da je kod pacijenata sa SMA koji nose homozigotnu deleciju ili drugu mutaciju *SMN1*, težina bolesti pod jakim uticajem broja kopija gena *SMN2*. Prema podacima iz literature pacijenti sa teškom formom bolesti obično imaju 1 ili 2 kopije, oni sa srednje teškim oblikom imaju 2 ili 3 kopije, i oni sa najblažim oblikom imaju 3–4 ili čak 5 ili 6 kopija gena *SMN2* (Lefebvre i sar, 1995; Campbell i sar, 1997; DiDonato i sar, 1997; Wirth i sar, 1999; Feldkötter i sar, 2002; Mailman i sar, 2002; Yamashita i sar, 2004). Međutim distribucija broja kopija kod SMA tip I pacijenata varira zavisno od selekcije pacijenata. Udeo pacijenata sa jednom *SMN2* kopijom se kreće od 0% u manjim serijama do 7%, 10% i 19%. SMA I pacijenti sa tri *SMN2* kopije su uočeni kod 4%, 10% i 20% pacijenata zavisno od inkluzionog kriterijuma. Pri tome, SMA tip I pacijenti sa četiri *SMN2* kopije još nikada nisu opisani. Iako ogromna većina SMA tip II pacijenata ima tri *SMN2* kopije, postoje podaci mnogih studija da prisustvo tri kopije može rezultovati i u SMA tip I (sa dužim životnim vekom), SMA tip II ili SMA tip III fenotipu (Rudnik-Schoneborn i sar, 2009).

U analiziranom uzorku SMA pacijenata iz Srbije, broj prisutnih *SMN2* kopija u SMA regionu pokazuje jasne razlike između ispitanika različitih fenotipova. Broj kopija

*SMN2* kod SMA tip II-III je bio značajno viši nego onaj kod SMA tip I pacijenata: dok su svi pacijenti sa SMA tip I imali dve kopije gena *SMN2*, SMAII i SMA III su imali tri ili četiri kopije *SMN2* (tabela 15). Među SMA tip II pacijentima su dominirale tri kopije gena izuzev kod pacijenta broj 18 (tabela 13) koji je imao četiri kopije gena *SMN2* i razlikovao se od drugih SMA tip II pacijenata po tome što je bio znatno snažniji u gornjem delu tela. U tom smislu on je više ličio na SMA tip III fenotip.

Prikazani rezultati kvantitativne analize na uzorku SMA pacijenata iz Srbije su jasno pokazali da je fenotip bolesti na analiziranoj grupi pod jakim uticajem broja kopija gena *SMN2* s obzirom na to da postoji statistički značajna negativna korelacija između broja kopija ovog gena i težine bolesti ( $p < 0.01$ ). Ovaj zaključak je u saglasnosti sa prethodnim studijama iz drugih etničkih grupa (tabela 27).

**Tabela 27.** Rezultati distribucije broja *SMN2* kopija kod SMA pacijenata sa homozigotnom delecijom gena *SMN1* dobijeni u različitim studijama

Autori	Zemlja	Tip I			Subtotal	Tip II			Subtotal	Tip III			Subtotal	Total
		1-kopija	2-kopije	3-kopije		2-kopije	3-kopije	4-kopije		2-kopije	3-kopije	4-kopije		
Feldkötter i sar, 2002	Nemačka	13	138	37	188	12	90	8	110	3	39	35	77	375
Gérard i sar, 2000	Francuska	0	5	5	10	0	4	0	4	0	1	2	3	17
Mailman i sar, 2002	SAD	7	43	2	52	-	-	-	-	0	70	20	90	142
Ogino i sar, 2003	SAD	3	13	0	16	1	6	1	8	0	3	1	4	28
Vitali i sar, 1999	Italija	0	3	2	5	0	7	0	7	0	1	4	5	17
<b>Total</b>		23	202	46	271	13	107	9	129	3	114	62	179	579

Na osnovu rezultata ovog i sličnih istraživanja može se zaključiti da su kod SMA tip II i III pacijenata PCR/RFLP analizom detektovane mutacije (prethodno klasifikovane kao delecije) verovatnije rezultat događaja u čijoj je osnovi genska konverzija. Ovaj događaj kroz konverziju *SMN1* u *SMN2* dovodi do povećanja broja *SMN2* kopija, samim tim i do povećanja udela kompletnog transkripta koji kompenzuje nedostatak gena *SMN1* i tako je u korelaciji sa težinom bolesti (Campbell i sar, 1997; Chen i sar, 2011). Na ovaj

način, pacijenti ne poseduju funkcionalni gen *SMN1* iako se fizički nije dogodila delecija sekvence DNK. Burghes i saradnici su stoga predložili da teška forma bolesti može biti uzrokovana prisustvom prave delecije u SMA region, dok blaži oblici nastaju konverzijom *SMN* formi (Burghes i sar, 1997).

Ipak, pacijenti sa SMA tip I i tip II-III mogu imati i identičan broj kopija gena *SMN2*. U analiziranom uzorku SMA pacijenata iz Srbije u grupi pacijenata sa SMA tip II, pored onih sa tri kopije gena, uočen je i pacijent sa četiri, kao i dva pacijenta sa dve kopije ovog gena. Iako je broj kopija *SMN2* u korelaciji sa težinom bolesti, verovatno je da same *SMN2* kopije nisu funkcionalno ekvivalentne i produkuju različite količine potpuno funkcionalnog proteina SMN (Harada i sar, 2002). Takođe, kod nekih SMA pacijenata za razvoj kliničke slike mogu biti važniji drugi genetički faktori. Stoga su Feldkoter i saradnici sumirali moguće razloge zbog kojih ova korelacija nije apsolutna:

- delovanje modifikujućih gena ili drugih spoljnih faktora
- intragenske mutacije u genu *SMN2*
- geni *SMN2* su parcijalno deletirani ili duplicirani kao rezultat delecija ili genskih konverzija koje uključuju bilo 5' ili 3' kraj gena *SMN* (Feldkoter i sar, 2002).

U vezi sa prethodno navedenim, Prior i saradnici su 2009. godine opisali tri SMA pacijenta koja nisu u srodstvu i kod kojih broj kopija gena *SMN2* nije bio u očekivanoj korelaciji sa dijagnostikovanim blažim fenotipom. Analizom sekvence uočeno je prisustvo bazne supstitucije c.859G>C (p.Gly287Arg) u egzonu 7 kopije gena *SMN2* za koju je pokazano da stvara novi ESE element. Formiranjem ovog elementa povećavao se i stepen iskrajanja egzona 7, a samim tim i količina FL transkripta koji nastaje sa *SMN2* i kao posledica toga razvijao se i manje težak oblik bolesti. Ovi podaci potvrđuju da se SMA fenotip može modifikovati ne samo brojem *SMN2* kopija već i varijantama u sekvenci gena *SMN2* koje mogu imati pozitivan, ali na sličan način i negativan efekat na proces *SMN2* transkripcije i translacije (Prior i sar, 2009).

U analiziranom uzorku od 30 pacijenata iz Srbije sa homozigotnom delecijom gena *SMN1* nije uočena ni jedna osoba koja je imala 0 ili 1 *SMN2* kopiju. Nizak procenat pacijenata sa samo jednom kopijom gena *SMN2* je u saglasnosti sa rezultatima iz prethodnih studija (9/375 u studiji Feldkötter i saradnika, i 7/142 u studiji Mailman i saradnika) (Feld-

kötter i sar, 2002; Mailman i sar, 2002). Objašnjenje ovog fenomena se nalazi u činjenici da bi odsustvo obe *SMN1* i *SMN2* kopije bilo letalno *in utero*, po analogiji sa animalnim modelima za SMA<sup>85</sup> i u skladu sa tim do danas nije opisana ni jedna osoba koja ima potpuni nedostatak obe kopije gena (Schrank i sar, 1997). Sa druge strane pacijenti sa gubitkom oba *SMN1* alela i samo jednom *SMN2* kopijom ne žive više od jednog meseca (Tran i sar, 2008). Ni jedan od analiziranih pacijenata nije odgovarao tako teškom fenotipu.

U literaturi je opisana i značajna korelacija između *SMN2* broja kopija i vremena preživljavanja (Feldkoter i sar, 2002). Tako autori zaključuju da broj *SMN2* kopija utiče na dužinu preživljavanja u grupi obolelih sa kliničkom slikom SMA tip I: pacijenti sa jednom kopijom *SMN2* žive <11 meseci, oni sa dve kopije *SMN2* žive (osim za par slučajeva) <21 meseci i oni sa tri *SMN2* kopije žive do 33–66 meseci. Na uzorku pacijenata iz Srbije sva deca koja su razvila SMA tip I su imala isti broj kopija (2 kopije) *SMN2* tako da ovaj vid korelacije nažalost nije bilo moguće ispitati.

Na osnovu rezultata ovog rada, kao i dostupnih podataka iz literature, može se zaključiti da broj kopija gena *SMN2* predstavlja pouzdan prognostični faktor. Iako različiti genetički faktori (modifikujući geni, eksterni faktori, intragenske *SMN2* mutacije ili nekompletne *SMN2* kopije) mogu uticati na SMA fenotip, rizik za dete sa homozigotnom *SMN1* delecijom da razvije određeni SMA tip se može pouzdano predvideti na osnovu detektovanog broja *SMN2* kopija. Na osnovu analize 30 SMA pacijenata u ovom radu izračunat je posteriorni rizik za razvijanje tip I, II ili III SMA: dete sa dve *SMN2* kopije će mnogo verovatnije razviti težak oblik (tip I SMA) sa rizikom od 86,7%. Dete sa tri kopije ima rizik od 81,8% da razvije tip II SMA, dok dete sa četiri kopije ima rizik od 75% da razvije tip III SMA. U saglasnosti sa ovim procenama je tako i hipoteza izneta u predhodnim studijama da pacijenti koji nose jednu *SMN2* kopiju neće razviti tip III SMA, dok pacijenti sa četiri *SMN2* kopije neće razviti tip I SMA (Feldkoter i sar, 2002).

Impresivan napredak je postignut poslednjih godina u razumevanju molekularne osnove SMA. Pronalazak lekova koji povećavaju sintezu potpunog *SMN2* transkripta, kao i progres u pronalaženju mnogih drugih, nagoveštava u bliskoj budućnosti mogućnost terapije i lečenja pacijenata sa SMA. Posmatrajući terapiju SMA sa ovog aspekta, u budućnosti se može razmatrati čak i skrining novorođenčadi sličan onom koji se sprovodi za fenilketonuriju. Otkrivanje dece sa homozigotnim nedostatkom gena *SMN1* odmah na rođenju bi tada

---

85 *Smn knockout* miševi ispoljavaju embrionsku letalnost



bilo od velikog značaja za započinjanje lečenja pre nego što dođe do oštećenja motornih neurona i pojave prvih simptoma. Pored toga, određivanje broja prisutnih *SMN2* kopija kod ovakve dece bi bio ključni preduslov za otpočinjanje i vrstu terapije, koja može varirati u zavisnosti od utvrđenog broja kopija gena *SMN2* (Wirth, 2000).

### 5.3.3 Komparativna analiza broja kopija gena *SMN1*, *SMN2* i *NAIP*

S obzirom na statistički značajnu pojedinačnu korelaciju broja kopija *SMN2* i gena *NAIP* sa kliničkom ekspresijom bolesti postavlja se pitanje da li je homozigotna ili heterozigotna delecija gena *NAIP* povezana sa smanjenjem broja kopija gena *SMN2*. U studiji Campbell i saradnika autori zaključuju da je delecija *NAIP* gena često praćena smanjenjem u ukupnom broju kopija gena *SMN* kod pacijenata sa tip I SMA. Nasuprot tome, prisustvo *NAIP* gena je praćeno povećanjem ili zadržavanjem ukupnog broja kopija gena *SMN2* kod lakših SMA formi usled mehanizma genske konverzije *SMN1* u *SMN2* (Campbell i sar, 1997).

Stoga, da bi se bolje procenio značaj gena *NAIP* i *SMN2* na SMA patologiju i bolje okarakterisao SMA kritični region, u grupi od 30 analiziranih pacijenata istovremeno je analiziran broj kopija ova dva gena i ispitivana je korelacija tako dobijenih rezultata sa težinom bolesti. Ovim pristupom utvrđeno je 6 mogućih genotipova među ispitanicima. Na osnovu ove analize potvrđeno je da i među SMA pacijentima iz Srbije broj kopija gena *NAIP* može ukazati na veći ili manji broj kopija gena *SMN2*. Odsustvo (0 kopija) gena *NAIP* je bilo skoro isključivo povezano sa manjim brojem *SMN2* kopija (genotip *0SMN1-2SMN2-0NAIP*). Svi pacijenti sa ovim genotipom su razvili težak oblik SMA (tip I) (tabela 16). Nasuprot tome, jedna kopija gena *NAIP* je u najvećem broju slučajeva bila povezana sa tri kopije *SMN2* predstavljeno genotipom *0SMN1-3SMN2-1NAIP* i to kod većine SMA tip II pacijenata. Normalan broj kopija gena *NAIP* je najučestaliji među pacijentima sa četiri kopije *SMN2* koji su svi razvili SMA tip III.

U studiji Akutsu i saradnika o uticaju genotipa na fenotipsku ekspresiju bolesti među SMA pacijentima iz Japana, dokazano je da prisustvo delecije u genu *NAIP* pogoršava prognozu nezavisno od broja kopija gena *SMN2* (Akutsu i sar, 2002). S obzirom da je delecija gena *NAIP* sa tri kopije *SMN2* nađene samo kod SMA tip I i II, autori zaključuju da delecija gena *NAIP* predstavlja nezavisan prognostički faktor. Na ispitivanom uzorku

pacijenata iz Srbije samo je jedan SMA tip II pacijent bez gena *NAIP* imao tri *SMN2* kopije (tabela 13, pacijent 20). Međutim i pored odsustva gena *NAIP* klinička slika ovog pacijenta se nije bitno razlikovala u odnosu na druge pacijente iz ove fenotipske grupe.

Pored činjenice da broj kopija *NAIP* i *SMN2* nezavisno koreliraju sa težinom kliničke slike, na osnovu prikazanih rezultata jasno je da značajnost ovog pristupa raste kada se pojedinačni rezultati kombinuju. Rezultati studije na SMA pacijentima iz Srbije potvrđuju da kod većine ispitanika niži broj kopija gena *SMN2* i *NAIP* zajedno dovodi do teže kliničke slike što je u saglasnosti sa dosadašnjim publikovanim rezultatima (Savas i sar, 2000; Harada i sar, 2002; Scarciolla i sar, 2006). Međutim, s obzirom da ova asocijacija nije prisutna u svim slučajevima mora se voditi računa prilikom uvođenja ovog tipa analiza u kliničkoj praksi (npr. u prenatalnoj dijagnostici i genetičkom savetovanju).

Komparativna analiza *SMN1*, *SMN2* i *NAIP* je omogućila i definisanje mehanizma mutacije koji se nalazi u osnovi bolesti u analiziranoj grupi SMA pacijenata iz Srbije. U studiji Wirth i saradnika iz 1999. godine se zaključuje da je ekspresija kliničkog fenotipa determinisana, kako ukupnim brojem *SMN2* kopija tako i mehanizmom mutacija na oba hromozoma (Wirth i sar, 1999). Wirth i saradnici su jos 1995. godine predložili model baziran na postojanju “blagih<sup>86</sup>” i “teških<sup>87</sup>” alela (dovode do blaže odnosno teže kliničke slike), čija složena heterozigotnost dovodi do različitih kliničkih ekspresija bolesti (Wirth i sar, 1995). Autori su postavili hipotezu da pacijenti sa SMA tip I nose dva “teška” SMA hromozoma, da pacijenti sa SMA tip II nose jedan “težak” i jedan “blag” SMA hromozom, dok pacijenti sa SMA tip III nose dva “blaga” SMA hromozoma.

Po uzoru na ovaj hipotetički model predloženo je postojanje četiri SMA alela kod pacijenata sa odsustvom obe *SMN1* kopije, predstavljenih na sledeći način (slika 35):

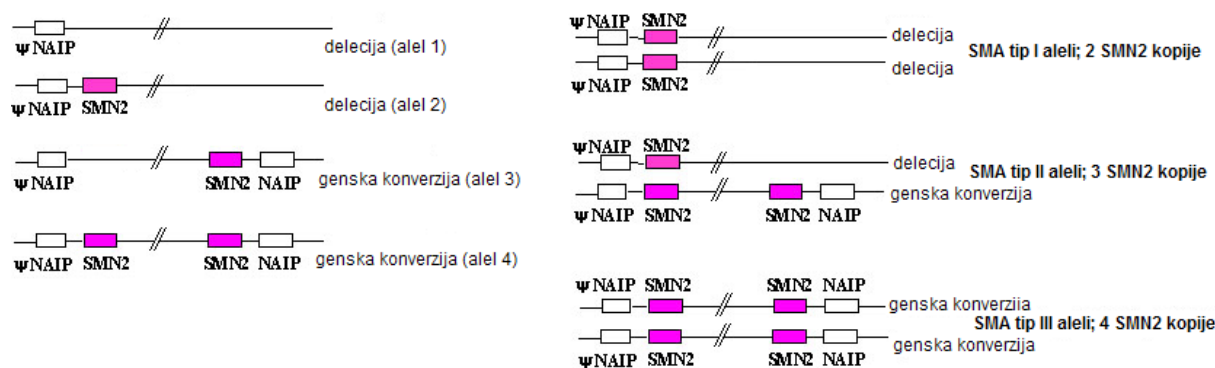
- a) delecija *SMN1* zajedno sa prisustvom jedne ili ni jedne *SMN2* kopije (alel 1 i 2) ili
- b) konverzije *SMN1* u *SMN2* zajedno sa prisustvom jedne ili dve *SMN2* kopije (alel 3 i 4)

Kombinacije ovih alela će dovesti do fenotipova sa različitom ekspresijom bolesti (Campbell i sar, 1997; Di Donato i sar, 1997).

---

86 Eng. *mild*— blag

87 Eng. *severe*— težak



Slika 35. Šematski prikaz SMA alela sa predloženim mehanizmom mutacije i genotipovi nastali kombinacijom tih alela kod SMA pacijenata različitog tipa. SMA tip I pacijenti mogu biti homozigoti za alele vezane za najteži oblik bolesti koji se sastoji od delecije *SMN1* i odsustva gena *SMN2* (genotip 1,1). Ovakvi slučajevi nisu opisani jer bi ova kombinacija bila letalna *in utero*. Najčešće se među SMA tip I pacijentima sreće 2,2. SMA tip II i III su složeni heterozigoti jednog deleciranog alela i drugog sa genskom konverzijom ili homozigoti za gensku konverziju (genotipovi 2,3 ili 4,4) (izvor:<http://www.rug.nl/research/genetics/hereditarydiseases/geneticanalysis/isma?lang>)

Za razliku od PCR/RLFP metode koja otkriva samo prisustvo ili homozigotno odsustvo gena *SMN1*, MLPA analiza, pored ostalog, omogućava da se okarakteriše mehanizam odgovoran za *SMN1* gubitak. Iako *SMN2* i *NAIP* geni nisu direktno uključeni u patogenezu SMA, na osnovu broja kopija ova dva gena, moguće je analizirati i način nastanka promena koje su se dogodile u SMA kritičnom regionu kod obolele dece. U skladu sa tim moguće je razlikovati slučajeve nastale kao posledica homozigotne delecije *SMN1*, one nastale delecijom jednog alela i konverzijom na drugom, kao i slučajeve uzrokovane homozigotnom konverzijom (Burghes i sar, 1997).

Sledeći gore navedene podatke iz literature istraživački rad na analiziranim pacijentima iz Srbije je obuhvatio i definisanje mogućih mehanizama koji dovode do bolesti u ovoj grupi, putem ispitivanja genotipova formiranih komparativnom analizom *SMN* i gena *NAIP*:

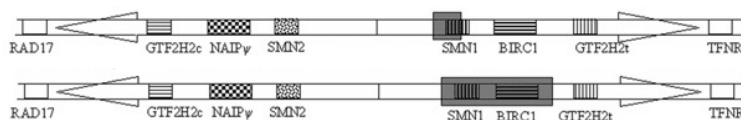
- kod pacijenata koji pokazuju odsustvo gena *NAIP* i prisustvo dve kopije *SMN2* je prisutan genotip koji odgovara homozigotnoj deleciji gena *SMN1* (slika 36). Svi ovi pacijenti su pripadali najtežem obliku bolesti. Ovaj genotip je u saglasnosti sa observacijom da su istovremene *SMN1* i *NAIP* delecije udružene sa 1 ili 2 *SMN2* kopije (prosečan broj prisutan u populaciji) najčešće sreću u teškoj formi bolesti (Campbell i sar, 1997). To je dokaz prave delecije koja uključuje veliki segment telomernog dela SMA regiona, sa centromernim delom koji ostaje relativno intaktan.



SMA tip I (del/del)

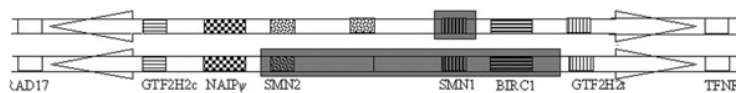
Slika 36. Genotip 0-2-0

— s obzirom da su dve *SMN2* kopije i jedna kopija gena *NAIP* nađene kod pacijenata sa SMA tip I i II razmatrana su dva potencijalna mehanizma koja bi dovela do istog genotipa (slika 37). Sa jedne strane ovaj genotip može biti dokaz za prisustvo homozigotne delecije koja bi na jednom hromozomu bila manja, zahvatajući samo gen *SMN1*, dok bi na drugom bila veća zahvatajući i *SMN1* i *NAIP*. Drugi mehanizam bi podrazumevao veliku deleciju na jednom alelu (uključujući *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*) i gensku konverziju na drugom alelu. Prema literaturnim podacima, naizgled mala delecija koja ne obuhvata *NAIP* gen, najverovatnije je posledica genske konverzije *SMN1* u *SMN2* što se prezentira kao prividna delecija *SMN1* (Tran i sar, 2008). Na osnovu studije Campbella i saradnika, i modela koji se u njoj predlaže verovtno se prvi mehanizam nalazi u osnovi bolesti kod SMA tip I pacijenata, dok je drugi verovatniji kod pacijenta sa blažom kliničkom slikom (SMA tip II) (Campbell i sar, 1997).



SMA tip I (del/del)

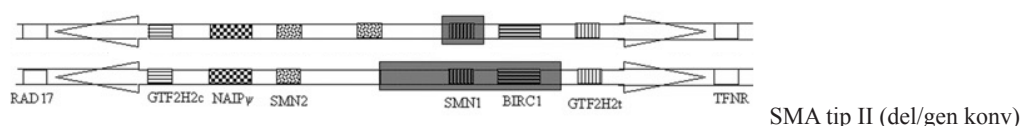
ili



SMA tip II (del/gen konv)

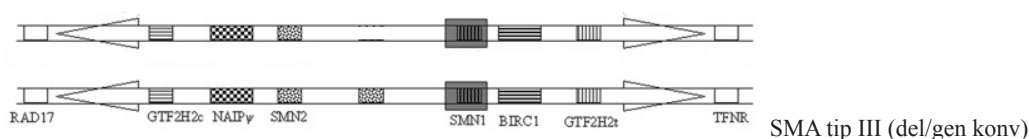
Slika 37. Genotip 0-2-1

— genotip predstavljen sa tri kopije *SMN2* i jednom kopijom *NAIP* je konzistentan sa delecijom jednog alela (uključujući *SMN1* i *NAIP*, ali ne i *SMN2*) i konverzijom drugog alela i skoro isključivo je prisutan među SMA tip II pacijentima (slika 38).



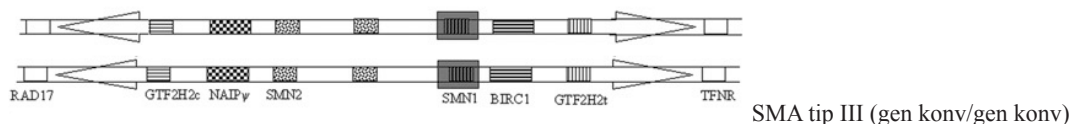
Slika 38. Genotip 0-3-1

- pacijenti sa tri *SMN2* kopije i dve kopije *NAIP* se mogu objasniti genskom konverzijom jednog alela i manjom delecijom drugog koja je zahvatila samo gen *SMN1*. Mehanizam ovog tipa je zastupljen u istom procentu kod pacijenata sa SMA tip II i III (slika 39).



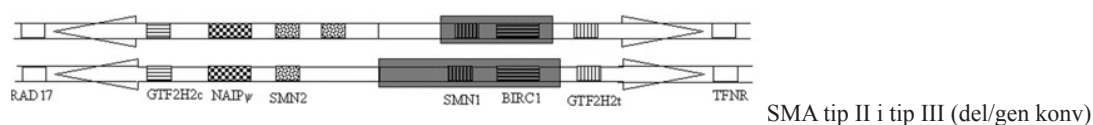
Slika 39. Genotip 0-3-2

- kod pacijenata sa 4 kopije *SMN2* i dve kopije *NAIP* najverovtnije se dogodila homozigotna konverzija *SMN1* u *SMN2* na oba alela (slika 40). Ovaj mehanizam se javlja kod blažih oblika bolesti, što rezultati ove studije i potvrđuju s obzirom da je najveći procenat SMA tip III pacijenata imalo ovaj genotip.



Slika 40. Genotip 0-4-2

- jedan pacijent je imao genotip sa 3 *SMN2* kopije i bez i jedne *NAIP* kopije, što ukazuje na prisustvo kompleksnog rearanžmana u SMA regionu. Moguće objašnjenje za prisustvo ovakvog genotipa je najverovatnije homozigotna *SMN1* delecija koja obuhvata i gen *NAIP* sa 3 *SMN2* kopije, od kojih su dve nasleđene od jednog od roditelja (nasleđen hromozom koji nosi duplikaciju jedne *SMN2* kopije) (slika 41). U studiji Trana i saradnika iz 2008. godine se takođe opisuju slični slučajevi koji obuhvataju dva SMA tip III pacijenta bez gena *SMN1* i *NAIP* sa tri i četiri kopije *SMN2* (Tran i sar, 2008). Ovi autori pretpostavljaju da su se genska konverzija *SMN1* u *SMN2* i velika delecija koja obuhvata i gen *NAIP* dogodile zajedno na jednom hromozomu, što može predstavljati još jedno objašnjenje ovog kompleksnijeg genotipa.



Slika 41. Genotip 0-3-0

Pored ovih hipotetičkih opštih modela za opisivanje mehanizama nastanka bolesti, u grupi analiziranih pacijenata u ovom radu izdvajaju se dva pacijenta sa SMA tip II kod kojih je PCR deleciona analiza otkrila nedostatak samo egzona 7 *SMN1*, dok je egzon 8 bio prisutan (tabela 13, pacijenti 15 i 24). Kvantitativna analiza je kod ovih pacijenata pored tri kopije gena *SMN2* pokazala prisustvo jedne kopije egzona 8 gena *SMN1*. Na osnovu tih rezultata se zaključuje da ovi pacijenti na jednom hromozomu imaju deleciju gena *SMN1*, ali na drugom nose hibridni gen *SMN* koji se sastoji od *SMN2* kopije egzona 7 povezane sa *SMN1* kopijom egzona 8 nastao parcijalnom genskom konverzijom. Kao posledica toga oba pacijenta su imala i povećanje broja kopija gena *SMN2*. DiDonato i saradnici su takođe uočili povezanost između blažih formi bolesti (tip II i III) i parcijalne genske konverzije koja ne uključuje egzon 8 (Di Donato i sar, 1997).

Mehanizmi nastanka SMA koji su diskutovani u ovom radu se uklapaju u prethodno opisane SMA modele koji dovode do različite fenotipske ekspresije ove bolesti (Wirth i sar, 1995):

- homozigotne *SMN1* delecije su najučestalije kod SMA tip I: svi analizirani SMA tip I pacijenti nose genotip sa 2 *SMN2* kopije koji odgovara deleciji *SMN1* na oba hromozoma; pored toga 70% njih ima veliku deleciju koja je uključuje i gen *NAIP*;
- kod SMA tip II genska konverzija *SMN1* u *SMN2* se često nalazi na jednom alelu, dok je na drugom delecija: 75% SMA tip II pacijenata ima genotip sa 3 *SMN2* kopije koji odgovara deleciji *SMN1* na jednom hromozomu i genskoj konverziji *SMN1* u *SMN2* na drugom; među ovim pacijentima najveći procenat je onih sa jednom *NAIP* kopijom, kao dodatnom potvrdom ovog mehanizma;
- genska konverzija na oba alela je najčešće prisutna kod SMA tip III: kod pacijenata sa SMA tip III, 60 % ima genotip koji odgovara genskoj konverziji na oba hromozoma kroz prisustvo 4 *SMN2* kopije i normalnog broja gena *NAIP*.

### 5.3.4 Analiza broja kopija gena *GTF2H2* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

Činjenica da većina tip II i III, ali ne i tip I SMA pacijenata, zadržavaju bar jednu intaktnu kopiju gena *NAIP*, ukazuje na to da i drugi, susedni geni mogu imati uticaj na fenotipsku ekspresiju bolesti. Pored toga potvrđeno je da veće delecije koje obuhvataju gen *NAIP* koreliraju sa težom kliničkom slikom, što ukazuje na mogućnost da delecije u SMA lokusu mogu da uključuju pored gena *NAIP* i druge gene. Ova hipotetička pretpostavka je podržana od strane mnogih autora, u čijim studijama je pokazano da postoji redukcija alela nekoliko multilokusnih mikrosatelitnih markera mapiranih u SMA kritičnom regionu, najčešće deleciranih kod teško obolelih SMA pacijenata (Melki i sar, 1994; Wirth i sar, 1995). Ukoliko su tačne, ove observacije podržavaju novi mehanizam alelske varijacije koja dovodi do značajnih razlika u fenotipskoj varijabilnosti. S obzirom da nekoliko gena može biti uključeno u ovaj mehanizam, ovaj model pokreće pitanja o odnosu, ukoliko postoji, između patogeneze SMA i nekoliko gena sa očigledno različitim funkcijama (Wang i sar, 1997). U ovom radu je takođe testirana gore pomenuta hipoteza i to kroz određivanje broja kopija, osim gena *SMN* i *NAIP* i drugih gena iz SMA regiona u uzorku pacijenata iz Srbije

Prvo je analiziran gen *GTF2H2*, koji je mapiran uzvodno od *SMN1*. S obzirom na podatke da ovaj gen može takođe biti deletiran sa ostalim genima iz SMA kritičnog regiona, kao i na njegovu dobro definisanu funkciju u transkripciji i mehanizmima DNK popravke ovaj gen se razmatra kao potencijalni gen modifikator (Burglen i sar, 1997).

Prema dosadašnjim literaturnim podacima, stavovi oko uticaja ovog gena na SMA fenotip još uvek nisu u potpunosti usaglašeni. Prema nekim autorima odsustvo ili redukcija ovog gena se jasno povezuje sa najtežim oblikom bolesti: kod 73% SMA tip I pacijenata u studiji Burglen i saradnika ovaj gen nedostaje ili je oštećen, dok je u studiji Amara i saradnika ovaj procenat iznosio 50% (Burglen i sar, 1997; Amara i sar, 2012). Sa druge strane rezultati nekih drugih publikacija pokazuju da su delecije oba homologa telomerne kopije gena *GTF2H2* uočene kod približno 14% svih SMA pacijenata bez očigledne korelacije sa težinom bolesti (Carter i sar, 1997; Wang i sar, 1997; Savas i sar, 2000; Arkblad i sar, 2009). Pored toga 1% kontrolnih uzoraka takođe ima deleciju ovog gena što ukazuje da ovaj gen nije uključen u SMA patologiju kao gen uzročnik (Burglen i sar 1997; Carter i sar, 1997).

U analiziranom uzorku od 30 pacijenata iz Srbije, kod 13,3% slučajeva uočen je nedostatak oba homologa telomerne kopije gena *GTF2H2* što je u korelaciji sa studijama Cartera i saradnika i Savasa i saradnika, u čijim radovima je ova delecija detektovana kod 14% odnosno 13,3% analiziranih pacijenata (Carter i sar, 1997; Savas i sar, 2000). Pored toga analizirana je distribucija broja kopija ovog gena u grupama pacijenata sa različitim tipovima SMA u cilju uspostavljanja eventualne korelacije sa fenotipom. Statistički značajna povezanost između ova dva parametra međutim nije pronađena s obzirom da su 1 i 2 kopije gena bile približno ravnomerno raspoređene među SMA tip I i II pacijentima ( $P=0,107$ ) (tabela 17). Ipak, važno je naglasiti da rezultati ovog istraživačkog rada pokazuju da je 0 kopija ovog gena prisutno samo kod pacijenata sa SMA tip I i to približno 31% ovih pacijenata je imalo odsustvo oba homologa *GTF2H2* (0 kopija).

Na osnovu svih iznetih rezultata proizilazi da je odsustvo gena *GTF2H2* i u uzorku pacijenata iz Srbije najčešće prisutno kod najteže obolelih pacijenata, što se poklapa sa rezultatima drugih sličnih studija (Carter i sar, 1997; Scharf i sar, 1998; Cho i sar, 2001; Amara i sar, 2012).

### 5.3.5 Komparativna analiza gena *GTF2H2*, *NAIP* i *SMN2*

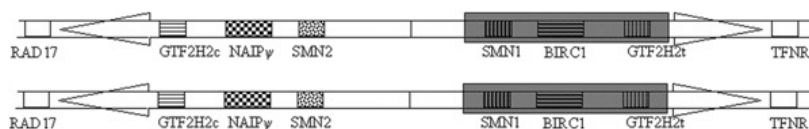
Uporednom analizom gena *SMN1*, *SMN2* i *NAIP* definisano je 6 mogućih genotipova koji su prisutni u uzorku SMA bolesnika iz Srbije. Kada smo analizi ovih gena dodali još i rezultate analize gena *GTF2H2*, pored šest opisanih genotipova koji su imali normalan broj kopija *GTF2H2*, definisana su još četiri koji su imali nedostatak ili redukciju kopija ovog gena. Iako broj kopija *GTF2H2* ne pokazuje bilo kakvu značajnu korelaciju sa težinom bolesti, mapiranje ovog gena i dosadašnji podaci o delecijama su ukazali na dva moguća mehanizma njihovog odigravanja: nekontinuirana delecija malog obima ili kontinuirana delecija velikog obima (Carter i sar, 1997).

Detektovana homozigotna (0-kopija) ili heterozigotna (1 kopija) delecija gena *GTF2H2* kod većine pacijenata u ovom radu je u saglasnosti sa mehanizmom kontinuirane velike delecije koja obuhvata *SMN1*, *NAIP* i *GTF2H2* zajedno<sup>88</sup> (slika 42). Ovakva delecija se sreće samo kod SMA tip I pacijenata u analiziranom uzorku (tabela 18). To je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama koje su takođe pokazale da je *GTF2H2*

88 Ove delecije su bile kontinuirane kada se razmatra raspored gena cent-5'-*SMN1*-3'-3'-*NAIP*-5'-3'-*BTF2p44tel*-5'-tel, predložen od Burglen i saradnika (Burglen i sar, 1997)

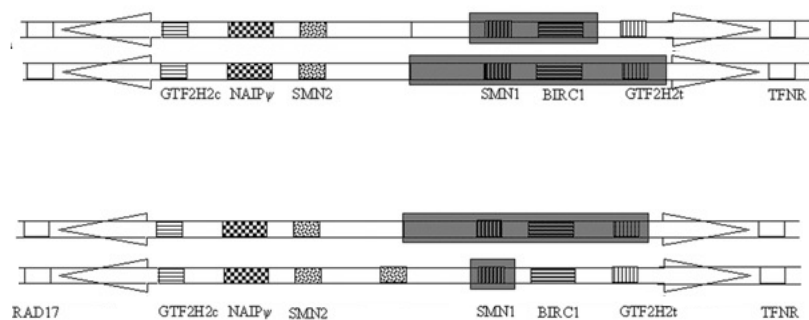


uključen u delecije većih razmera kod pacijenata sa SMA tip I (Burlgen i sar, 1997; Carter i sar, 1997). Stoga je još jednom potvrđena asocijacija velikih delecija sa težinom bolesti. U prethodnim studijama se između ostalog nailazi i na podatak da pacijenti sa SMA tip I koji su imali veću deleciju koja uključuje pored *NAIP* i gen *GTF2H2*, imaju i težu kliničku sliku. Međutim, u grupi analiziranih pacijenata sa SMA tip I iz Srbije ne može se uočiti značajnije pogoršanje u kliničkoj ekspresiji bolesti vezano sa nedostatkom *GTF2H2*. Sedam SMA tip I pacijenata koji su nosili veliku deleciju koja je uključivala *SMN1*, *NAIP* i *GTF2H2* na oba hromozoma su razvili težak oblik SMA odmah po rođenju (u prvom mesecu života) (tabela 13, pacijenti 6, 7, 10 i 12). Sa druge strane i preostali SMA tip I pacijenti takođe razvijaju jednako ozbiljan oblik bolesti (tabela 13, pacijenti 1-5, 8, 9 i 11).



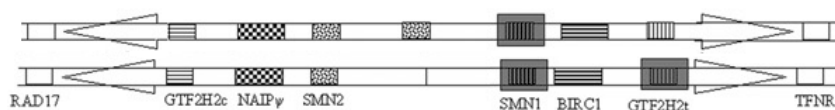
Slika 42. Genotip 0-2-0-0

Pacijenti koji su imali 1 kopiju gena *GTF2H2* su predstavljeni sa dva genotipa (slika 43). Prvi je uključivao homozigotnu deleciju alela na oba hromozoma — kontinuiranu veliku deleciju svih gena na jednom alelu i deleciju *SMN1* i *NAIP* bez delecije *GTF2H2* na drugom. U saglasnosti sa prethodno opisanim modelom Campbella i saradnika, delecija oba alela je nađena kod pacijenta sa SMA tip I (Campbell i sar, 1997). Drugi genotip sa jednom kopijom *GTF2H2* je predstavljen kontinuiranom velikom delecijom jednog alela koja uključuje sve gene i intragenskom konverzijom tj. nedostatkom *SMN1* i povećanjem broja kopija gena *SMN2*. Ovakav genotip se sreće uglavnom među SMA tip II pacijentima (Carter i sar, 1997).



Slika 43. Genotip 0-2-0-1 (gore) i genotip 0-3-1-1 (dole)

Jedini izuzetak od opisane kontinuirane delecije je genotip kod kojeg su uočene 3 kopije *SMN2* i 2 kopije gena *NAIP*, gde je prisutna i jedna kopija *GTF2H2* (slika 44). Uzimajući u obzir mapiranje gena po kome je *NAIP* smešten između *SMN1* i *GTF2H2* ova delecija je u saglasnosti sa nekontinuiranim delecionim događajem koji isključuje *NAIP* na jednom alelu, što je već opisano u literaturi (Carter i sar, 1997). Postojanje ove delecije kod SMA pacijenata može ukazati na ulogu *GTF2H2* u SMA etiologiji. S druge strane, prisustvo *GTF2H2* delecije u malom procentu normalne populacije ukazuje na to da se ovakva delecija (iako retko) može dogoditi i kod SMA pacijenata nezavisno od delecije koja dovodi do bolesti (Carter i sar, 1997).



Slika 44. Genotip 0-3-2-1

Rezultati dobijeni analizom genotipova u koje je uključen gen *GTF2H2* u uzorku pacijenata iz Srbije, nedvosmisleno pokazuju da rearanžman koji uključuje ovaj gen nije kritičan za razvoj SMA, ali može doprineti težini bolesti. Očigledna veza između delecija velikog obima koja se javlja u homozigotnom stanju i najteže forme bolesti (SMA tip I) može ukazati na to da je težina kliničkih simptoma povezana i sa promenom na nivou gena *GTF2H2*.

### 5.3.6 Analiza broja kopija gena *H4F5* i njihova distribucija u odnosu na tip SMA

S obzirom da približno trećina SMA tip I pacijenata nema deleciju ili mutaciju gena *NAIP*, predpostavlja se da bi kandidat za SMA-modifikujući gen koji bi pokazao značajniju učestalost delecija kod SMA tip I pacijenata bi trebalo da je mapiran bliže genu *SMN1* od gena *NAIP*. Gen *H4F5* ispunjava ove kriterijume jer je lociran 6,5 kb uzvodno od egzona 1 obe *SMN* kopije, što ga smešta bliže od bilo kog drugog gena u SMA kritičnom regionu. Iako funkcija proteina H4F5 nije do kraja jasna, njegova struktura i lokalizacija<sup>89</sup> ukazuju na moguću ulogu ovog proteina, slično proteinu SMN, u snRNP biogenezi, a što bi bila odgovarajuća funkcija za SMA modifikujući gen (Scharf i sar, 1998).

89 pokazuje homologiju sa snRNP-interagujućim proteinima koji se lokalizuje zajedno sa istim proteinima kao i protein SMN

Nekoliko studija se bavilo istraživanjima uticaja gena *H4F5* na fenotipsku ekspresiju SMA. Kao i u slučaju gena *GTF2H2*, broj populacionih studija gena *H4F5* koje se bave njegovom korelacijom sa SMA patologijom je još uvek nedovoljan, a vrlo često i protivrečan, te je do danas njegov uticaj na fenotip ove bolesti ostao nejasan. Iz dosadašnjih literaturnih podataka izdvaja se velika studija Scharfa i saradnika koji su pokazali prisustvo delecije ili 1 kopije ovog gena u preko 90% SMA tip I pacijenata i na taj način dokazali povezanost nedostatka ovog gena sa teškim oblikom bolesti (Scharf i sar, 1998).

Važno je naglasiti da u analiziranoj grupi SMA pacijenata iz Srbije nije pronađen ni jedan pacijent koji je imao homozigotnu deleciju gena *H4F5*. Pored toga, redukcija (jedna kopija ovog gena) je bilo prisutno sa sličnom učestalošću kako kod najteže forme bolesti (SMA tip I) tako i kod blažeg oblika (SMA tip II) (tabela 19). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da ne postoji statistički značajna korelacija između težine bolesti i broja kopija ovog gena ( $P=0,268$ ). Kombinovana analiza ovog gena sa drugim genima iz SMA regiona takođe nije pokazala postojanje ove korelacije.

Objašnjenje za ovakav rezultat bi moglo biti sa jedne strane u malom uzorku ispitivanih pacijenata, a sa druge u samoj probi za ovaj gen. U studiji urađenoj na 157 pacijenata iz Kine gde je korišćen isti MLPA set proba dobijeni su slični rezultati (He i sar, 2013). Proba za gen *SERF1B* (*H4F5*) prisutna u ovom MLPA setu proba detektuje egzon 1 ove sekvence (najbliži genu *SMN1*). Autori su poredili sekvencu probe za ovaj gen ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) sa genomskom DNK sekvencom (ENSG<sup>90</sup>00000172058) i pronašli da je proba zapravo locirana uzvodno od gena *H4F5* na osnovu čega zaključuju da korišćeni MLPA set proba u odnosu na gen *H4F5* mora biti poboljšán.

Rezultati dobijeni MLPA analizom gena prisutnih u SMA kritičnom regionu, oslikavaju visok stepen varijabilnosti koji postoji u SMA regionu u grupi ispitivanih pacijenata što potvrđuje visok nivo genomske nestabilnosti ovog regiona. Dokazano je da se učestale genomske varijacije u okviru SMA regiona dešavaju, kako kod SMA pacijenata, tako i u normalnoj populaciji i da se nasleđuje se po Mendelovim pravilima (Campbell i sar, 1997). Stoga bolje razumevanje molekularne osnove SMA, koje između ostalog uključuje i definisanje gena modifikatora fenotipa, ne samo da će pomoći u razumevanju patogeneze ove bolesti, već će imati prognostički značaj i ključnu ulogu u otkrivanju novih terapijskih pristupa. Iako postoji još mnogo otvorenih pitanja o faktorima modifikacije kliničke slike SMA pacijenata, rezultati ovog rada pokazuju da su prilikom prognoziranja SMA fenotipa ipak najvažniji sledeći parametri: broj kopija gena *SMN2*, veličina

homozigotne ili heterozigotne delecije koja pored *SMN1* uključuje i susedne gene kao i tip intragenske *SMN1* mutacije ukoliko je prisutna.

#### 5.4 Određivanje statusa heterozigotnih nosilaca *SMN1* delecije kod zdravih članova porodice obolelog i davanje genetičkog saveta

S obzirom na činjenicu da se SMA javlja sa učestalošću od 1 u 10000 rođene dece i uzimajući u obzir Hardy-Weinbergovu ravnotežu, učestalost nosioca u opštoj populaciji bi trebalo da bude 1:50 (Pearn i sar, 1978; Wirth i sar, 2006). Međutim ova procena je bazirana na statističkom proračunu i pretpostavlja nižu učestalost od one utvrđene molekularno genetičkim analizama. Od 2000. godine testiranje za status zdravih heterozigotnih nosilaca je sprovedeno na većem broju etnički različitih populacija i bazirano je na pilot skriningu broja kopija gena *SMN1* (Prior i sar, 2010). Ovim studijama je ustanovljena učestalost heterozigotnih nosilaca od 1 u 25 do 1 u 50 u većini populacija belaca (Feldkotter i sar, 2002; Cusin i sar, 2003; Smith i sar, 2007). I pored toga, smatra se čak da bi ova učestalost mogla biti i nešto viša jer se nosioci tačkaste mutacije (1,7%) ili nosioci sa 2 *SMN1* kopije na 1 hromozomu (4%) ne mogu detektovati ovim testovima (Wirth i sar, 2006). Neslaganje između statističkih i molekularno genetičkih studija moglo bi se objasniti sledećim činjenicama (Wirth i sar, 2006):

- neke osobe se, iako nose homozigotnu deleciju gena *SMN1*, ne detektuju jer su asimptomatske. Ovakva situacija se može naći u približno 10% porodica sa SMA tip III i 1,2% porodica sa SMA tip II, što se objašnjava postojanjem gena modifikatora koji štite neke osobe od razvijanja SMA ;
- najveći procenat embriona sa velikim hromozomskim delecijama koje uključuju obe *SMN* kopije, neće preživeti; upravo iz ovih razloga samo oko 15% pacijenata sa tip I SMA i 6% sa tip II SMA nosi velike delecije na jednom od hromozoma, nemajući ni *SMN1* ni *SMN2* kopiju;
- moguće je i da neki veoma teško oboleli pacijenti nisu bili uključeni u epidemiološke studije.

Određivanje broja *SMN1* kopija je često neophodan korak u procesu genetičkog savetovanja, bilo u slučajevima otkrivanja SMA pacijenata složenih heterozigota ili za proveru statusa asimptomatskih nosioca za SMA. S obzirom na dokazanu visoku uče-

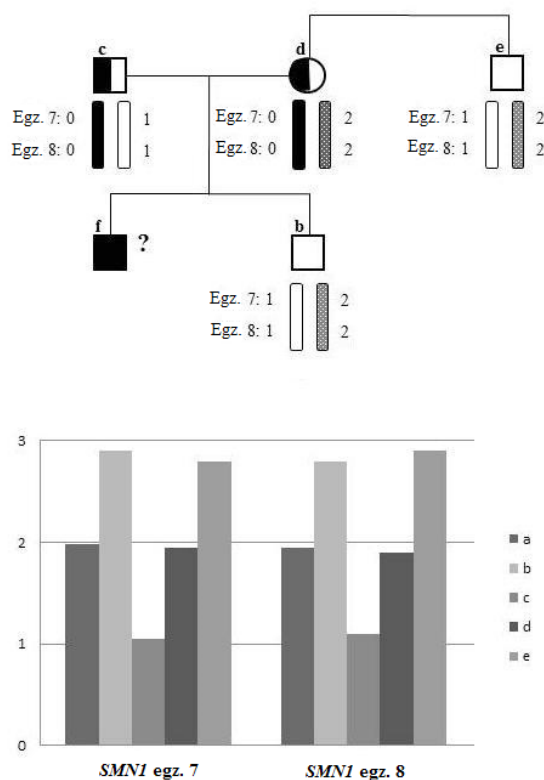
stalost heterozigotnih nosilaca *SMNI* delecije u opštoj populaciji, određivanje statusa nosioca u porodicama sa povećanim rizikom je od suštinske važnosti za izračunavanje preciznog rizika za dobijanje obolelog deteta. Danas je za pouzdano testiranje u ove svrhe dostupan veliki broj metoda. U ovom radu je korišćena MLPA metoda koja je zbog svoje efikasnosti i ekonomičnosti našla široku primenu u dijagnostičkim procedurama ove i drugih genetičkih bolesti. Primenom ove metode analizirano je 39 pacijenata iz Srbije sa familijarnom istorijom SMA i oni su podeljeni u tri grupe. U radu Miskovic i saradnici ovi rezultati su delom bili objavljeni (Miskovic i sar, 2014)

#### **5.4.1 Roditelji obolelog deteta koje nije dostupno za dalje analize (bez molekularno genetičke potvrde bolesti)**

U ovoj grupi pacijenata određivanje broja kopija *SMNI* je veoma važna za procenu rizika i davanje adekvatnog genetičkog saveta u vezi prenatalne dijagnostike. Jedna kopija gena detektovana kod oba roditelja će ukazati da je bolest kod probanda bila uzrokovana homozigotnom *SMNI* delecijom i pouzdana prenatalna analiza se u tom slučaju može ponuditi. Međutim veoma važna uloga testiranja na status nosioca leži u pomenutoj činjenici da više od 4% roditelja obolelih pacijenata poseduje dve intaktne kopije *SMNI* (Smith i sar, 2007). Broj alela po hromozomu samo približno reflektuje broj *SMNI* kopija lokalizovanih na svakom od hromozomu. Stoga je od posebnog značaja bila analiza tri porodice iz ove grupe, u kojima se upravo analizirala ovakva mogućnost u cilju definisanja preciznog rizika za dobijanje obolelog potomstva. U ovim porodicama samo jedan roditelj je bio heterozigotni nosilac delecije gena *SMNI*, dok je drugi pokazao prisustvo dve kopije ovog gena. U ovakvim slučajevima, testiranje drugih članova porodice roditelja sa dve kopije gena *SMNI* može biti informativno.

U prvoj porodici, MLPA je pokazala prisustvo jedne kopije gena *SMNI* kod oca čime je dokazano da je on nosilac, dok je majka imala dve kopije ovog gena. Zdrav brat obolelog deteta kao i ujak su takođe analizirani ovom metodom koja je pokazala prisustvo tri kopije gena *SMNI* kod obojice. Analizom porodičnog stabla, jedini mogući zaključak je da majka ima '2+0' genotip: ona je nosilac dve *SMNI* kopije na jednom hromozomu 5 i mutacije nastale delecijom/konverzijom na drugom hromozomu 5 (Ogino i Wilson, 2004a). Obolelo dete je nasledilo hromosome sa delecijom od oba roditelja. Njegov zdrav brat je nasledio alel sa jednom kopijom gena od oca i alel sa dve kopije od majke i stoga nije nosilac. Ovo otkriće je podržano činjenicom da je ujak takođe imao tri kopije gena *SMNI* (slika 45). Na osnovu svih do sada objavljenih podataka kod 2,4% zdravih hromozoma su

uočene dve kopije gena *SMN1*, što rezultira u tome da će 4,8% normalnih osoba imati '2+0' genotip i biti pogrešno interpretirane na osnovu direktnog testa broja kopija gena *SMN1*. Ovo je važan faktor koji može dovesti do lažno negativnog rezultata prilikom traganja za SMA nosiocima i ima značajan uticaj na procenu rizika za nosioce SMA mutacije (Ogino i Wilson, 2004a). Upravo na osnovu ovog i sličnih primera zaključuje se da je senzitivnost korišćenog testa 95,2%. Proširena analiza u ovoj porodici koja je uključila i druge članove je omogućila izračunavanje preciznog rizika i davanje adekvatnog genetičkog saveta.

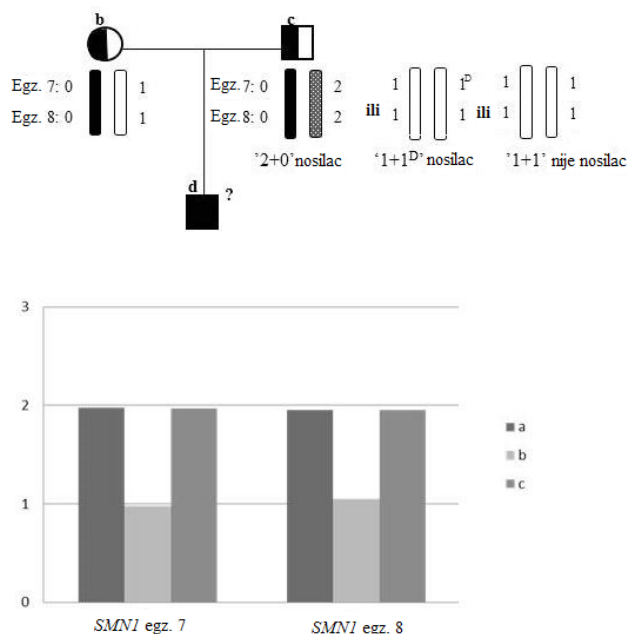


**Slika 45.** Prva porodica — analiza porodičnog stabla i MLPA rezultata gena *SMN1* (egzoni 7 i 8). Gore, dijagram analize porodičnog stabla. Dole, MLPA rezultati. a, kontrolni uzorak; b, zdrav brat; c, otac; d, majka; e, ujak; i f, bolesno dete (prikazano samo u analizi pedigrea). MLPA rezultati su pokazali da je otac imao 1 *SMN1* kopiju, majka je imala 2 *SMN1* kopije, zdrav brat i ujak su imali 3 *SMN1* kopije. U analizi porodičnog stabla, obrazac nasleđivanja je pokazao da je obolelo dete nasledilo deletirane alele od oba roditelja (homozigotna delecija): otac je nosilac 1 *SMN1* kopije gena; majka je nosilac 2 *SMN1* kopije na jednom hromozomu 5 i mutaciju tipa delecije/konverzije na drugom hromozomu 5 ('2+0' genotip); zdrav brat (nije nosilac) je nasledio alel sa 1 *SMN1* kopijom od oca i alel sa 2 *SMN1* kopije od majke. Ovi zaključci su bili potkrepljeni i činjenicom da je majčin rođeni brat (nije nosilac) imao 3 kopije gena *SMN1*.

U drugoj i trećoj porodici, jedan od roditelja takođe je imao dve kopije gena, ali proširena analiza nije bila moguća jer drugi članovi porodice nisu bili dostupni (slika 46). Za precizan genetički savet u ovim porodicama moraju se razmotriti dve mogućnosti sa

potpuno suprotnim rizikom za dobijanje obolelog deteta. Prva je visok rizik za dobijanje obolelog deteta (1/4) zbog prisustva dva moguća genotipa kod nosioca: '2+0' ili '1+1<sup>D</sup>' (jedan normalan *SMNI* alel i drugi sa malom intragenom mutacijom). Publikovani podaci pokazuju, pored navedene učestalosti '2+0' genotipa, postojanje i 1,7% nosioca intragenske *SMNI* mutacije. Kao ni '2+0' genotip ni ovi nosioci se ne mogu razlikovati od genotipa osobe koja nije nosilac sa dve normalne genske kopije korišćenjem primenjenog testa i stoga takođe mogu dovesti do lažno negativnog rezultata. Ova činjenica dodatno spušta senzivnost testa na 93,5% za osobe iz opšte populacije (Wirth i sar, 2006).

Druga mogućnost je *de novo* mutacija. Iako su približno 98% roditelja obolelog deteta heterozigoti i stoga nose mutaciju u genu *SMNI* koja uzrokuje bolest procenjeno je da se *de novo* mutacije nalaze kod ~2% pacijenata sa SMA što predstavlja visoku stopu u poređenju sa ostalim autozomno recesivnim bolestima. Većina *de novo* mutacija je paternalnog porekla ( $2,11 \times 10^{-4}$  vs  $4,15 \times 10^{-5}$  maternalnog porekla). Iako je verovatnoća ponavljanja *de novo* mutacija mala, a samim tim i rizik za obolelo potomstvo je nizak (Wirth i sar, 1997), opisani su slučajevi gonadalnog mozaicizma za *SMNI* mutaciju (Campbell i sar, 1997, Ogino i sar, 2004b). I u ovom slučaju dodatne analize koje bi obuhvatile i druge članove porodice bi mogle da prevaziđu ove probleme.



**Slika 46.** Druga i treća porodica — analiza porodičnog stabla i MLPA rezultata gena *SMNI* (egzoni 7 i 8). Gore, dijagram analize porodičnog stabla. Dole, MLPA rezultati. a, kontrolni uzorak; b, majka; c, otac; d, obolelo dete (prikazano samo u analizi pedigrea). MLPA rezultati su pokazali da majka ima 1 *SMNI* kopiju, dok otac ima 2 *SMNI* kopije. Analiza porodičnog stable: prikazane 3 različite mogućnosti genotipa kod oca.

Treba međutim naglasiti, da precizno izračunavanje rizika u opisanim porodicama zavisi od toga da li je bolest kod deteta uopšte povezana sa mutacijama u genu *SMNI*. Ova činjenica posebno komplikuje procenu rizika kod porodica gde oba roditelja imaju dve kopije gena. U analiziranoj grupi pacijenata kod jednog para je razmatrana ova mogućnost. Kao što je već rečeno, ukoliko oba roditelja imaju dve kopije gena *SMNI* izuzetno je malo verovatno da je obolelo dete ima SMA kao posledicu mutacije u *SMN* lokusu. Prema već pomenutoj studiji Wirth i saradnika, kod približno 1,9% tip I, 1,6% tip II i 13% tip III pacijenata sa tipičnom kliničkom slikom SMA su vrlo verovatno drugi geni, a ne *SMNI* uzročnici SMA fenotipa (Wirth i sar, 1999). Stoga će, na primer, prethodni rizik da je roditelj probanda sa tipičnom SMA tip III i dve kopije gena *SMNI* nosilac biti smanjen na 0,87 (1x0,87). Nasuprot tome, ukoliko roditelj/i imaju dve kopije gena *SMNI* uslovna verovatnoća da su i pored toga nosioci će porasti ukoliko postoji informacija da dete ima tipičnu SMA tip III pre nego ako ima tip I ili II. Razlog za ovo leži u činjenici što je udeo alela vezanih za bolest koji su 1<sup>D</sup> (vs 0— kopija) veći kod tip III SMA nego u druga dva tipa (Ogino i sar, 2002). Iz iznetih podataka se može zaključiti da je za procenu rizika važna informacija o tipu SMA u koji je klasifikovano obolelo dete.

#### 5.4.2 Partner iz opšte populacije planira potomstvo sa osobom koja ima rizik za dobijanje deteta obolelog od SMA

Ove osobe ukoliko nisu u srodstvu sa svojim partnerom nemaju povećan rizik da su heterozigoti za *SMNI* mutaciju. Stoga je njihov prethodni (a priori) rizik da su nosioci isti kao i za opštu populaciju — približno 1/50 (Cusco i sar, 2002). Verovatnoća za dobijanje obolelog deteta za ove osobe ukoliko je partner potvrđeni nosilac iznosi 1/200<sup>91</sup>. Nakon analize za određivanje statusa nosioca, kod ovakvih pacijenata se ovaj finalni rizik za dobijanja deteta obolelog od SMA se može spustiti na 1/2448<sup>92</sup> ukoliko nije nosilac. Sa druge strane rizik se može povećati na 1/4 ukoliko je pacijent nosilac jedne *SMNI* kopije (Cusco i sar, 2002).

U ovoj grupi analiziran je i jedan par u kome partner iz opšte populacije planira potomstvo sa osobom koja ima dve kopije gena *SMNI*, ali i porodičnu anamnezu SMA jer

91  $1/50 \times 1/2 \times 1 \times 1/2 = 200$

92  $1/825 \times 1/2 \times 1 \times 1/2 + 2.11 \times 10^{-4} \times 1/2 = 1/2448$  (uzimajući u obzir da su ovakve osobe nosioci iako imaju dve kopije gena *SMNI* od 1/825 (tabela 21) i stopu *de novo* mutacija od  $2.11 \times 10^{-4}$ )



je imao brata sa homozigotom delecijom gena *SMNI*. Ako dodatne analize u ovoj SMA porodici nisu moguće (roditelji nisu dostupni), prethodni rizik od dobijanja obolelog potomstva će biti  $1/2600^{93}$ . I u tom slučaju nakon određivanja statusa nosioca partnera iz opšte populacija ovaj rizik može biti značajno smanjen (na  $1/85782^{94}$ ) ukoliko on nije nosilac ili značajno povećan na  $1/52^{95}$  ukoliko je nosilac. Preračunati rizici u opisanim situacijama značajno utiču na odluku o prenatalnoj dijagnostici, jer je ona opravdana samo kod parova sa visokim rizikom.

### 5.4.3 Bliski rođaci obolelog deteta sa homozigotnom delecijom gena *SMNI*

S obzirom na način nasleđivanja SMA, rođeni braća ili sestre obolelog deteta imaju 50% šanse da budu asimptomatski nosioci i 25% šanse da ne budu oboleli i da pri tom ni ne nose SMA mutaciju. Određivanje statusa nosioca kod ovakvih osoba je stoga veoma značajna. U prošlosti većina ispitivanja statusa nosioca u ovakvim slučajevima, kao i u slučajevima drugih rođaka (ujaci, stričevi, tetke) su rađena korišćenjem indirektno analize polimorfizama vezanih markera koja je zavisila od dostupnosti i kvaliteta DNK uzoraka probanda, ali i drugih članova porodice. Danas, ukoliko se radi o rođacima SMA pacijenata koji imaju dokazanu homozigotnu deleciju gena *SMNI*, korišćenjem MLPA metode se može direktno određivati status nosioca kod takvih osoba. Kada je status nosioca definisan testiranjem partnera se može sprovesti kao u drugoj grupi. I u ovom slučaju rizik da će kvantitativna analiza dati lažno negativni rezultat ili neizvestan rezultat zbog prisustva dva gena *SMNI* na jednom hromozomu je 4% što se mora uzeti u obzir pri izračunavanju rizika kod ovakvih osoba. Ovaj problem može biti prevaziđen, kao što je već opisano, proširenom analizom koja bi obuhvatila i druge članove porodice.

Iz razloga što kvantitativna dijagnostika ne detektuje sve nosioce, zaključuje se da je procena rizika za osobe koje imaju 2 ili više kopija gena *SMNI* ključna tačka prilikom pružanja genetičkog saveta. Učestalosti različitih *SMNI* alela i genotipova u određenoj populaciji u velikoj meri utiču na preciznost kliničke procene rizika. Stoga je u ovom radu za pouzdanu genetičku procenu rizika za status nosioca korišćena učestalost alela i geno-

93  $1/50 \times 1/2 \times 1/13 \times 1/2 = 1/200$  (uzimajući u obzir da je partner sa porodičnom SMA anamnezom nosilac sa dve kopije gena *SMNI* od  $1/13$  (tabela 23))

94  $1/825 \times 1/2 \times 1/13 \times 1/2 + 2.11 \times 10^{-4} \times 1/2 = 1/85782$  (uzimajući u obzir stopu *de novo* mutacija od  $2.11 \times 10^{-4}$ )

95  $1 \times 1/2 \times 1/13 \times 1/2 = 1/52$

tipova iz trenutno najopsežnije meta-analize svih dostupnih podataka Ogino i saradnika (Ogino i sar, 2004b). Niža učestalost *SMNI* homozigotne delecije u populaciji SMA pacijenata iz Srbije, kao i statistički značajna razlika u njenoj distribuciji u odnosu na tip SMA navodi na zaključak da je za preciznu procenu rizika kod porodica iz Srbije neophodno sprovođenje populacionog skrininga učestalosti različitih *SMNI* alela specifičnih za ovaj region. MLPA je, zbog mogućnosti da istovremeno analizira nekoliko desetina uzoraka, veoma korisno sredstvo i za takve univerzalne skrininge.

## 5.5 Prenatalna dijagnostika

SMA je autozomno recesivno nasledno oboljenje sa 25% rizika za ponovno dobijanje obolelog deteta ukoliko su oba roditelja heterozigotni nosioci mutacije. S obzirom na težinu i neizlečivost bolesti sprovođenje ove dijagnostike je od neprocenjivog značaja jer još uvek predstavlja jedini način u prevenciji rađanja obolele dece. Stoga je ovo istraživanje obuhvatilo i prenatalnu analizu kod 44 porodice iz Srbije, koje su imale rizik da dobiju obolelo SMA dete. Prenatalna dijagnostika je sprovedena korišćenjem PCR/RFLP metode za direktnu detekciju prisustva/odsustva *SMNI* homozigotne delecije. Sve analizirane porodice, ispitivane na ovaj način, su klasifikovane u tri grupe.

- a. Porodice sa najmanje jednim obolelim detetom sa potvrđenom homozigotnom delecijom gena SMNI.* Prenatalna dijagnoza sprovedena u ovoj grupi je pokazala 19,6% (11/56) obolelih fetusa (tabela 25). Korišćeni PCR/RFLP test za detekciju homozigotnih delecija u ovakvim slučajevima je stoga veoma koristan metod za prenatalnu dijagnostiku jer omogućava jasnu i preciznu dijagnozu.
- b. Porodice sa bar jednim obolelim detetom bez molekularno genetičke potvrde bolesti.* Kao što je pokazano na osnovu rezultata ovog rada učestalost homozigotne delecije gena *SMNI* u grupi obolelih SMA pacijenata iz Srbije iznosi 81%. Na osnovu značajnog procenta pacijenata sa homozigotnom delecijom koja je uzrok bolesti u našoj populaciji, ovakvim parovima je ponuđena prenatalna dijagnostika ove mutacije. U ovoj grupi je analizirano sedam fetusa i dva su bila pozitivna za homozigotnu deleciju ispitivanih egzona gena *SMNI* (tabela 25). Dobijeni rezultati ukazuju da je ovaj pristup delimično koristan u slučajevima kada DNK probanda nije dostupna. Prenatalna detekcija homozi-

gotne delecije gena *SMNI* je dokaz bolesti kod fetusa u slučajevima kada DNK od prethodno obolelog deteta nije dostupna. Međutim odsustvo homozigotne delecije detektovano PCR/RFLP metodom u fetalnom uzorku neće pouzdano isključiti rizik za obolelo dete (Cobben i sar, 1996; Lin i sar, 1999; Miskovic i sar, 2014). Publikovani podaci su pokazali da 99,7% svih SMA pacijenata mora imati bar jednu *SMNI* deleciju. Kao što je već diskutovano, iako većina ovih pacijenata ima deleciju obe kopije gena, postoji 3,4% slučajeva sa delecijom samo jedne *SMNI* kopije, dok drugi alel nosi tačkastu mutaciju (Wirth, 2000). S obzirom na tu činjenicu lažno negativni rezultati se mogu očekivati u slučajevima pacijenata koji su složeni heterozigoti ili veoma retko homozigoti za malu intragensku mutaciju u genu *SMNI* (Wirth i sar, 1997). Stoga je za preciznu prenatalnu dijagnozu neophodno imati molekularno genetičku potvrdu bolesti kod probanda, pre nego što se ponudi prenatalna dijagnoza u ovakvim porodicama.

Još jedan problem u prenatalnoj prognozi SMA leži u pomenutoj činjenici da *SMN* lokus ima visoku stopu *de novo* delecija i rearanžmana koja je nađena kod 2% pacijenata (Wirth i sar, 1997). Ova činjenica leži u osnovi visoke učestalosti nosioca mutacije u genu *SMNI* u opštoj populaciji (Ogino i Wison, 2004a). Mogućnost ovakvog događaja se mora uzeti u obzir prilikom genetičke procene rizika u nekim porodicama.

U odsustvu uzorka obolelog deteta određivanje broja kopija gena *SMNI* kod roditelja, kao što je opisano u prethodnom poglavlju, se može iskoristiti za donošenje odluke da li da se ponudi prenatalna dijagnostika i u nekim slučajevima bi se prevazišla gore pomenuta ograničenja.

- c. *Porodice u kojima jedan od partnera ima porodičnu SMA anamnezu koja podrazumeva postojanje obolelog člana porodice sa homozigotnom SMNI delecijom.* Porodicama u ovoj grupi je ponuđena prenatalna dijagnostika korišćenjem PCR/RFLP u periodu pre primene kvantitativnih metoda u rutinskoj dijagnostici SMA. Ni jedan od tri analizirana fetusa nije bio oboleo (tabela 25). Danas, nakon uvođenja kvantitativne MLPA metode, kod partnera analiziranih u ovoj grupi neophodno je da se prvo sprovede testiranje na status nosioca heterozigotne *SMNI* delecije na osnovu čega se potom donosi odluka o sprovođenju prenatalne dijagnoze.

## 6 ZAKLJUČCI

Rezultati dobijeni primenom molekularno genetičkih analiza u ovoj studiji omogućili su donošenje sledećih zaključaka u okviru postavljenih ciljeva:

1. Homozigotna delecija gena *SMNI* je uočena kod 81,3% (87/107) SMA pacijenata: delecija egzona 7 i 8 u 76,6% (82/107) i delecija samo egzona 7 u 4,7% (5/107) pacijenata, što je niže u odnosu na iste u drugim etničkim grupama, ali je u saglasnosti sa onim iz susednih populacija.
2. Učestalost homozigotne delecije opada što je blaža forma bolesti (SMA tip I - 93,1% (54/58), SMA tip II - 71,4% (25/35), SMA tip III - 57,1% (8/14)). Homozigotna delecija samo egzona 7 gena *SMNI* je dovoljna da dovede do razvoja bilo kog tipa SMA.
3. Kod 3/20 pacijenta, bez homozigotne delecije gena *SMNI* je detektovana jedna *SMNI* kopija i potvrđena heterozigotnost.
4. Kod 2/3 pacijenta potvrđena heterozigota sekvenciranje egzona 6 gena *SMN* je pokazalo prisustvo *missense* mutacije c.821C>T i potvrdilo kliničku dijagnozu blažeg oblika bolesti – SMA tip II.
5. Homozigotna delecija egzona 5 gena *NAIP* je detektovana kod 21,5% (23/107) pacijenata što je među najnižim do sada objavljenim, ali je u saglasnosti sa učestalostima iz susednih populacija. Prisustvo ove delecije kod 1% (1/100) kontrolnih uzoraka ukazuje da ovaj gen nije uzročnik bolesti i u saglasnosti je sa dosadašnjim podacima.
6. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti homozigotne delecije gena *NAIP* između tipova SMA – najučestalija je u grupi pacijenata sa SMA tip I (36,2% ili 21/58) što je u saglasnosti sa dosadašnjim podacima.

7. Veće homozigotne delecije koje obuhvataju oba gena – *SMN1* i *NAIP* su učestalije u grupi SMA tip I, dok su manje delecije ili njihovo odsustvo najučestaliji u grupi pacijenata sa SMA tip III, čime je pokazana asocijacija između veličine delecije i fenotipske ekspresije bolesti. Ovi rezultati ukazuju na moguću ulogu gena *NAIP* u modifikaciji težine kliničke slike SMA pacijenata.
8. Analiza broj kopija gena *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2* i *H4F5* kod pacijenata sa homozigotnom *SMN1* delecijom pokazala je:
- homozigotne i heterozigotne delecija gena *NAIP* su prisutne u 80% (24/30) svih analiziranih SMA pacijenata, a broj kopija ovog gena je u obrnutoj korelaciji sa fenotipom SMA pacijenata, odnosno opada sa težinom kliničke slike, čime je potvrđena ulogu gena *NAIP* kao značajnog prediktivnog markera za SMA
  - broj kopija gena *SMN2* je u korelaciji sa fenotipom SMA pacijenata tako što opada sa težinom kliničke slike, što se može koristiti kao jedan od pouzdanih prognostičkih parametara kod ove bolesti
  - komparativna analiza broja kopija gena *SMN2* i *NAIP* pokazuje da:
    - smanjenje broja kopija gena *NAIP* prati smanjenje broja kopija gena *SMN2* i rezultira u težem obliku bolesti
    - mehanizmi nastanka mutacija koje najčešće dovode do različitih tipova SMA su: homozigotne delecije kod SMA tip I, delecije jednog alela i genska konverzija drugog kod SMA tip II i genska konverzija oba alela kod SMA tip III.
  - broj kopija gena *GTF2H2* nije u korelaciji sa težinom bolesti. Uzimajući u obzir da je homozigotna delecija *GTF2H2* nađena samo kod SMA tip I pacijenata (30,8% ili 4/13) i da se nedostatak ovog gena uklapa u mehanizam kontinuirane velike delecije koja uključuje i druge gene iz 5q13 regiona kod najtežih oblika bolesti, ovaj gen se ipak može razmatrati kao potencijalni modifikator težine bolesti.
  - broj kopija gena *H4F5* nije u korelaciji sa težinom bolesti.

9. U cilju davanja genetičkog saveta zdravim članovima porodice obolelog i izračunavanja preciznog rizika za dobijanje bolesnog potomstva, neophodno je određivanje broja kopija gena *SMN1* i utvrđivanje heterozigotnog statusa kod zdravih članova porodice za šta je korišćena MLPA metoda opravdano sredstvo.
10. Prenatalna analiza homozigotne delecije egzona 7 i 8 gena *SMN1* je pokazala njeno prisustvo kod 19,7% (13/66) fetalnih uzoraka.
11. U slučajevima bez potvrde homozigotne delecije gena *SMN1* kao uzroka bolesti ili kod partnera sa porodičnom SMA anamnezom, za preciznu procenu rizika, genetički savet i planiranje porodice, neophodno je utvrđivanje tipa mutacija kod probanda ili utvrđivanje statusa heterozigotnog nosioca kod roditelja i/ili bliskih rođaka.
12. S obzirom na težinu bolesti, njenu genetičku kompleksnost, visoku učestalost asimptomatskih heterozigotni nosilaca delecije gena *SMN1* u opšoj populaciji, kao i na činjenicu da još uvek ne postoji adekvatna terapija ovakvih pacijenata jedini vid prevencije jeste prenatalna dijagnostika u porodicama sa rizikom.

## 7 LITERATURA

- Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H, Takada S, Matsuo M, Nakamura H. Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci* 2002; 48:25-31.
- Alias L, Bernal S, Fuentes-Prior P, Barcelo MJ, Also E, Martinez-Hernández R, Rodriguez-Alvarez FJ, Martin Y, Aller E, Grau E, Peciña A, Antinolo G, Galan E, Rosa AL, Fernandez-Burriel M, Borrego S, Millan JM, Hernandez-Chico C, Baiget M, Tizzano EF. Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene *Hum Genet* 2009;125:29-39.
- Amara A, Adala L, Ben Charfeddine I, Mamaï O, Mili A, Lazreg TB, H'mida D, Amri F, Salem N, Boughammura L, Saad A, Gribaa M. Correlation of SMN2, NAIP, p44, H4F5 and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2012; 16:167-74.
- Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat* 2003;22:74.
- Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostic in in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2006;16:830-8.
- Arkblad EL, Tulinius M, Kroksmark AK, Henricsson M, Darin N. A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr* 2009; 98:865-72.
- Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La Bella V, Pettmann B, Triller A. Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* 1999;11:293-304.
- Bergin AG, Kim DL, Price SS, Sisodia M, Lee K, Rabin BA. Identification and characterization of a mouse homologue of the spinal muscular atrophy-determining gene, survival motor neuron. *Gene* 1997; 204: 47-53.
- Brahe C, Clermont O, Zappata S, Tiziano F, Melki J, Neri G. Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum Mol Genet* 1996;5:1971-6.

- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 1990;344:540-41.
- Buchthal F, Olsen PZ. Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy. *Brain* 1970;93:15-30.
- Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U. Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1999;8:2351-7.
- Burghes AH. When Is a Deletion Not a Deletion? When It Is Converted. *Am J Hum Genet* 1997; 61:9-15.
- Burglen L, Amiel J, Viollet L, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Raclin V, Landrieu P, Verloes A, Munnich A, Melki J. Survival motor neuron gene deletion in the arthrogyrosis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association. *J Clin Invest* 1996;98:1130-2.
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995;4:1927-33.
- Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J. The Gene Encoding p44, a Subunit of the Transcription Factor TFIIH, Is Involved in Large-Scale Deletions Associated with Werdnig-Hoffmann Disease. *Am J Hum Genet* 1997; 60:72-9.
- Burlet P, Burglen L, Clermont O, Lefebvre S, Viollet L, Munnich A, Melki J. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996;33:281-3.
- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997;61:40-50.
- Carissimi C, Baccon J, Straccia M, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pelizzoni L. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett* 2005;579:2348-54.
- Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell G J, Burghes AH, Beattie CE. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci* 2006;26:11014-22.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3:285-98.
- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 2006;78:63-77.



- Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003;10:120-5.
- Carter TA, Bönnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet* 1997;6:229-36.
- Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trülzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet* 2003;12:1367-76.
- Chang HC, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A, Sridhar V, Fulga TA, Hart AC, Van Vactor D, Artavanis-Tsakonas S. Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS ONE* 2008;3:e3209.
- Chang JG, Jong YJ, Lin SP, Soong BW, Tsai CH, Yang TY, Chang CP, Wang WS. Molecular analysis of survival motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) genes of spinal muscular atrophy patients and their parents. *Hum Genet* 1997;100:577-81.
- Chen KL, Wang YL, Rennert H, Joshi I, Mills JK, Leonard DG, Wilson RB. Duplications and de novo deletions of the SMNt gene demonstrated by fluorescence-based carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* 1999; 85:463-69.
- Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, Besner-Johnston A, Farahani R, Xuan JY, Kang X, Lefebvre C, Jkeda JE, Korueluk RG, Mackenzie AE. Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 1998;48:121-27.
- Chen TH, Tzeng CC, Wang CC, Wu SM, Chang JG, Yang SN, Hung CH, Jong YJ. Identification of bidirectional gene conversion between SMN1 and SMN2 by simultaneous analysis of SMN dosage and hybrid genes in a Chinese population. *J Neurol Sci.* 2011;308:83-7.
- Cho K, Ryu K, Lee E, Won S, Kim J, Yoo OJ, Hahn S. Correlation between genotype and phenotype in Korean patients with spinal muscular atrophy. *Mol Cells* 2001;11:21-7.
- Clermont O, Burlet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, Cusin V. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat* 2004;24:417-27.
- Cobben JM, Scheffer H, De Visser M, Van der Steege G, Verhey JB, Osinga J, Burton M, Mensink RG, Grootsholten PM, Ten Kate LP, Buys CH. Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. Experience with linkage studies and consequences of present SMN deletion analysis. *Eur J Hum Genet* 1996;4:231-6.
- Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, Visser de M, Scheffer H, Buys CHCM. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1995; 57:805-8.
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997;6:1205-14.

- Crawford TO, Pardo CA. The Neurobiology of Childhood Spinal Muscular Atrophy. *Neurobiol Dis* 1996; 3:97-110.
- Cusco I, Barcelo MJ, Solera C, Parrab J, Baigeta M, Tizzanoa E. Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 109:1244–49.
- Cusin V, Clermont O, Gerard B, Chantereau D, Elion J. Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: Implication for genetic counselling. *J Med Genet* 2003; 40:E39.
- D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:71.
- DiDonato CJ, Ingraham SE, Mendell JR, Prior TW, Lenard S, Moxley RT 3rd, Florence J, Burghes AH. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann Neurol* 1997; 41:230-7.
- DiDonato CJ, Morgan K, Carpten JD, Fuerst P, Ingraham SE, Prescott G, McPherson JD, Wirth B, Zerres K, Hurko O, Wasmuth JJ, Mendell JR, Burghes AHM, Simard LR. Association between Ag1-CA alleles and severity of autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994;55:1218–29.
- Dubowitz V. Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2009;19:69–73.
- Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J. The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1365-70.
- El-Harouni AA, Essawi ML, Hindawy A. Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) gene deletions in Egyptian children with spinal muscular atrophy. *Med J Cairo Univ* 2001;9:733–8.
- Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a word survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19–29.
- Erdem H, Pehlivan S, Topaloglu H, Ozguc H. Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 1999;21:86–9.
- Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 2002;11:1605-14.
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B: Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time LightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 358– 68.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1997;90: 1023-9.
- Gerard B, Ginet N, Matthijs G, Evrard P, Baumann C, Da Silva F, Gerard-Blanluet M, Mayer M, Grandchamp B, Elion J. Genotype determination at the survival motor neuron locus in a normal population and SMA carriers using competitive PCR and primer extension. *Hum Mutat* 2000;16:253–63.

- Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 1999;274: 37908-14.
- Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, Dubowitz V, Munsat TL, Ott J, Davies KE. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990;345:823-25.
- Grimmler M, Otter S, Peter C, Muller F, Chari A, Fischer U. Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN complex and influences its intracellular localization. *Hum Mol Genet* 2005;14:3099-111.
- Hahnen ET, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1927-33.
- Hahnen ET, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B. Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 1996b;59:1057-65.
- Hahnen E, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S, Raschke H, Zerres K, Wirth B. Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet* 1997;6:821-5.
- Hahnen ET, Wirth B. Frequent DNA variant in exon 2a of the survival motor neuron gene (SMN): a further possibility for distinguishing the two copies of the gene. *Hum Genet* 1996a;98:122-3.
- Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, Matsuo M, Nishio H. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 2002; 249:1211-9.
- Hausmanowa-Petrusewicz I, Karwańska A. Electromyographic findings in different forms of infantile and juvenile proximal spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 1986;9:37-46.
- He J, Zhang QJ, Lin QF, Chen YF, Lin XZ, Lin MT, Murong SX, Wang N, Chen WJ. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. *Gene* 2013; 518:325-9.
- Hoeijmakers JHJ, Egly JM, Vermeulen W. TFIIF: a key component in multiple DNA transactions. *Curr Opin Genet Devel* 1996;6:26-33.
- Hoffmann J. Über die hereditäre progressive spinale Muskelatrophie im Kindesalter. *MMW* 1900; 47:1649-51.
- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9618-23.

- Huang CH, Chang YY, Chen CH, Kuo YS, Hwu WL, Gerdes T, Ko TM. Copy number analysis of survival motor neuron genes by multiplex ligation-dependent probe amplification *Genet Med* 2007; 9:241-8.
- Humbert S, van Vuuren H, Lutz Y, Hoeijmakers JHJ, Egly JM, Moncollin V. p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J* 1994;13:2393-8.
- Jedrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, Borkowska J, Kostera-Pruszczyk A, Sielska D, Jurek M, Hausmanowa-Petrusewicz I. Phenotype modifiers of spinal muscular atrophy: the number of SMN2 gene copies, deletion in the NAIP gene and probably gender influence the course of the disease. *Acta Biochim Pol* 2009; 56:103-8.
- Jordanova A, Stoyanova V, Uzunova M, Litvinenko I, Kremensky I. Deletion analysis of Bulgarian SMA families. *Hum Mutat* 1998; 12:33-8.
- Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 2003;34:460-3.
- Kashima T, Rao N, Manley JL. An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3426-31.
- Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13312-7.
- Kiss T. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci* 2004;117:5949-51.
- Kocheva SA, Vlaski-Jekic S, Kuturec M, Efremov GD. Molecular analysis of survival motor neuron and neuronal apoptosis inhibitory protein genes in Macedonian Spinal Muscular Atrophy patients. *BJMG* 2007; 10: 55-60.
- Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy: A Timely Review. *Arch Neurol* 2011;68:979-84.
- Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, Didonato C, Swoboda K, Maria BL. Spinal Muscular Atrophy: Classification, Diagnosis, Management, Pathogenesis, and Future Research Directions. *J Child Neurol* 2007;22:926-45.
- Lefebvre S, Burglen L, Frezal J, Munnich A, Melki J. The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1998;7:1531-36.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Paslier DL, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155-65.
- Lin SP, Chang JG, Jong YJ, Yang TY, Tsai CH, Wang NM, Li H, Hsieh-Li HM, Hu CJ. Prenatal prediction of spinal muscular atrophy in Chinese. *Prenat Diagn* 1999;19:657-61.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton—Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996;379:349e53.
- Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996;15:3555-65.

- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 1997; 906: 1013-21.
- Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 2000;9:259-65.
- Lorson CL, Androphy EJ. The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum Mol Genet* 1998b;7:1269-75.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6307-11.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 1998a;19:63-6.
- Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, Burghes AH, Prior TW. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med* 2002;4:20-6.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 1997;60:1411-22.
- Meister G, Buhler D, Laggerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U. Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons 70 (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet* 2000;9:1977-86.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, Fontan D, Ponsot G, Billette T, Angelini C, Barbosa C, Ferriere G, Lanzi G, Ottolini A, Babton MC, Cohen D, Hanauer A, Clerget—Darpoux F, Lathrop M, Munnich A, Frezal J. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosomes 5q. *Nature* 1990a;344:767–68.
- Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 1994;264:1474–77.
- Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 1990b;336:271–73.
- Miguel-Aliaga I, Chan YB, Davies KE, van den Heuvel M. Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett* 2000;486: 99-102.
- Miskovic M, Lalic T, Radivojevic D, Cirkovic S, Ostojic S, Guc-Scekic M. Ten years of experience in molecular prenatal diagnosis and carrier testing for spinal muscular atrophy among families from Serbia. *Int J Gynaecol Obstet* 2014;124:55-8.

- Miskovic M, Lalic T, Radivojevic D, Cirkovic S, Vlahovic G, Zamurovic D, Guc-Scekic M. Lower incidence of deletions in the survival of motor neuron gene and the neuronal apoptosis inhibitory protein gene in children with spinal muscular atrophy from Serbia. *Tohoku J Exp Med* 2011;225:153-9.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 1999a; 8:1177-83.
- Monani UR, McPherson JD, Burghes AH. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* 1999b;1445:330-6.
- Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. *Neuromuscul Disord* 1992;2(5-6):423-8.
- Nigro MA. Spinal muscular atrophy. In (eds): Maria BL. *Current Management in Child Neurology*, Third Edition. BC Decker Inc, London, UK, 2005; Chapter 60.
- Ogino S, Gao S, Leonardalias DG, Paessler M, Wilson RB. Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 275-7.
- Ogino S, Wilson RB. SMN Dosage Analysis and Risk Assessment for Spinal Muscular Atrophy *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1596-8.
- Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2004a;4:15-29.
- Ogino S, Wilson RB, Gold B. New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region: simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet* 2004b;12:1015-23.
- Orita M, Iwahana H, Knazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of the polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natd Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 2000;9:47-56.
- Parsons DW, McAndrew PE, Iannaconne ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW. Intragenic telSMN mutations: Frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modifications of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet* 1998;63:1712-23.
- Paushkin S, Charroux B, Abel L, Perkinson RA, Pellizzoni L, Dreyfuss G. The survival motor neuron protein of *Schizosacharomyces pombe*. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J Biol Chem* 2000; 275: 23841-6.
- Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980;1:919-22.
- Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1978;15:409-13.

- Pearn J. Patients subjective interpretations of risks offered in genetic counseling. *J Med Genet* 1973;10:129–34.
- Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 2007;8:340-5.
- Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11167-72.
- Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ, Burghes AH, Kissel JT. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet* 2009;85:408–13.
- Prior TW, Russman BS. Spinal Muscular Atrophy. *GeneReviews* 2013; URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/>
- Prior TW, Snyder PJ, Rink BD, Pearl DK, Pyatt RE, Mihal DC, Conlan T, Schmalz B, Montgomery L, Ziegler K, Noonan C, Hashimoto S, Garner S. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet A* 2010; 152A:1608–16.
- Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet* 2004; 130A:307-10.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum Genet* 2001;108: 255-66.
- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE. Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1995; 4:631–4.
- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Patel S, Muntoni F, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE. Gene deletion in spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1996;33(2):93–6.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie A. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167–178.
- Rudnik-Schoneborn S, Berg C, Zerres K, Betzler C, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Heller R. Genotype-phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy (SMA) type I in Germany: implications for clinical trials and genetic counselling. *Clin Genet* 2009;76:168-78
- Rudnik-Schoneborn S, Eggermann T, Kress W, Lemmink HH, Cobben JM, Zerres K. Clinical utility gene card for: proximal spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2012 Jun;20(6).
- Russman BS. Spinal Muscular Atrophy: Clinical Classification and Disease Heterogeneity. *J Child Neurol* 2007;22:946-51.

- Sanger F, Nickleu S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463.
- Savas S, Gokgoz N, Kayserili H, Ozkinay F, Yuksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions in SMN, NAIP and BTF2p44 genes in Turkish spinal muscular atrophy patients. *Hum Hered* 2000; 50:162-5.
- Scarciolla O, Stuppia L, De Angelis MV, Murru S, Palka C, Giuliani R, Pace M, Di Muzio A, Torrente I, Morella A, Grammatico P, Giacanelli M, Rosatelli MC, Uncini A, Dallapiccola B. Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics* 2006;7:269-76.
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics *Nat Genet* 1998;20:83-6.
- Scheffer H, Cobben JM, Mensink RG, Stulp RP, van der Steege G, Buys CH. SMA carrier testing – validation of hemizygous SMN exon 7 deletion test for the identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients with a single allele deletion. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:79–86.
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9920 – 25.
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Buhler D, Fischer U, Sattler M. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol* 2001;8:27-31.
- Sertic J, Barisic N, Sostarko M, Bosljak N, Culic V, Cvitanovic Lj, Ferencak G, Brzovic V, Stavlenic-Rukavina A. Deletion in the SMN and NAIP genes in patients with Spinal Muscular Atrophy in Croatia. *Coll Antropol* 1997; 21:487-92.
- Shpargel KB, Matera AG. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17372-7.
- Simard LR, Rochette C, Semionov A, Morgan K, Vanasse M. SMN(T) and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity. *Am J Med Genet* 1997;72:51-8.
- Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, et al: Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 2006; 26:1333-46.
- Skordis LA, Dunckley MG, Burglen L, Campbell L, Talbot K, Patel S, Melki J, Davies KE, Dubowitz V, Muntoni F. Characterisation of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA. *Hum Genet* 2001;108:356-7.
- Smith M, Calabro V, Chong B, Gardiner N, Cowie S, du Sart D. Population screening and cascade testing for carriers of SMA. *Eur J Hum Genet* 2007;15:759-66.
- Stevens G, Yawitch T, Rodda J, Verhaart S, Krause A. Different molecular basis for spinal muscular atrophy in South African black patients. *Am J Med Genet*. 1999;86:420-6.



- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 2012; 13:3245-76.
- Sun Y, Grimmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B. Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat* 2005;25:64–71.
- Su YN, Hung CC, Li H, Lee CN, Cheng WF, Tsao PN, Chang MC, Yu CL, Hsieh WS, Lin WL, Hsu SM. Quantitative Analysis of SMN1 and SMN2 Genes Based on DHPLC: A Highly Efficient and Reliable Carrier-Screening Test. *Hum Mutat* 2005;25:460-67.
- Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE. Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* 1997;6:497-500.
- Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG. Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 1998;6:467-74.
- Tran VK, Haryo Sasongko TH, Hong DD, Hoan NT, Dung VC, Lee MJ, Gunadi, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. SMN2 and NAIP gene dosages in Vietnamese patients with spinal muscular atrophy. *Pediatr Int* 2008; 50: 346–35.
- van Bergeijk J, Rydel-Konecke K, Grothe C, Claus P. The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus. *FASEB J* 2007; 21: 1492-502.
- van der Steege G, Grootsholten PM, Cobben M, Zappata S, Scheffer H, den Dunne JT, van Ommen GJB, Brahe C, Buys CHCM. Apparent gene conversion involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 1996;58:834–38.
- van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, C.H.C.M. Buys. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995; 345:985–6.
- Van Meerbeke JP, Sumner CJ. Progress and Promise: The Current Status of Spinal Muscular Atrophy Therapeutics *Discov Med* 2011;12:291-305.
- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernández-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 1996;5:257-63.
- Vitali T, Sossi V, Tiziano F et al: Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for SMN2 in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2525– 32.
- Wang CH, Carter TA, Das K, Xu J, Ross BM, Penchaszadeh GK, Gilliam TC. Extensive DNA deletion associated with severe disease alleles on spinal muscular atrophy homologues. *Ann Neurol* 1997;42:41-9.

- Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A; Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy. *J Child Neurol* 2007;2:1027-49.
- Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH, Tang TH, Zabidi-Hussin ZA, Nishio H, Zilfalil BA. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 2009;3:42-5.
- Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1891; 22:437–81.
- Will CL, Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 2000;13:290-301.
- Wirth B. An Update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Hum Mutat* 2000; 15:228-37.
- Wirth B. Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002;3:87-95.
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E. Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:121-31.
- Wirth B, Hahnen E, Morgan K, DiDonato CJ, Dadze A, Rudnik-Schöneborn S, Simard LR, Zerres K, Burghes AHM. Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum Mol Genet* 1995;4:273–1284.
- Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Wienker T, Zerres K. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1999;64:1340–56.
- Wilson AM, Watson JC, Lichtwark GA. A catapult mechanism for rapid limb protraction. *Nature* 2003;421:35–36.
- Yamashita M, Nishio H, Harada Y, Matsuo M, Yamamoto T. Significant increase in the number of the SMN2 gene copies in an adult-onset Type III spinal muscular atrophy patient with homozygous deletion of the NAIP gene. *Eur Neurol* 2004;52:101–6.
- Young PJ, Le TT, thi Man N, Burghes AH, Morris GE. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 2000a; 256: 365-74.
- Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet* 2000b; 9: 2869-77.

- Yu-jin Q, Juan D, Er-zhen L, Jin-li B, Yu-wei J, Hong W, Fang S. Subtle mutations in the SMN1 gene in Chinese patients with SMA: Arg288Met mutation causing SMN1 transcript exclusion of exon7. *BMC Medical Genetics* 2012; 13:86.
- Zapletalova E, Hedvicakova P, Kozak L, Vondracek P, Gaillyova R, MarikovaT, Kalina Z, Jüttnerova V, Fajkus J, Fajkusova L. Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscul Disord* 2007; 17:476–81.
- Zatkova A, Hahnen E, Wirth B, Kadasi L. Analysis of the SMN and NAIP genes in slovak spinal muscular atrophy patients. *Hum Hered* 2000;50:171-4.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscle atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 1995;52:518–23.
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 2003; 2316: 6627-37.

### **7.1 Literatura sa interneta**

MRC-Holland MLPA. SALSA MLPA P021 SMA probemix version: A2,

<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx>

Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

Coffalyser.net, <http://coffalyser.wordpress.com/>

## BIOGRAFIJA

Marijana D. Mišković je rođena 10.10.1975. godine u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu u Beogradu (srednja ocena 9,14) u januaru 2002. godine, na studijskoj grupi: molekularna biologija i fiziologija, smer Biomedicina. Diplomski rad pod nazivom: „Familijarna balansirana translokacija između hromozoma 10 i 18”, odbranila je sa ocenom 10.

Od februara 2002. godine zaposlena je u Laboratoriji za medicinsku genetiku Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije «Dr Vukan Čupić» (IMD), gde radi na poslovima postnatalne i prenatalne citogenetičke dijagnostike hromozomopatija, kao i prenatalnoj i postnatalnoj molekularno genetičkoj dijagnostici monogenских oboljenja. Jedan je od članova Genetičkog savetovališta IMD-a.

U 2008. godini dobila je nacionalnu stipendiju Genetičkog društva Srbije i Komiteta «European Human Genetics Conference» (Vienna Medical Academy, Alser Strasse 4, A-1090 Vienna, Austria) na čijoj je konferenciji učestvovala sa poster prezentacijom. U 2009. godini je dobila stipendiju Evropske genetičke fondacije «European Genetics Foundation» (Via di Gaibola 16, 40136 Bologna, Italy) za učestvovanje na kursu iz genetičkog savetovanja «9<sup>th</sup> Course in Genetic Counselling in Practice».

Doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu upisala je 2009. godine u oblasti Biologije, modul: Genetika. Tokom oktobra 2012. godine se obučavala za izvođenje i interpretaciju rezultata genetičkih analiza primenom MLPA metode u Laboratoriji za medicinsku genetiku St. Orsola-Malpighy bolnice u Bolonji, Italija. Poster prezentacije radova iz oblasti dijagnostike hromozomopatija i molekularno genetičke dijagnostike monogenских oboljenja imala je na 6 stranih simpozijuma, dok je kao predavač učestvovala je na pet seminara u zemlji. Iz uže naučne oblasti objavila je tri rada u časopisima međunarodnog značaja od kojih se u dva pojavljuje kao prvi autor.

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а Маријана Мишковић

број уписа Б 3510/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије  
код пацијената из Србије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.09.2014



---

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Маријана Мишковић

Број уписа Б 3510/2009

Студијски програм Биологија: Генетика

Наслов рада Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије код пацијената из Србије

Ментор проф. др Марија Гућ Шћекић

Потписани Маријана Мишковић

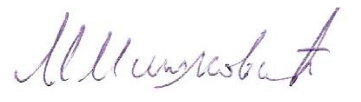
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.09.2014.



### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Варијабилност генотипа и фенотипске експресије спиналне мишићне атрофије код пацијената из Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.09.2014.

