

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАТОРЫ ФЕНОТИПА СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

Н.В. ГРИЩЕНКО¹, А.А. ЮРЧЕНКО², А.С. КАРАМАН², Л.А. ЛИВШИЦ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
03680, Киев, ул. академика Заболотного, 150, Украина

² УНЦ «Институт биологии и медицины» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,
03022, Киев, пр-т академика Глушкова 2, Украина

E-mail: dnatest@imbg.org.ua.

Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) – аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, обусловленное гомозиготной делецией 7-го экзона гена SMN1. Цель работы: анализ ассоциации аллельного полиморфизма теломерных генов SMN1, NAIP и центромерного гена SMN2 области 5q13 с клиническим фенотипом СМА. Показано, что гомозиготный генотип с теломерной делецией, которая охватывает не только SMN1, но еще и ген NAIP, достоверно чаще наблюдается у пациентов с самым тяжелым типом СМА. Три и более копии SMN2 ассоциировано с более легким фенотипом, количество копий SMN2 намного сильнее влияет на фенотип СМА, чем протяженность теломерной делеции. Установлено, что у СМА-пациентов с гомозиготной делецией SMN1 и NAIP достоверно чаще выявляют 1 копию SMN2. Это может свидетельствовать о наличии большой делеции, охватывающей все три исследуемых гена и ассоциированной с тяжелым типом СМА. Отмечено, что врожденная СМА (0 тип) достоверно реже встречается у девочек, что может указывать на наличие генов модификаторов СМА на X-хромосоме.

Ключевые слова: спинальная мышечная атрофия, SMN1, NAIP, SMN2, фенотип, гендер.

Введение. Проксимальная спинальная мышечная атрофия (СМА) (от англ. SMA – spinal muscular atrophy) – моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся дегенерацией передних роговых клеток спинного мозга, реже двигательных нервов ствола головного мозга, реже двигательных нервов ствола головного мозга, что приводит к симметричной мышечной слабости и атрофии [1]. По тяжести течения СМА детского возраста классифицируется на 4 клинических типа в соответствии с возрастом дебюта, максимальной мышечной активностью и выживаемостью пациента [2, 3]. 0 тип, врожденная СМА: диа-

гностируется в пренатальном или раннем перинатальном периоде, дети с рождения имеют тяжелую гипотонию и нуждаются в поддержке дыхания. Продолжительность жизни в большинстве случаев не превышает 6 мес. I тип, детская СМА, болезнь Верднига-Гоффмана: первые симптомы болезни проявляются в возрасте 1–6 мес. Чаще всего продолжительность жизни ограничена 2 годами. У пациентов наблюдается задержка моторного развития, трудности с дыханием, сосанием и глотанием, дети не держат голову, не могут сидеть без поддержки. II тип, промежуточный тип СМА: дебют заболевания приходится на период 0,5–2 года. Больные этим типом СМА могут самостоятельно есть, сидеть, но никогда не могут ходить самостоятельно. Продолжительность жизни снижена, пациенты доживают до 18 лет, прогноз в этих случаях зависит от степени вовлечения в патологический процесс респираторных мышц. III тип, ювенильная СМА, болезнь Кюгельберга-Веландер: симптомы проявляются в 12–36 мес. Наиболее благоприятный тип заболевания, продолжительность жизни снижена незначительно. Пациент способен стоять, и ходить, но испытывает сильную мышечную слабость с тенденцией к инвалидности (передвижение в коляске). Кроме того выделяют очень редкий IV тип, взрослая СМА: симптомы проявляются во 2-й декаде или еще позже, двигательная функция практически не нарушена (частота 1–9 : 1000000).

В хромосомной области 5q13 находится инвертированная дупликация, размером 500 т.п.н., которая встречается только у человека и представляет собой генетически нестабильный участок с «горячим точками» неаллельных гомологических рекомбинаций (эктопическая рекомбинация, ЭР) [4]. Вследствие ЭР регион

© Н.В. ГРИЩЕНКО, А.А. ЮРЧЕНКО, А.С. КАРАМАН,
Л.А. ЛИВШИЦ, 2020

подвержен геномным реорганизациям: делециям, дупликациям и генным конверсиям. Генетическими детерминаторами СМА являются гомозиготные делеции в теломерной копии дупликации. В этой части локуса 5q13 идентифицировано 4 гена, среди которых *SMN1* (ген выживания моторных нейронов 1) и *NAIP* (ген ингибитора нейронального апоптоза). Тяжесть фенотипа СМА коррелирует с протяженностью делеции в теломерной копии локуса 5q13, которая может охватывать как *SMN1*, так и *NAIP* [5]. В центромерном участке находятся копии данных генов (псевдогены и экспрессирующиеся гены), которые незначительно отличаются по нуклеотидной последовательности от предковых теломерных копий генов. Ген *SMN2* является экспрессирующейся копией гена *SMN1*. Известны генетические факторы, которые модифицируют тяжесть фенотипа СМА, одним из которых является вариация копийности гена *SMN2*, возникшая благодаря ЭР-опосредованным геномным реорганизациям.

Гены *SMN1* и *SMN2* кодируют белок SMN, который присутствует как в цитоплазме, так и в ядре клеток различных тканей в составе SMN комплексов. Белок наиболее активно экспрессируется в двигательных нейронах спинного мозга, мышцах и печени, у пациентов со СМА наиболее значимо снижена его экспрессия в спинном мозге [6, 7]. Он необходим для поддержания активности двигательных нейронов, контролирующего движение мышц. Белковые продукты генов *SMN1* и *SMN2* участвует в сплайсинге пре-мРНК, транспортировке зрелых мРНК и росте аксонов [8, 9]. У СМА-пациентов с гомозиготными делециями гена *SMN1* экспрессия белка происходит с *SMN2*, который способен обеспечить 10–30 % необходимого для мотонейронов белка SMN [10, 11].

До недавнего времени не существовало эффективного лечения данного заболевания. В последние годы FDA (U.S. Food and Drug Administration) и EMA (European Medicines Agency) одобрили несколько препаратов для лечения СМА с помощью генной терапии [12, 13], еще несколько таких препаратов проходят клинические испытания. Однако, несмотря на прорыв в генной терапии СМА, цена такого лече-

ния колеблется от 500 тыс. до 2 млн. долларов. Кроме того, эффективность генотерапевтических препаратов напрямую зависит от генотипа пациента не только по гену-детерминатору (*SMN1*), но и от всех возможных генетически обусловленных модификаторов клинического фенотипа. Поэтому, актуальным как для фундаментальных исследований, так и для оценки экономической составляющей терапии, остается определение роли генетических факторов в модификации клинического фенотипа СМА.

Цель работы: анализ ассоциации аллельного полиморфизма генов *SMN1*, *SMN2* и *NAIP* хромосомной области 5q13 и других генетических факторов с клиническим фенотипом спинальной мышечной атрофии.

Материалы и методы. Анализ клинических данных и формирования выборок. Объект исследования – коллекция ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови больных с клиническими признаками спинальной мышечной атрофии детского возраста из разных регионов Украины. В период 1990–2018 гг. образцы крови и клинические данные пациентов, при условии информированного согласия, были предоставлены областными медико-генетическими центрами Украины и АР Крым, клиниками г. Киев: НДСБ ОХМАТДЕТ, «Исида-IVF» и ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины».

ДНК выделяли стандартным методом: путем гидролиза лизатов клеток протеиназой K (Termo Fisher Scientific, ЕС) с последующей фенольной экстракцией [14]. Качество и количество препаратов ДНК определяли по спектральным характеристикам и путем электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле. Критериями оценки качества образцов ДНК являлись соотношения оптической плотности $\lambda 260/\lambda 280$ и $\lambda 260/\lambda 230$, рассчитанные на приборе ND-1000 Spectrophotometer («NanoDrop», США).

Определение копийности гена *SMN2* с использованием количественной ПЦР в реальном времени. В работе использовались два варианта количественной ПЦР (qPCR): с интеркалирующим красителем (скринирующий метод) и зондами TaqMan (уточняющий метод). qPCR с зондами TaqMan была использована для более точного определения копий исследуемого

гена в образцах ДНК с 3 и более копиями *SMN2*, поскольку данный метод имеет более высокую разрешающую способность [15–17].

Для амплификации экзонных последовательностей гена *SMN2* и *ALB* использовали специфические праймеры и зонды, опубликованные ранее, с собственными модификациями [17–19]. Проверку специфичности модифицированных последовательностей олигонуклеотидов проводили при помощи онлайн-ресурсов NCBI BLAST, WASP и Genome Browser Gateway [20–22]. Учитывая то, что исследуемая нуклеотидная последовательность 7-го экзона гена *SMN2* отличается от соответствующей последовательности гена *SMN1* только 1 нуклеотидом, критичным при дизайне праймеров являлась близкая к 100 % специфичность отжига праймерных олигонуклеотидов.

Реакционная смесь для qPCR с интеркалирующим красителем EvaGreen® объемом 20 мкл содержала 1-кратную коммерческую смесь HOTFIREPol® EvaGreen® qPCRSupermix (SolisBiodyne, ЕС), 0,7 мкм праймеры и 50–75 нг (5 мкл) матрицы геномной ДНК.

Для qPCR с зондами TaqMan в 20 мкл смеси содержалась 1-кратная коммерческая смесь HOT FIREPol® Probe qPCR MixPlus (SolisBiodyne, ЕС), 0,3 мкм зонды (с красителем FAM для генов *SMN* и *Cy5* – для *ALB*, синтезированные фирмой Симеста, Одеса) 1,0 мкм праймеры и 50–75 нг (5 мкл) матрицы геномной ДНК.

Реакцию qPCR проводили с использованием системы для проведения ПЦР в реальном времени CFX96 (BIO-RAD, США). Пробы подвергали предварительному прогреву 12 мин при 95 °С для денатурации ДНК и активации полимеразы HOT FIREPol® DNA Polymerase. Дальнейшая ПЦР проводилась в температурном режиме: 95 °С – 15 с, 57 °С – 40 с, 72 °С – 20 с, 40 циклов. Регистрацию флуоресцентного сигнала проводили в конце стадии элонгации. Относительное количество копий гена *SMN2* рассчитывали с использованием упрощенной формулы Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) [23]. Количественные показатели ПЦР оценивались с использованием программного пакета CFX Manager™ Software (BIO-RAD).

Статистическая обработка результатов. Оценку результатов проводили с помощью па-

кета программ «OpenEpi», версия 3.0. Достоверность выявленной разницы в частоте генотипов оценивали с использованием критерия χ^2 . Значимость различий в распределении частот генотипов и фенотипов оценивалось по показателю OR (Odds Ratio). Анализ взаимосвязи качественных признаков проводили с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

Пороговым значением статистической значимости для всех использованных тестов принимали $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследование гомозиготных делеций генов теломерной копии области 5q13 (7-й и 8-й экзоны *SMN1* и 5-й экзон *NAIP*) проведено 1950 пациентам с клиническим диагнозом СМА. Гомозиготная делеция как минимум 7-го экзона гена *SMN1* идентифицирована у 571 пробандов, что подтверждает у них клинический диагноз. Для анализа копийности гена *SMN2* отобрана ДНК 170 пробандов с подтвержденным диагнозом СМА и установленным клиническим типом, эти образцы составили исследуемую группу. Одним из критериев отбора также было качество и количество образцов ДНК, поскольку эти характеристики критичны для qPCR.

В исследуемой выборке были пациенты с различным возрастом дебюта заболевания (от рождения до 3 лет) и разной степенью поражения мотонейронов, что соответствовало критериям всех вышеперечисленных типов СМА. Минимальный возраст пациентов составлял 0,01 года, а максимальный – 42,76 года. Наблюдалось следующее распределение по типам СМА: 0 тип встречался с наименьшей частотой – 16 %; II и III встречались чаще – 29 и 20 %, соответственно; наиболее частым оказался I тип – 35 %.

Наиболее часто встречались пациенты с гомозиготной делецией 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1* (63,5 %). Реже – пробанды с более протяженной делецией, в которую кроме гена *SMN1* вовлечен ген *NAIP* (21,8 %). Наиболее редким оказался генотип с гомозиготной делецией только 7 экзона гена *SMN1* (14,7 %).

Ранее нами установлено, что пациенты с гомозиготной делецией только 7-го экзона гена *SMN1* достоверно чаще имеют III тип СМА, а у пробандов с гомозиготной делецией двух

теломерных генов (*SMN1* и *NAIP*) достоверно чаще диагностируют 0–1 тип СМА [18]. В табл. 1 представлено распределение частот генотипов по генам *SMN1* и *NAIP* у СМА-пробандов с разными клиническими типами заболевания в исследуемой выборке ($n = 170$).

Полученные результаты согласуются с данными, полученными нами ранее. Установлено, что у пациентов с врожденным типом СМА (0 тип) достоверно реже выявлен генотип с гомозиготной делецией только 7-го экзона гена *SMN1*, чем генотип с протяженной теломерной делецией, а у пациентов со II типом СМА достоверно чаще выявлена делеция 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1* в гомозиготном состоянии, чем генотип с более протяженной гомозиготной делецией теломерных генов. С другой стороны протяженная теломерная делеция в гомозиготном состоянии достоверно чаще встречается у пациентов с наиболее тяжелым типом СМА 0, чем у пациентов со II и III типами.

Для оценки вклада делеций генов *SMN1* и *NAIP* в модификацию фенотипа заболевания проведен корреляционный анализ. Рассчитаны коэффициенты корреляции по Спирмену между типом СМА и протяженностью гомозиготной делеции теломерного участка 5q13 ($r = -0,30$; $p = 8 \times 10^{-5}$). Согласно полученным данным выявленная корреляция является статистически значимой и подтверждает полученные ранее данные. Однако, корреляция достаточно слабая, поскольку позволяет объяснить не более трети СМА-фенотипов в нашей выборке пациентов. Полученные данные свидетельствуют в пользу наличия более значимых модифицирующих факторов для данного заболевания.

Одним из генов-модификаторов СМА является центромерный ген *SMN2*. В нашем исследовании проведен анализ количества копий этого гена в образцах ДНК СМА-пациентов, а также проанализированы ассоциации количества копий *SMN2* с клиническим типом СМА. Согласно полученным данным (рис. 1) установлено, что у большинства пациентов в исследуемой выборке встречался генотип с 2 копиями *SMN2* (56 %), реже встречались генотипы с 1, 3 или 4 копиями. В единичных случаях у пациентов идентифицировано 5 копий гена.

Проведен анализ распределения частот генотипов по количеству копий гена *SMN2* в каждой подгруппе СМА-пациентов в зависимости от их клинического фенотипа (табл. 2).

Следует отметить, что у пациентов с тяжелой врожденной формой заболевания (0 тип, средний возраст 0,18 лет SD = 0,16) количество копий гена *SMN2*, за исключением одного пациента, не превышала 2. При этом почти в половине случаев у таких больных выявляли только 1 копию гена *SMN2*, в то время как у больных с легким типом СМА (III тип, средний возраст 18,74 лет SD = 12,50) не обнаружили генотипа с 1 копией этого гена. Исходя из данных результатов, можем предположить, что генотип с 1 копией гена *SMN2* является наиболее неблагоприятным для прогноза течения СМА и продолжительности жизни больных. Установлено, что частота генотипов с 1 и 2 копиями гена *SMN2* (84,4 %) достоверно выше ($p < 0,0001$) у больных с 0–II типами СМА по сравнению с пациентами с III типом (33,3 %). Генотипы с 3–5 копиями достоверно чаще ($p < 0,0001$) были представлены в подгруппе больных с III типом СМА (66,7 %), чем у больных с тяжелыми типами СМА (15,6 %). Генотипы с 4 и 5 копиями гена *SMN2* достоверно чаще встречались у пациентов с III типом СМА ($p < 1 \times 10^{-5}$). Показательным является то, что большинство больных с III типом СМА (23 из 33 пациентов, 69,7 %) на момент последнего

Таблица 1. Распределение частот генотипов по гомозиготной делеции *SMN1* и *NAIP* у пациентов с разными типами СМА

Тип СМА	Генотип по теломерной делеции		
	del ex7	del ex7, 8	del ex7, 8, 5
0 тип ($n = 28$)	0,036*	0,464	0,500*, †
I тип ($n = 59$)	0,170	0,559	0,271
II тип ($n = 49$)	0,163	0,755*	0,082*†
III тип ($n = 34$)	0,177	0,735	0,088†

Примечания: del ex7 – гомозиготная делеция 7-го экзона гена *SMN1*; del ex7, 8 – гомозиготная делеция 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1*; del ex7, 8, 5 – гомозиготная делеция 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1*, а также 5-го экзона гена *NAIP*; *, † – отличия частот генотипов достоверны, $p < 0,05$.

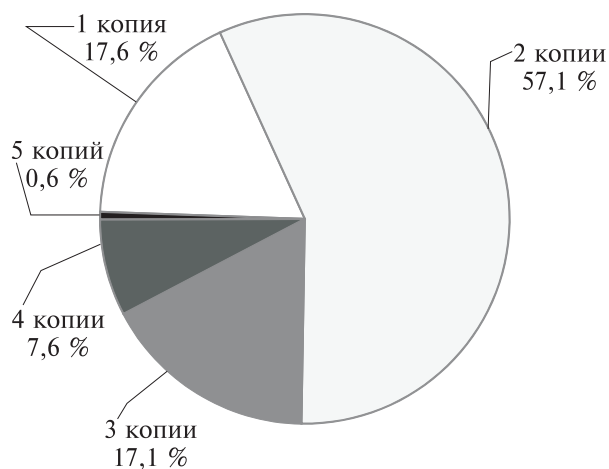


Рис. 1. Распределение частот генотипов по количеству копий гена *SMN2* у СМА-пациентов с гомозиготными делециями в гене *SMN1* ($n = 170$)

Таблица 2. Частоты генотипов по гену *SMN2* у пациентов с различными клиническими типами СМА ($n = 170$)

Тип СМА	Количество копий <i>SMN2</i>				
	1	2	3	4	5
0 тип ($n = 28$)	0,429	0,500	0,071	0	0
I тип ($n = 59$)	0,220	0,644	0,119	0,017	0
II тип ($n = 49$)	0,102	0,674	0,204	0,02	0
III тип ($n = 34$)	0	0,353	0,294	0,324	0,029

Таблица 3. Распределение частот генотипов по гену *SMN2* у пациентов с различными типами теломерных реорганизаций локуса 5q13 ($n = 170$)

Тип теломерной делеции	Количество копий <i>SMN2</i>		
	1	2	≥ 3
del ex7 ($n = 25$)	0,08*	0,56	0,36*
del ex7, 8 ($n = 107$)	0,18	0,54	0,28
del ex7, 8, 5 ($n = 38$)	0,24*	0,66	0,10*

Примечание: del ex7 – гомозиготная делеция 7-го экзона гена *SMN1*; del ex7, 8 – гомозиготная делеция 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1*; del ex7, 8, 5 – гомозиготная делеция 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1*, а также 5-го экзона гена *NAIP*; * – отличия частот генотипов достоверны, $p < 0,05$.

обследования были старше 10 лет, средний возраст в этой группе составил 18,56 лет ($SD = 12,65$), что гораздо выше среднего возраста пациентов с более тяжелыми типами СМА.

Для оценки значимости ассоциаций копийности *SMN2* с фенотипом СМА проведен корреляционный анализ, аналогичный анализу, проведенному для теломерных делеций. Установлено, что количество копий *SMN2* коррелирует с фенотипом СМА ($r = 0,50$; $p = 4,35 \times 10^{-12}$) – чем больше копий *SMN2*, тем легче фенотип СМА. Отметим, что количество копий *SMN2* намного сильнее коррелирует с типом СМА, чем протяженность теломерной делеции.

Учитывая, что геномные реорганизации в локусе 5q13, следствием которых являются делеции и дупликации исследуемых генов, имеют рекуррентное происхождение, мы предположили, что одна из реорганизаций, приведшая к образованию мутантного аллеля с делецией как гена *SMN1*, так и *NAIP*, может захватывать и центромерную область, в результате чего делетируется и ген *SMN2*. В этом случае ассоциация гомозиготной делеции *NAIP* с тяжелым фенотипом СМА может быть не столько следствием роли *NAIP* в процессе выживания мотонейронов, а, в первую очередь, происходит из-за уменьшения копийности *SMN2*. С другой стороны, у пациентов с гомозиготной делецией только 7-го экзона *SMN1*, причиной которой в большинстве случаев является генная конверсия с образованием гибридного гена *SMN2/SMN1*, наблюдают менее агрессивное течение СМА [24]. Согласно гипотезе о решающей роли гена *SMN2* в модификациях фенотипа СМА, можем предположить, что генная конверсия с образованием гена *SMN2/SMN1*, 7-й экзон которого имеет нуклеотидную последовательность гена *SMN2*, а 8-й – гена *SMN1*, приводит к образованию гена с экзонной последовательностью, не отличающейся от *SMN2*. Соответственно, при отсутствии делеций в центромерной части 5q13 копийность анализируемого нами 7-го экзона *SMN2* у гибридного гена возрастает до 3 и более копий. В этом случае увеличение продукции *SMN2*-белка играет решающую роль в облегчении фенотипа СМА у пациентов с гибридным геном. Для подтверждения наших пред-

положений о комплексном характере реорганизаций локуса 5q13 мы проанализировали ассоциацию протяженности теломерных делеций с копийностью центромерного гена *SMN2* (табл. 3).

Согласно полученным данным выявлена зависимость между типом теломерной делеции и числом копий гена *SMN2*. У пациентов с гомозиготной делецией двух исследуемых теломерных генов (*SMN1* и *NAIP*) достоверно чаще, чем у носителей гомозиготной делеции только 7-го экзона *SMN1*, наблюдается 1 копия *SMN2* (OR = 7,7; ДИ: 1,44 – 63,07; $p = 0,01$). Соответственно, в генотипах пациентов второй группы (предполагаемые гетерозиготные носители гибридного гена *SMN2/SMN1*) в сравнении с первой достоверно чаще встречается 3 и более копии *SMN2*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что протяжная делеция, которая захватывает соседний с *SMN1* ген *NAIP*, может захватывать и центромерные гены, среди которых ген *SMN2*. Другие типы теломерных делеций намного реже сопровождаются делециями *SMN2*, предположительно, в следствие того, что вероятность 2-х независимых реорганизаций (в теломерной и центромерной копии локуса 5q13) ниже вероятности образования 1 протяженной делеции, захватывающей как теломерную, так и центромерную копию региона. В поддержку гипотезы о том, что образование гибридного гена *SMN2/SMN1* ассоциировано с увеличением копийности *SMN2*, свидетельствуют данные популяционных исследований: частота генотипов с 3 и более копиями *SMN2* достоверно чаще встречается у пациентов со СМА и членов их семей, чем в популяционных выборках [25, 26]. Данные о наличии молекулярно-генетических механизмов, приводящих к образованию комплексных реорганизаций, получены и в исследованиях других авторов [27, 28].

Несмотря на то, что копийность гена *SMN2* значимо влияет на фенотип СМА, выявленная корреляция не поясняет всех модификаций заболевания в исследуемой выборке пациентов. Из этого следует, что поиск генов-модификаторов СМА не закончен. При анализе клинической базы выборки пациентов со СМА было отмечено, что достоверно чаще ($p = 0,02$) самый тяжелый клинический тип

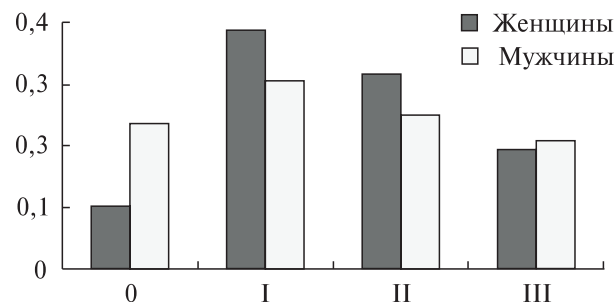


Рис. 2. Распределение частот (по вертикали) фенотипов СМА (по горизонтали) у мужчин и женщин ($n = 170$)

СМА 0 встречается у мальчиков. Для остальных типов СМА статистически значимых отличий между частотой мальчиков и девочек выявлено не было (рис. 2).

Отметим, что распределения частот генотипов по теломерным делециям и копиям гена *SMN2* у мальчиков и девочек в нашей выборке пациентов достоверно не отличаются ($p = 0,113$ и $p = 0,534$, соответственно).

Поскольку гендерные различия выявлены только для врожденного типа СМА, который характеризуется дебютом еще в перинатальном периоде, полученные данные могут указывать на наличие у женщин со СМА специфических нейротекторных механизмов в раннем периоде развития, а также снижение роли этих факторов в постнатальный период. Учитывая гемизиготное состояние аллелей генов X-хромосомы у мужчин, а также наличие эпигенетической регуляции экспрессии таких генов у женщин (особенно в пренатальный период), можно предположить, что генами-модификаторами СМА могут, помимо прочего, быть гены X-хромосомы. Поэтому, дальнейшее исследование X-сцепленных модификаторов СМА кажется нам перспективным.

Выводы. Достоверно чаще гомозиготный генотип с протяженной делецией, которая захватывает кроме 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1* еще и 5-й экзон гена *NAIP*, наблюдается у пациентов с 0 и Ib типами СМА в отличие от пациентов менее тяжелыми типами заболевания, у которых чаще встречается генотип с гомозиготной делецией только 7-го или 7-го и 8-го экзонов гена *SMN1* (OR = 5,39). Установлено, что количество копий *SMN2* корре-

лирует с типом СМА: чем больше копий, тем легче фенотип СМА. Количество копий *SMN2* сильнее влияет на фенотип СМА ($r = 0,50$; $p = 4,35 \times 10^{-12}$), чем протяженность теломерной делеции ($r = -0,30$; $p = 8,00 \times 10^{-5}$). У СМА-пациентов с гомозиготной делецией, в которую вовлечен ген *NAIP*, достоверно чаще, чем у носителей гомозиготной делеции только 7-го экзона *SMN1*, наблюдается 1 копия *SMN2* (OR = 7,7; ДИ: 1,44–63,07; $p = 0,01$). Вероятно, протяжная теломерная делеция может охватывать и центромерные гены, в том числе ген *SMN2*, и быть фактором риска наиболее тяжелого типа СМА. Врожденный тип СМА 0 достоверно чаще ($p = 0,02$) встречается у мальчиков. Это может указывать на наличие генов-модификаторов СМА на X-хромосоме.

*Авторы выражают глубокую признательность Харьковскому благотворительному фонду «Дети со спинальной мышечной атрофией», возглавляемому Матюшенко В.Н. за многолетнее всестороннее содействие в исследованиях данного заболевания и популяризации знаний о СМА среди населения Украины. Также авторы благодарны врачам медико-генетических центров Украины за сбор и анализ клинических данных пациентов. Авторы признательны сотрудникам отдела геномики человека ИМБГ НАН Украины, в первую очередь Экишияну А.Ю., Лившиц А.Б., Соловьеву А.А., Подлесной С.С., которые в период 1995–2016 гг. принимали активное участие в формировании коллекции образцов ДНК пациентов со СМА и в генотипировании пациентов по *SMN1* и *NAIP*.*

Соответствие этическим стандартам. Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием людей, соответствовали международным и национальным стандартам, Хельсинкской декларации 1964 г. и ее более поздним поправкам, одобрены Комиссией по биоэтике ИМБГ НАН Украины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках бюджетных тематик ИМБГ НАН Украины 2011–2015 гг. (шифр темы 2.2.4.13, № гос. регистрации 0105U005341) и 2016–2020 гг. (шифр темы 2.2.4.13, № гос. регистрации 0115U003747).

GENETIC MODIFIERS OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY PHENOTYPE

*N.V. Hryshchenko, H.S. Karaman,
A.A. Yurchenko, L.A. Livshits*

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
03680, Kiev, ul. akademika Zabolotnogo, 150, Ukraine
Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine» of Taras Shevchenko National University of Kiev,
03022, Kiev, avenue academician Glushkov 2, Ukraine
E-mail: dnatetest@imb.org.ua.

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease caused by a homozygous deletion in *SMN1* gene exon 7. The aim of the work is to analyze an association of the allelic polymorphism of the telomeric genes *SMN1*, *NAIP* and the centromeric gene *SMN2* of 5q13 region with the clinical phenotype of SMA. It has been shown that the homozygous genotype, which contains a telomeric deletion, covering both *SMN1* and *NAIP*, is significantly more often observed in patients with the most severe type of SMA. Three or more copies of *SMN2* are associated with a milder phenotype; the number of *SMN2* copies affects the SMA phenotype more heavily than the length of the telomeric deletion. It has been shown that in SMA-patients with a homozygous deletion of *SMN1* and *NAIP* one copy of *SMN2* is significantly more frequent than three or more copies of this gene. This fact may indicate a presence of a large deletion of all studied genes in SMA genotypes associated with the most severe type of SMA. It is noted that congenital SMA (type 0) is significantly less common in female patients, which may indicate the presence of SMA modifier genes on X-chromosome.

ГЕНЕТИЧНІ МОДИФІКАТОРИ ФЕНОТИПУ СПІНАЛЬНОЇ М'ЯЗОВОЇ АТРОФІЇ

*Н.В. Грищенко, Г.С. Караман,
А.А. Юрченко, Л.А. Лівшиць*

Проксимальна спінальна м'язова атрофія (СМА) – аутосомно-рецесивне нейродегенеративне захворювання, обумовлене гомозиготною делецією 7-го екзона гена *SMN1*. Мета роботи: аналіз асоціації алельного поліморфізму теломерних генів *SMN1*, *NAIP* і центромерного гена *SMN2* ділянки 5q13 з клінічним фенотипом СМА. Показано, що гомозиготний генотип з теломерною делецією, в якій залучено не тільки ген *SMN1*, але й ген *NAIP*, достовірно частіше спостерігається у пацієнтів з найважчим типом СМА. Три і більше копії *SMN2* асоційовані з легшим фенотипом, кількість копій

SMN2 набагато сильніше впливає на фенотип СМА, ніж протяжність теломерної делеції. Встановлено, що у СМА-пацієнтів з гомозиготною делецією *SMN1* і *NAIP* достовірно частіше виявляють 1 копію *SMN2*. Це може свідчити про наявність великої делеції, яка охоплює всі три досліджуваних гена і асоційована з важким типом СМА. Відзначено, що вроджена СМА (0 тип) достовірно рідше зустрічається у дівчат, що може вказувати на наявність генів модифікаторів СМА на Х-хромосомі.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ogino, S., Wilson, R., Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics, *Expert. Rev.*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 15–29. doi: 10.1586/14737159.4.1.15.
- Mesfin, A., Sponseller, P.D., and Leet, A.I., Spinal muscular atrophy: manifestations and management, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2012, vol. 20, no. 6, pp. 393–401. doi: 10.5435/JAAOS-20-06-393.
- Grotto S., Cuisset J.M., Marret S., Drunat, S., Faure, P., Audebert-Bellanger, S., Desguerre, I., Flurin, V., Grebille, A.G., Guerrot, A.M., Journel, H., Morin, G., Plessis, G., Renolleau, S., Roume, J., Simon-Bouy, B., Touraine, R., Willems, M., Frébourg, T., Verspyck, E., and Saugier-Verber, P., Type 0 Spinal Muscular Atrophy: Further Delineation of Prenatal and Postnatal Features in 16 Patients, *J. Neuromuscul. Dis.*, 2016, vol. 3, no. 4, pp. 487–95. doi: 10.3233/JND-160177.
- Butchbach, M.E., Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases, *Front. Mol. Biosci.*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 7. doi: 10.3389/fmolb.2016.00007.
- Jedrzejowska, M., Milewski, M., and Zimowski, J., 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, vol. 56, no. 1, pp. 103–11.
- Groen, E.J.N., Perenthaler, E., Courtney N.L., Jordan, C.Y., Shorrock, H.K., van der Hoorn, D., Huang, Y.-T., Murray, L.M., Viero, G., and Gillingwater, T.H., Temporal and tissue-specific variability of SMN protein levels in mouse models of spinal muscular atrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 2018, vol. 27, no. 16, pp. 2851–62. doi: 10.1093/hmg/ddy195.
- Alrafiah, A., Alghanmi, M., Almashhadi, S., Aqeel, A., and Awaji, A., The expression of *SMN1*, *MART3*, *GLE1* and *FUS* genes in spinal muscular atrophy, *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2018, vol. 56, no. 4, pp. 215–21. doi: 10.5603/FHC.a2018.0022.
- Aquilina, B., Cauchi, R.J., Genetic screen identifies a requirement for SMN in mRNA localisation within the *Drosophila* oocyte, *BMC Res. Notes*, 2018, vol. 11, no. 1, pp. 378. doi: 10.1186/s13104-018-3496-1.
- Beattie, C.E., Kolb, S.J., Spinal muscular atrophy: Selective motor neuron loss and global defect in the assembly of ribonucleoproteins, *Brain. Res.*, 2018, vol. 1693(Pt A), pp. 92–7. doi: 10.1016/j.brainres.2018.02.022.
- Mattis, V.B., Butchbach, M.E., and Lorson, C.L., Detection of human survival motor neuron (SMN) protein in mice containing the *SMN2* transgene: applicability to preclinical therapy development for spinal muscular atrophy, *J. Neurosci Methods*, 2008, vol. 175, no. 1, pp. 36–43. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.07.024.
- Butchbach, M.E., Rose, F.F. Jr, Rhoades S., Marston, J., McCrone, J.T., Sinnott, R., and Lorson, C.L., Effect of diet on the survival and phenotype of a mouse model for spinal muscular atrophy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, vol. 391, no. 1, pp. 835–40. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.148.
- Rouault, F., Christie-Brown, V., and Broekgaarden, R., Disease impact on general well-being and therapeutic expectations of European Type II and Type III spinal muscular atrophy patients, *Neuromuscul. Disord.*, 2017, vol. 27, no. 5, pp. 428–38. doi: 10.1016/j.nmd.2017.01.018.
- Gidaro, T., Servais, L., Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps, *Dev. Med. Child. Neurol.*, 2019 vol. 61, no. 1, pp. 19–24. doi: 10.1111/dmcn.14027.
- Maniatis, T., Fritsch, E.E., and Sambrook, J., Molecular Cloning, a laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 2012, 2028 p.
- Stabley, D.L., Harris, A.W., Holbrook, J., Chubbs, N.J., Lozo, K.W., Crawford, T.O., Swoboda, K.J., Funanage, V.L., Wang, W., Mackenzie, W., Scavina, M., Sol-Church, K., and Matthew, E.R. Butchbach *SMN1* and *SMN2* copy numbers in cell lines derived from patients with spinal muscular atrophy as measured by array digital PCR, *Mol. Genet. Genom. Med.*, 2015, vol. 3, no. 4, pp. 248–57. doi: 10.1002/mgg3.141.
- Feldkötter M., Schwarzer V., Wirth R., Wienker, T.F., and 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, vol. 70, pp. 358–68. doi: 10.1086/338627.
- Anhuf, D., Eggermann, T., Rudnik-Shubneborn, S., and Zerres, K., Determination of *SMN1* and *SMN2* copy number using TaqMan technology, *Hum. Mutat.*, 2003, vol. 22, pp. 74–8. doi: 10.1002/humu.10221.

18. Soloviov, O.O., Livshits, G.B., Podlesnaya, S.S., and Livshits, L.A., Implementation of the quantitative Real-Time PCR for the molecular-genetic diagnostics of spinal muscular atrophy, *Biopolym. Cell*, 2010, vol. 26, no. 1, pp. 51–5. doi: 10.7124/bc.000144.
19. Solov'ev, A.A., Grishchenko, N.V., and Livshits, L.A., Spinal muscular atrophy carrier frequency in Ukraine, *Genetika*, 2013, vol. 49, no. 9, pp. 1126–33. doi: 10.1134/S1022795413080140.
20. Boratyn, G.M., Camacho, C., and Cooper, P.S., BLAST: a more efficient report with usability improvements, *Nucleic. Acids Res.*, 2013, vol. 41, W29–W33. doi: 10.1093/nar/gkt282.
21. Wangkumhang, P., Chaichoompu, K., WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations, *BMC Genomics*, 2007, vol. 14, no. 8, pp. 275. doi: 10.1186/1471-2164-8-275.
22. Casper, J., Zweig, A.S., The UCSC Genome Browser database: 2018 update, *Nucleic. Acids Res.*, 2018, 46 (Database issue): D762–D769. doi: 10.1093/nar/gkx1020.
23. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2 CT Method, *Methods*, 2001, vol. 25, pp. 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
24. Cusco, I., Barcelo, M., Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases, *Human Genetics*, 2001, vol. 108, pp. 222–9. doi: 10.1007/s004390000452.
25. Ping, F., Liang, L., Molecular characterization and copy number of *SMN1*, *SMN2* and *NAIP* in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2015, vol. 16, pp. 11–5. doi: 10.1186/s12891-015-0457-x.
26. Crawford, T.O., Paushkin, S.V., and Kobayashi, D.T., Evaluation of SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study, *PLoS One.*, 2012, vol. 7, no. 4, e33572. doi: 10.1371/journal.pone.0033572.
27. Ogino, S., Gao, S., Leonard, D.G., Paessler, M., and Wilson, R.B., Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2003, vol.11, no. 3, pp. 275–81. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200957.
28. Chen, T.H, Tzeng C.C., 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, vol. 308, no. 1–2, pp. 83–89. doi: 10.1016/j.jns.2011.06.002.

Поступила в редакцію 02.07.19
Після доработки 09.10.19
Принята к публікації 18.03.20