

A SPINALIS IZOMATROPHIÁT MEGHATÁROZÓ SURVIVAL MOTONEURON GÉNEK KVANTITATÍV ANALÍZISE

NAGYMIHÁLY Mariann¹, HERCZEGFALVI Ágnes², TÍMÁR László³, KARCAGI Veronika¹

¹Országos Környezet-egészségügyi Intézet, Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály, Budapest

²Magyar Református Egyház Bethesda Gyermekkorháza, Neurológiai Osztály, Budapest

³Országos Gyermek-egészségügyi Intézet, Genetikai Tanácsadás, Budapest

QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE GENES DETERMINING SPINAL MUSCULAR ATROPHY

Nagy Mihály M, MD; Herczegfalvi Á, MD, PhD;

Tímár L, MD; Karcagi V, PhD

Ideggyogy Sz 2009;62(7–8):390–397.

A spinalis izomatrophia (SMA) az egyik leggyakoribb autoszomális recesszíven öröklődő betegség, előfordulási gyakorisága 1/10 000, míg hordozósági frekvenciája közel 1/35. A betegséget a survival of motoneuron (SMN) ubiquiter fehérje hiánya okozza, amelyet a homológ SMN1 és SMN2 gének kódolnak. A 7. exon egyetlen nukleotid polimorfizmusa miatt az SMN2 génről kevesebb teljes hosszúságú transzkriptum termelődik, amely nem képes megakadályozni a motoneuronok pusztulását a fiziológiásan előforduló géndózisban. Az SMN2 gén kópiaszáma ugyanakkor befolyásolja a termelődő SMN fehérje mennyiségét és így módon a fenotípus súlyosságát. Az SMN géndózis-analízissel meghatározható az SMN1 gén kópiaszáma és ezáltal azonosíthatóak a hordozók, valamint a heterozigóta deletiót hordozó betegek. Beszámolunk az SMN1 gén kópiaszámának real-time PCR-technikán alapuló meghatározásáról 56 SMA I., II. és III. típusú beteg, 159 szülő és egészséges családtag, valamint 152 bizonytalan diagnózisú SMA-beteg esetében. A családtagok közül 91 esetben azonosítottuk a hordozói állapotot és 56 beteg esetében megerősítettük az SMN1 7. exon homozigóta deletióját. Külön kiemelendő, hogy 12 beteg esetében összetett heterozigóta állapotot detektáltunk, amely valószínűsíthető, hogy spinalis izomatrophiában szenvednek. Az SMN2-kópiaszám meghatározását 94 beteg esetében végeztük el, és szoros összefüggést kaptunk a kópiaszám és a betegség fenotípusa között. A betegség genetikai komplexitása és a hordozóság nagy aránya miatt pontos kockázatbecslésre és genetikai tanácsadásra van szükség az érintett családok esetében. Ezek az új eredmények korszerűsítik az SMA hazai diagnosztikai munkáját, különös tekintettel a pontos genetikai tanácsadásra, valamint segíti a betegek bevonását a jövőbeli terápiás vizsgálatokba.

Kulcsszavak: spinalis izomatrophia, real-time PCR, SMN1 és SMN2 gének kópiaszám-meghatározása

Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the most common autosomal recessive diseases, affecting approximately one in 10.000 live births and with a carrier frequency of approximately one in 35. The disease is caused by a deficiency of the ubiquitous protein survival of motor neuron (SMN), which is encoded by the SMN1 and SMN2 genes. Due to a single nucleotide polymorphism in exon 7, SMN2 produces less full-length transcript than SMN1 and cannot prevent neuronal cell death at physiologic gene dosages. On the other hand, the copy number of SMN2 affects the amount of SMN protein produced and the severity of the SMA phenotype. SMN gene dosage analysis can determine the copy number of SMN1 to detect carriers and patients heterozygous for the absence of SMN1 exon 7. This study provides copy number estimation of SMN1 gene by real-time PCR technique in 56 SMA type I., II., III. patients, 159 parents and healthy relatives and in 152 undefined SMA patients. Among the family members, 91 carriers have been detected and in 56 patients homozygous deletion of SMN1 exon 7 has been confirmed. Moreover, in 12 patients compound heterozygosity of SMN1 exon 7 mutation has been detected, thus providing the possible diagnosis of SMA. In 94 patients, copy number of SMN2 has also been evaluated and a good correlation has been found with the phenotype of the disease. Due to the genetic complexity and the high carrier frequency, accurate risk assessment and genetic counselling are particularly important for the families. These new results provide improvement of the diagnostic service in SMA in Hungary with focus on proper genetic counselling and possible enrolment of the patients in future therapeutic interventions.

Keywords: spinal muscular atrophy, real-time PCR, copy number analysis of SMN1 and SMN2 genes

Levelező szerző (correspondence): Dr. KARCAGI Veronika, Országos Környezet-egészségügyi Intézet, Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály, 1097 Budapest, Gyáli u. 2–6. Telefon: (1) 476-1362, fax: (1) 215-2046. E-mail: karcagi.veronika@oki.antsz.hu

Érkezett: 2008. szeptember 15. Elfogadva: 2009. március 26.

www.elitmed.hu

A spinalis izomatropia (SMA) a második leggyakoribb, autoszomális recesszív módon öröklődő betegség. Kialakulását a gerincvelői α -motoronok degenerációja okozza, amelynek következménye a fokozatosan súlyosbodó izomsorvadás, majd az esetek többségében az izomzat teljes bénulása. A halál oka légzési elégtelenség, illetve ebből eredően, a visszatérő légzőszervi fertőzések következtében kialakuló tüdőgyulladás. Az izomgyengeség szimmetrikus, kezdetben a végtagok, majd a törzsizomzat bénulása következik be. A bénulás tisztán motoros jellegű, az intellektus ép. A betegség hordozósági gyakorisága 1:35¹⁻⁴, így átlagosan mintegy 10 000 gyermekből egy születik SMA betegséggel.

A spinalis izomatropia különböző fenotípusos megjelenésű formáit négy csoportra lehet osztani (I.–IV. típus), a klinikai tünetek megjelenésének időpontja és súlyossága, a maximális motoros teljesítmény és az élettartam alapján⁵⁻¹¹ (**1. táblázat**).

A betegség legsúlyosabb, fatális formája az SMA I. típusa, a *Werdnig–Hoffmann-kór* (OMIM 253300). A tünetek általában már az első hónapokban, de hat hónapos kor előtt biztosan jelentkeznek, a beteg nem képes önállóan felülni és két éves kora előtt életét veszti.

Az SMA II. típusa vagy intermedier formája, a *Fried–Emery-kór* (OMIM 253550) valamivel később, másfél éves kor előtt kezdődik és enyhébb lefolyású. A gyermekek megtanulnak segítség nélkül ülni, de nem képesek önállóan állni és járni. A halál általában 10–12 évesen következik be.

Az SMA III. típusa a *Kugelberg–Welander-kór* (OMIM 253400). A tünetek mindig másfél éves kor után, általában hároméves kor körül kezdenek kialakulni. Nem halálos kimenetelű, de a betegek ifjú koruktól kezdve kerekesszékhöz kötöttek.

Újabbán megkülönböztetik az SMA IV. típust is, amely az SMA felnőttkori formája, enyhe izomgyengeséggel. A tünetek 30 éves kor után jelentkeznek.

Az SMA-betegek körülbelül 60%-a az I. típusba, míg a fennmaradó 40% a II., illetve a III.–IV. típusba sorolható.

Az SMA mind a négy formája az 5q13 kromoszómaregióhoz köthető. A betegséget az esetek

RÖVIDÍTÉSEK

AgICA (C272) = mikroszatellita marker.
 C212 = mikroszatellita marker.
 Ct = (threshold cycle/crossing point) küszöbciklus.
 DNS = dezoxiribonukleinsav.
 EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav.
 PCR = polimeráz láncreakció.
 RCN = relatív kópiaszám.
 RFLP = restriction fragment length polymorphism.
 RNP = ribonukleoprotein.
 SMA = (spinal muscular atrophy) spinalis izomatropia.
 SMN1 = (survival of motor neuron) gén telomer kópiája.
 SMN2 = (survival of motor neuron) gén centromer kópiája.
 snRNP = (small nuclear ribonucleoprotein) kis sejtmagi ribonukleoprotein.
 SYBRGreen I = a DNS két szála közé interkalálódó fluoreszcens festék.
 UsnRNP = (uridine rich small nuclear ribonucleoprotein) uridingazdag kis sejtmagi ribonukleoprotein

94%-ában a survival of motoneuron 1 (SMN1; OMIM 600354) gén homozigóta deletiója okozza¹². A betegek további 4%-a compound heterozigótának (az egyik allélon deletio, míg a másikon intragenikus pontmutáció) bizonyult, míg a fennmaradó 2%-ban nem volt kimutatható mutáció az SMN1 génben¹³. A mutáció következtében az SMN génről átíródó protein nem képes betölteni a gerincvelői motoneuronok működéséhez alapvetően szükséges szerepét, amely a vázizomzat fokozatos soradásához, majd a súlyosabb esetekben légzési elégtelenség következtében halálhoz vezet.

Az SMN1 és centromerikus homológja, az SMN2 gén az 5q13 kromoszómaregióban helyezkedik el. Az SMN gén kilenc exonból áll (1, 2a, 2b és 3–8). A két SMN-génkópia szekvenciája öt nukleotidban tér el (három intronikusan és kettő exonikusan, a 7. és 8. exonban). Mindkét génről 1,7 kb-os transzkript keletkezik, amelyekből az alternatív splicing során különböző izoformák (splicing-variánsok) jönnek létre. Az SMN2 gén 7. exonjában a 840C>T tranzíció következtében a 7. exon kivágó-

1. táblázat. Az SMA betegség csoportosítása a nemzetközi SMA-konzorcium ajánlása által

Típus	Betegség neve	Kezdet (hónap)	Motoros teljesítmény	Halál (év)
I.	Werdnig–Hoffmann-kór	<6	nem ül fel segítség nélkül	<2
II.	Fried–Emery-kór	<18	nem jár segítség nélkül	>2
III.	Kugelberg–Welander-kór	>18	feláll, megy	felnőttkorban
IV.	felnőttkori forma	>30	feláll, megy	normális élettartam

dik a splicing során, így nem képződik teljes méretű transzkript; ezáltal a róla átíródó fehérje instabil és nem tudja betölteni funkcióját. Az SMN2 gén esetében így csak 10-20%-ban termelődik teljes méretű SMN-transzkript, a fennmaradó 80-90%-nál a 7. vagy a 8. exon, illetve mindkettő hiányzik. Az érett SMN fehérje 294 aminosavból áll és 38 kDa súlyú. Egészségesekben az SMN fehérjék jelentős része tehát az SMN1 génről származik, míg az SMN2 génről jelentősen kevesebb mennyiségű működő fehérje termelődik. Az SMN1 géntermék elengedhetetlenül fontos a motoneuronok normális működéséhez, ezzel szemben az egészséges egyének 5-10%-ában az SMN2 gén mindkét kópiája hiányzik^{14, 15}. Ennek értelmében a betegséget az SMN fehérje hiánya, illetve csökkent mennyisége okozza. Az SMA-betegek genetikai analízise és az SMN-homológok különbségei alátámasztják az SMN1 gén 7. exonjának jelentős szerepét a betegség kialakításában. Az SMN2 gén a három, illetve négy súlyossági forma közti fenotípusbeli eltérések kialakításáért felelős. Minél nagyobb az SMN2 gén kópiaszáma (1-4), annál enyhébb lefolyású a betegség, mivel a részlegesen funkcionáló, ugyanakkor több génkópia révén nagyobb mennyiségben termelődött SMN fehérje részlegesen kompenzálni képes az SMN1 gén által termelt „valódi” fehérje hiányát¹⁶⁻¹⁹.

Az SMN fehérje fontos szerepet játszik a ribonukleoproteinek (RNP) összeszerelésében, nukleocitoplazmikus, dendritikus, axonális transzportjukban. A gerincvelői motoneuronok dendritjeiben és axonjaiban cytoskeletális fehérjékkel együtt található. Az SMN fehérje a neuritek mozgékony granulumaiban lokalizálódik, aktívan transzportálódik neuronális folyamatokhoz és motoneuron-specifikus funkciót lát el²⁰. Az SMN fehérje megvédi a neuronokat a vírus által indukált apoptózistól, és kulcsszerepet játszik az RNS-metabolizmusban, komplexet képezve a spliceozomális kis sejtmagi ribonukleo-proteinekkal (snRNP)²¹. A 38 kDa tömegű SMN fehérje minden szöveti sejt citoplazmájában és a sejtmagjában megtalálható. A fehérje expressziója szövetenként változó, legnagyobb az agyban, a gerincvelőben és az izomban, legkisebb a lymphocytákban és a fibroblastokban.

Célkitűzések

Mivel a betegség hordozóságának gyakorisága a populációban igen nagy (1/35), a megelőzés szempontjából indokolt a spinális izomatropiában szenvedő betegek családtagjai esetében a hordozóság szűrése, amely nemcsak a család érdeke, hanem társadalmi érdek is, hiszen az SMA-betegség jelenleg nem gyógyítható. Ez a vizsgálat olyan pároknak

nyújt segítséget, ahol az egyik fél, illetve mindkét fél rokona SMA-betegségben szenvedett. Az igazoltan hordozók esetében megtörténhet az SMA-mutáció szempontjából negatív előtörténetű házastárs genetikai vizsgálata is. Mindezek fontos szerepet játszanak a betegség ismétlődési kockázatának csökkentésében.

A jelenleg alkalmazott direkt mutációanalízissel, amely PCR-RFLP technikán alapszik, az SMN1 gén 7. és 8. exonjának jelenléte vagy hiánya mutatatható ki. Belső kontrollként az SMN2 pszeudogén jelenlétét vizsgáljuk. Ha a beteg DNS-mintájában homozigóta formában hiányzik az SMN1 gén 7. (és 8.) exonja, akkor igazolt az SMA-betegség molekuláris diagnóza. Ez a módszer azonban nem ad lehetőséget a hordozók, illetve a compound (összetett) heterozigóták kimutatására, hiszen a heterozigóta állapot rejtve marad.

A laboratórium számos olyan DNS-mintával rendelkezik, amelyek jelenlétében a klinikai diagnózis egyértelműen spinális izomatropiára utal, azonban a rendelkezésre álló géndiagnosztikai módszerekkel ez nem támasztható alá. Irodalmi adatok alapján a betegek mintegy 4%-ában pontmutációk találhatóak az SMN1 génben (az egyik szülői allélon), azonban ezek mindig a gyakori exondeletiókkal (másik allélon) együtt fordulnak elő. A real-time PCR-módszerrel lehetőség van a compound (összetett) heterozigóta betegek azonosítására. A pontos genetikai diagnózis alátámasztásához szükség van a régió szekvenálására is, amelyet nemzetközi kooperációban valósítunk meg.

A betegség súlyosságát befolyásolja, hogy az adott egyén hány darab SMN2 génkópiát hordoz, így a különböző súlyossági csoportba tartozó betegek SMN2 kópiaszámának statisztikai analízisével alátámasztható az SMN2 gén fenotípus-módosító hatása. A fenotípus és genotípus közti korreláció ismerete nemcsak a genetikai tanácsadáshoz, hanem a kifejlesztés alatt álló terápiás eljárások későbbi klinikai kipróbálásához is fontos információ.

Munkánk során kvantitatív real-time PCR-módszerrel (Light Cycler, Roche Magyarország Kft.) vizsgáltuk mind a három kérdésfelvetést. A módszer az SMN1 és SMN2 gén kópiaszámának pontos meghatározásán alapul.

Betegek és módszerek

BETEGEK

Az SMA-betegek elsősorban a Magyar Református Egyház Bethesda Gyermekkorháza Neurológiai Osztályáról, az Országos Gyermek-egészségügyi Intézet genetikai tanácsadásáról, illetve az ország

valamennyi kórházának neurológiai osztályairól és genetikai tanácsadásairól érkeztek. A betegek a nemzetközi SMA-konzorcium kritériumainak megfeleltek, és klinikailag a felsorolt kritériumok alapján sorolták be őket a különböző fenotípuscsoportokba. A humángenetikai törvénynek megfelelően (2008. évi XXI. törvény A humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól) a betegek beleegyező nyilatkozat kitöltésével hozzájárultak a genetikai vizsgálat elvégzéséhez.

DNS-MINTÁK

A DNS-izolálás EDTA-val alvadást gátolt vérből történt, standard protokoll szerint²². A DNS-koncentráció mérését NanoDrop2000 spektrofotométerrel (Bio-Science Laborműszer Kft.) végeztük. A PCR-analízis során csak azokat a mintákat használtuk, amelyek tisztasága, azaz a 260/280 nm-en mért optikai denzitás (OD 260/280 nm) értéke 1,75–1,95 között, illetve az OD 260/230 nm értéke >2,00 volt. A DNS-minták végkoncentrációja 10 ng/μl.

KVANTITATÍV REAL-TIME PCR

A PCR során az SMN1 és SMN2 géneket, illetve belső kontrollként a humán szérumalbumin génjét amplifikáltuk ugyanazon DNS-mintában, de külön kapillárisban Roche LightCycler 2.0 real-time PCR-készülékkel (**1. ábra**). Az SMN1 gén amplifikációja során alkalmazott külső standard minta olyan egészséges egyéntől származott, aki két kópiában hordozza az SMN1 gént, de az SMN2 gént nézve homozigóta deletiós (ezzel kizárható az SMN2 gén amplifikációja, így az esetleges keresztreakció). Az SMN2 gén analízise során pedig külső standardként olyan SMA-beteg DNS-mintáját használtuk, aki a haplotípus-analízis (Ag1CA, C212 mikroszatellita markerek) alapján kétkópiásnak bizonyult a SMN2 gént nézve.

A kvantitatív real-time PCR-analízis során olyan primereket alkalmaztunk, amelyek specifikusan amplifikálják az SMN1 és SMN2 géneket. Az SMN1 és SMN2 gének kópiák elkülönítése olyan forward és reverz primerekkel történik, amelyek az SMN1 és az SMN2 gének kópiák báziskülönbségeinél kötődnek. Az SMN1 gén amplifikációja során alkalmazott forward primer: *SMN1ex7forw* 5'-TTTATTTTCCTTACAGGGTTTC-3' és reverz primer: *SMN1int7rev* 5'-GTGAAAGTATGTTTCTTCCACGTA-3'. Az SMN2 gén amplifikációja során alkalmazott forward primer: *SMN2ex7forw* 5'-TTTATTTTCCTTACAGGGTTT-3' és reverz primer: *SMN2int7rev* 5'-GTGAAAGTATGTTTCTTCCAC-

GAC-3'. A belső kontrollként használt humán szérumalbumin gén amplifikációja során alkalmazott forward primer: *ALBex12forw* 5'-AGCTATCCGTGGTCCTGAAC-3' és reverz primer: *ALBex12rev* 5'-TTCTCAGAAAGTGTGCATATATCTG-3'. A primerek specifikusságát multiplex PCR-rel, illetve hibridizációs próbák alkalmazásával ellenőrizték^{3,23}. Fluoreszcens jelölőként SYBRGreen I festéket használtunk. A PCR-reakció végtérfogata 10 μl volt kapillárisonként, amelyek egyenként 1 μl FastStart DNA SybrGreen I PCR Master Mixet (Roche Diagnostics), 4 mM MgCl₂-ot, 10 pmol primert és 15 ng genomikus DNS-t tartalmaztak. A PCR-körülmények: 95 °C 10', amelyet 35 ciklus 95 °C 10'', 58 °C 5'', 72 °C 25'' követett. A kvantifikációs programot az olvadási görbe-analízis követte: 15'' denaturáció 95 °C-on, 30'' annealing 55 °C-on, az olvadási hőmérséklet 85 °C-ig 0,1 °C/s-onként növekedett.

AZ ADATOK ÉRTÉKELÉSE

Az SMN1 és SMN2 gének kópiaszámát az összehasonlító threshold cycle (Ct) módszerrel mért értékek alapján határoztuk meg:

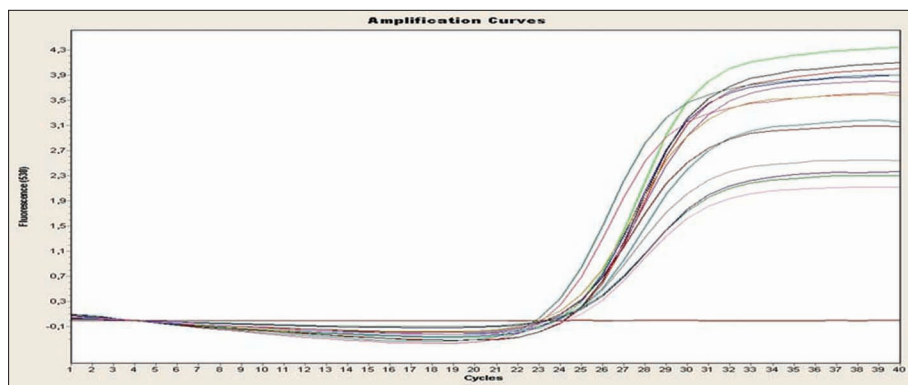
$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{albumin}(standard) - \Delta Ct_{smn1}(standard)] - [\Delta Ct_{albumin}(ismeretlen) - \Delta Ct_{smn1}(ismeretlen)].$$

A relatív kópiaszám (RCN): $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ez alapján a várt RCN-érték két SMN-génkópiát hordozó egyének esetében 1, egy gének kópiát hordozóknál 0,5, míg az SMN1, illetve az SMN2 génekre nézve homozigóta deletiós hordozók esetében az RCN=0. A mért eredmények alapján az egy SMN-génkópiát hordozók esetében az RCN-érték 0,41–0,56, két gének kópiával rendelkezőknél 1,40–1,67, míg négy gének kópiával 1,90–2,19 tartományba esett. A módszer specifikussága 100%-os, míg szenzitivitása csak 95%, mivel az egészséges populáció mintegy 5%-ában egy kromoszómán két SMN1 gének kópiát fordul elő. Ilyen esetben az egyik allélon deletiós hordozó egyént egészséges, két kópiát SMN1 génnel rendelkezőnek detektálnánk. Olvadáspontméréssel ellenőrizhető a reakció specifikussága, azonosíthatóak a reakciótermékek, illetve a primer dimerek és egyéb melléktermékek (**2. ábra**).

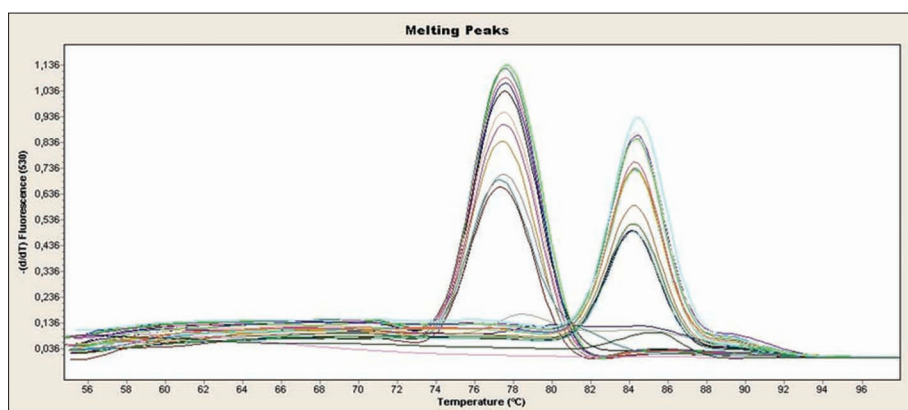
Eredmények

HORDOZÓSÁGSZÜRÉS

Százötvenkilenc esetben vizsgáltuk meg az SMN1 gén kópiaszámát a 7. exon jelenlétére SMA I., II. és III. típusú betegséggel érintett családok tünetmentes családtagjai esetében. A mérések alapján a gene-



1. ábra. SMN1 és albumingének amplifikációs görbéje real-time PCR-módszerrel



2. ábra. SMN1 és albumingének olvadáspontgörbéje

tikailag bizonyítottan SMA-betegségben szenvedő családok tünetmentes családtagjai közül 91 hordozót azonosítottunk; ők szülők, illetve a beteg vagy a szülők testvérei voltak. A szülők esetében a geneti-

kizárólag a homozigóta deletiók kimutatására alkalmas. Mivel ezek a betegek spinális izomatropia tüneteivel kerültek hozzánk genetikai vizsgálatra, az irodalomban leírt esetek alapján feltételezhető volt,

kai eredmények a várakozásnak megfelelőek, hiszen a de novo mutációk kialakulásának gyakorisága ebben a betegségben csak 2%²⁴. A testvérek esetében azonban a hordozói státust nem ismertük, ennek a priori valószínűsége 1/2, illetve 2/3 volt. A mutációt nem hordozó hozzátartozók közül 202, két SMN1 gének kópiát hordozó és hat, három SMN1 gének kópiát hordozó egyént azonosítottunk. Az SMA-betegség tüneteit mutató betegek közül 56 SMN1 homozigóta deletióval rendelkező egyén DNS-vizsgálatát végeztük el, megerősítve ezzel a hagyományos PCR-RFLP technikával kapott eredményeket. A vizsgálatok eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

COMPOUND HETEROZIGÓTA BETEGEK AZONOSÍTÁSA

A laboratórium számos olyan DNS-mintával rendelkezik, ahol a klinikai diagnózis SMA-betegségre utal, azonban az eddig rendelkezésre álló PCR-RFLP diagnosztikai módszerrel ezt nem lehetett alátámasztani, hiszen a módszer

kizárólag a homozigóta deletiók kimutatására alkalmas. Mivel ezek a betegek spinális izomatropia tüneteivel kerültek hozzánk genetikai vizsgálatra, az irodalomban leírt esetek alapján feltételezhető volt,

2. táblázat. SMA-családok real-time PCR-vizsgálati eredményeinek összesítése

		0 SMN1	1 SMN1	2 SMN1	3 SMN1	Összes
SMA I. családok	szülők	–	33	–	–	33
	egészséges családtagok	–	28	31	–	59
	betegek	30	–	–	–	30
SMA II. családok	szülők	–	6	1	–	7
	egészséges családtagok	–	7	7	–	14
	betegek	13	–	–	–	13
SMA III. családok	szülők	–	7	–	–	7
	egészséges családtagok	–	4	14	1	19
	betegek	13	–	–	–	13
Bizonytalan családok	szülők	–	6	13	1	20
	betegek	–	12*	136	4	152
	$\Delta\Delta Ct$ -érték	0,00–0,00	0,41–0,56	0,80–1,09	1,43–1,49	367
	Mean \pm SD		0,45 \pm 0,005	0,92 \pm 0,01	1,45 \pm 0,01	

*Compound heterozigóták

hogy a másik 5q13 alléljukon lévő SMN1 génben patogén pontmutációt hordoznak, amennyiben a klinikai diagnózis helyes^{24, 25}. Ezt a feltételezést vizsgálva 152 bizonytalan diagnózisú beteg esetében végeztük el az SMN1 gén kópiaszám-meghatározását, és 12 esetben mutattuk ki a compound heterozigóta állapotot, azaz megállapítottuk, hogy egy kópiával rendelkeznek az SMN1 gén 7. exonjából. A vizsgálat akkor teljes körű, ha megtörténik a feltételezett pontmutáció azonosítása az SMN1 gén szekvenálásával, amely jelenleg folyamatban van. A többi beteg esetében el kellett vetni a spinalis izomatropia diagnózisát. A vizsgálatok eredményeit szintén a **2. táblázat** tartalmazza.

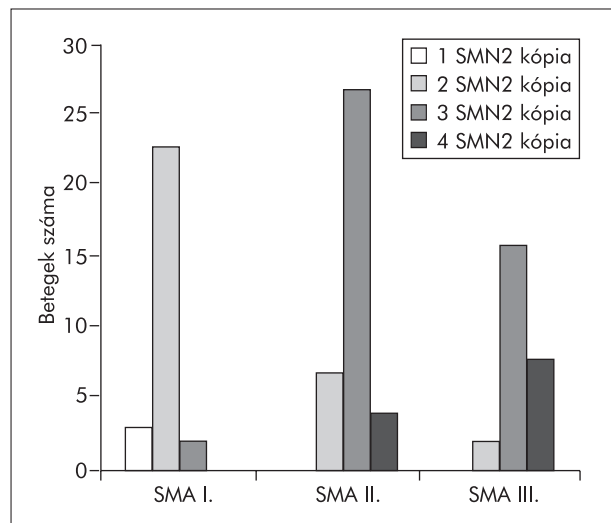
FENOTÍPUS-ELŐREJELZÉS AZ SMN2 GÉN KÓPIASZÁMA ALAPJÁN

Korábban már bizonyították különböző populációkban az SMN2-kópiaszám és a betegség súlyossága közötti fordított korrelációt^{13, 24}. Magyar betegeink esetében is meg kívántuk vizsgálni a témával foglalkozó tudományos cikkekben megjelent megállapítás érvényességét. Az SMN2 gén kópiaszám-meghatározását 94 SMA I., II. és III. típusú beteg esetében végeztük el. Analíziseink értelmében az SMA I. típusú betegek 82%-a két SMN2 génekópiát, az SMA II. típusú betegek 72%-a három, míg az SMA III. típusú betegek 92%-a három vagy négy SMN2 génekópiát hordoz. A kvantitatív analízis eredményeit a **3. ábra** mutatja be.

Az SMA-betegség tüneteivel diagnosztizált betegek közül nem találtunk olyanokat, akik az SMN2 gén 7. exonjára nézve homozigóta deletiót hordoztak volna, mivel ez a kombináció embrionálisan letális²⁶. A mérések alapján a genetikailag bizonyított SMA-betegségben szenvedő családok tünetmentes tagjai közül négy olyat azonosítottunk, akik homozigóta formában hordozták az SMN2 7. exon homozigóta deletióját; bizonyítva ezzel, hogy a centromerikus génekópiá deletiója nem jár együtt SMA fenotípussal^{14, 15}.

Megbeszélés

Az SMN1 génnek létezik homológ kópiája, az SMN2 (OMIM 601627) gén, amelynek szekvenciája csak öt bázispár eltérést mutat az SMN1 génhez képest^{14, 15}. A bázispár-különbségek közül kettő a 7. és a 8. exonban helyezkedik el, amely lehetővé teszi az SMN1 és SMN2 gének elkülönítését, és alapjául szolgál a jelenlegi, a betegség felderítésére alkalmazott géndiagnosztikai módszereknek. A két génről hasonló szerkezetű fehérjék (splicingva-



3. ábra. SMN2 gén kópiaszám-megoszlása a különböző súlyossági formák között

riások) expresszálódnak, csak különböző arányokban: az SMN1 génről 100%-ban normális méretű, működőképes fehérje termelődik, míg az SMN2 géntermékek csak 10%-a képes ellátni a funkcióját, a transzkriptek 90%-ából a splicing során kivágódik a 7. exon és ennek következtében csonkolt, működésképtelen fehérje keletkezik. Az SMN2 gén, az SMN1 génnel ellentétben, a betegek esetében soha nem sérült, egészséges egyének 5%-ában azonban hiányzik^{14, 15}. Az SMN2 gén a három, illetve újabban négy súlyossági forma közti fenotípusbeli eltérések kialakításáért felelős. Minél magasabb az SMN2 gén kópiaszáma (1–4), annál enyhébb lefolyású a betegség.

Munkánk során két közleményben megjelent, különböző real-time PCR-eljárást^{3, 23} alapul véve állítottuk be az SMN1 és SMN2 gének kópiaszám-meghatározását. A kvantitatív real-time PCR-tesztet olyan primerek alkalmazásával valósították meg, amelyek specifikusan amplifikálják az SMN1 és SMN2 gének kulcsfontosságú szerepet játszó 7. exonjait. Mivel az SMA hordozóssági gyakorisága a populációban más autoszomális recesszív betegségekhez képest nagy, a megelőzés szempontjából fontos a genetikai szűrővizsgálatok elvégzése az érintett családokban. Beállítottuk a relatív kvantifikációs módszert a hordozósság szűrésére az SMN1 gén kópiaszám-meghatározásával, így vállalhatjuk az SMA-betegség által érintett családok egészséges tagjainak a mutációszűrését. A pozitív esetekben a házastárs vizsgálatát is fel kell ajánlani, hiszen a populációban igen nagy a mutáció gyakorisága. Mindezeket megelőzően biztosítani kell a családtervezők számára, hiszen részükre – a mutáció hordozása esetén – prenatális vizsgálatot kell

felajánlani. Korábban ugyanis csak akkor tudtunk ilyen vizsgálatot végezni, ha már egy beteg gyermek megszületett.

Fontos eredményünk továbbá, hogy a genetikailag eddig nem azonosított SMA-betegek közül számos esetben (12) sikerült a compound (összetett) heterozigóta állapot detektálása, az újonnan bevezetett kvantitatív analízisek segítségével. A pontos genetikai diagnosztizálás, az intragenikus pontmutáció azonosítása a közeljövőben történik meg. Mivel a betegség hordozósági gyakorisága a populációban (1:35) nagy, ezért ritka esetekben más neuromuscularis betegségben szenvedő beteg is compound heterozigótának detektálható, így nélkülözhetetlen a teljes gén DNS-szekvenálásának elvégzése az intragenikus pontmutáció azonosítására. A bizonytalan diagnózisú SMA-betegek ilyen módon történt genetikai azonosítása igen fontos a genetikai tanácsadás szempontjából, amely segítséget nyújt a hordozó szülőknek az újabb gyermek vállalásában. A korábbi, nem kvantitatív módszerrel ezt a csoportot mint bizonytalan SMA-betegeket soroltuk be, és részükre nem volt lehetséges további genetikai tanácsadás. Figyelembe kell azonban venni, hogy mivel az emberek 5%-ában egy kromoszómán két SMN1-kópia is előfordulhat, ezért a kvantitatív real-time PCR-módszer szenzitivitása csak 95%-os³. Azokat a bizonytalan klinikai diagnózisú betegeket, akikről a kvantitatív PCR-analízis alapján kiderült, hogy két kópia SMN1 7. exonnal rendelkeznek – tehát nagy valószínűséggel nem SMA-betegeknek tekinthetők – klinikailag tovább kell vizsgálni a neuromuscularis betegség azonosítása érdekében.

Az SMN2 gén kópiaszámának meghatározására is vállalkoztunk; ennek révén viszonylagos fenotípus-előrejelzést is adhatunk a betegek esetében. A mérések alapján a genetikailag bizonyítottan SMA-betegségben szenvedő családok tünetmentes családtagjai közül négy, nulla SMN2-génkópiát hordozót azonosítottunk; bizonyítva ezzel, hogy a centromerikus génkópia deletiója nem jár SMA-fenotípussal^{14, 15}. Az eredmények alapján a magyar SMA-betegek esetében is igazolható, hogy az SMA I. típusú betegekhez képest az SMA II., illetve III. típusában az SMN2 gén nagyobb kópiaszáma figyelhető meg²⁷. Ennek magyarázata, hogy az SMN2 pszeudogénről 10-20% arányban termelődő teljes méretű, működőképes SMN fehérje a nagyobb kópiaszám miatt részlegesen kompenzálni képes a hi-

ányzó SMN1 gén transzkriptumát¹⁶⁻¹⁹. A korreláció az SMN2-kópiaszámok és a túlélési időtartamok között azonban nem teljesen lineáris, átfedő értékeket is tapasztaltak, ezért felvetődik, hogy a súlyosságot ez idáig ismeretlen faktorok, illetve más gének is befolyásolják. Ezért a módszer a fenotípus pontos előrejelzésére nem alkalmas, csak támpont lehet a klinikus és a szülő számára. Fontos szempont továbbá, hogy a betegek a közeljövőben bevonhatóak lesznek különböző terápiás módszerek kidolgozásába és azok kipróbálásába²⁸⁻³², amelynek előfeltétele, hogy milyen fenotípusba sorolhatóak, illetve, hogy hány kópia SMN2 génnel rendelkeznek.

A kiterjedt vizsgálat eredményeinek szórása a nemzetközi publikációban megadott tartománynak megfelel^{3, 23}, tehát a módszer a nagyszámú mérés alapján validáltnak tekinthető. A laboratóriumban folyamatban van a real-time PCR-rel kapott eredmények további validálása új eljárással, a multiplex ligációfüggő próbaamplifikáció (MLPA) módszerrel³³⁻³⁵. Az MLPA-módszer előnye, hogy lehetőséget ad az SMN-régióban történt génátrendeződések, illetve a deletio kiterjedésének pontos detektálására is. Sajnos azonban ez a módszer sem alkalmas az SMN1 génben kialakult pontmutáció kimutatására.

A spinalis izomatropia gyakori és rendkívül súlyos örökletes betegség. Az SMA-betegek családtagjai esetében egyre gyakrabban merül fel az igény a hordozóság szűrése iránt. Az újonnan bevezetett kvantitatív vizsgálatok segítséget nyújtottak, illetve nyújthatnak a jövőben is a betegségben szenvedő családok számára a korszerűbb genetikai diagnosztizáláshoz, az ismétlődési kockázat csökkentéséhez, valamint a jövőbeni megfelelő terápiás módszerek kiválasztásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki a spinalis izomatropiában szenvedő családoknak vérmintáik biztosításáért. Ugyancsak köszönet illeti az ország valamennyi gyermekgyógyászát, neurológusát és gyermekneurológusát, hogy a betegeket diagnosztikai célból hozzánk küldték. A laboratóriumi munkában nyújtott kiváló segítségért hálásak vagyunk Czibalmos Andrásné, Gönczi Józsefné és Gogolák Ferencné szakasszisztensnőknél.

A munkát a GVOP (GVOP-3.2.1-2004-04-0078/3.0), az OEP és az Európai Unió FP6 TREAT-NMD No.036825 pályázata támogatta.

IRODALOM

1. *Cusin V, Clemons O, Gerard B, Chantreau D, Elion J.* Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J Med Genet* 2003;40:E39.
2. *Czeizel A, Hamula J.* A Hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1989;26:761-3.
3. *Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B.* Quantitative analysis 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.
4. *Pearn J.* Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1978;15:409-13.
5. *Dubowitz V.* Muscle disorders in childhood. Philadelphia: WB Saunders; 1978. p. 147-78.
6. *Pearn J.* Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980;1:919-22.
7. *Musat TL.* Workshop report: International SMA collaboration. *Neuromusc Disord* 1991;1(2):81.
8. *Musat TL, Davies KE.* International SMA consortium. Meeting report. *Neuromusc Disord* 1992;2:423-8.
9. *Musat TL, Davies KE.* Spinal muscular atrophy. Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. Ed by Emery AEH. European Neuromuscular Center, Baarn, The Netherlands; 1994. p. 48-54.
10. *Osawa M, Shoshikura K.* Werdnig-Hoffmann disease and variants. *Handbook of clinical Neurology* Vol.15 Elsevier Science Publisher 1991. p. 51-79.
11. *Rudnik-Schöneborn S, Wirth B, Zerres K.* Evidence of autosomal dominant mutations in childhood-onset proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994;55:112-9.
12. *Prior TW.* Spinal muscular atrophy diagnostics. *J Child Neurol* 2007;22(8):952-6.
13. *Wirth B, Herz A, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn, et al.* Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1999;64:1340-56.
14. *Lefebvre S, Bürglen L, Reboulet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al.* Identification and characterization of the spinal muscular atrophy determining gene. *Cell* 1995;80:155-65.
15. *Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al.* Structure and organization of human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 1996;32:479-82.
16. *Covert DD, Le TT, McAndrew P, Stasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR.* The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997;6:1205-14.
17. *Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, et al.* Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genet* 1997;16:265-9.
18. *Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, et al.* A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 2000;24:66-70.
19. *Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al.* The human centromeric Survival Motor Neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in SMN^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:333-9.
20. *Girard C, Neel H, Bertrand E, Bordonné R.* Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Research* 2006;10:2925-32.
21. *Liu Q, Dreyfuss G.* A novel nuclear structure containing the survival motor neurons protein. *EMBO J* 1996;15:3555-65.
22. *Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
23. *Lee TM, Kim SW, Lee KS, Jin HS, Koo SK, Jo I, et al.* Quantitative analysis of SMN1 gene and estimation of SMN1 deletion carrier frequency in Korean population based on real-time PCR. *J Korean Med Sci* 2004;19:870-73.
24. *Martin Y, Valero A, del Castillo E, Pascual SI, Hernandez-Chico C.* Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 deletions. *Hum Genet* 2002;110:257-63.
25. *Sun Y, Grimm M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B.* Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mut* 2005;25:64-71.
26. *Ogino S, Wilson RB.* Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4(1):15-29.
27. *Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K.* Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: Implication for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997;61:40-50.
28. *Wirth B, Brichta L, Hahnen E.* Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog Mol Subcell Biol* 2006;44:109-32.
29. *Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, et al.* Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2007;117(3):659-71.
30. *DiMatteo D, Callahan S, Kmiec EB.* Genetic conversion of an SMN2 gene to SMN1: a novel approach to the treatment of spinal muscular atrophy. *Exp Cell Res* 2008;15;314(4):878-86.
31. *Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L, et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J Med Chem* 2008;14;51(3):449-69.
32. *Hahnen E, Hauke J, Trankle C, Eyüpoglu IY, Wirth B, Blümcke I.* Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17(2):169-84.
33. *Arklblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromusc Disord* 2006;16(12):830-38.
34. *Zapletalová E, Hedvicáková P, Kozák L, Vondráček P, Gaillyová R, Maríková T, et al.* Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromusc Disord* 2007;17(6):476-81.
35. *Eggermann T, Eggermann K, Elbracht M, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S.* A new splice site mutation in the SMN1 gene causes discrepant results in SMN1 deletion screening approaches. *Neuromusc Disord* 2008;18(2):146-9.