

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Jana Bohatá**

Spinální svalová atrofie

Spinal muscular atrophy

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Roman Šolc

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2015

.....  
Jana Bohatá

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Romanu Šolcovi za jeho trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnoval při psaní práce. Dále pak svému příteli a rodině za podporu.

## Abstrakt

Spinální svalová atrofie (Spinal muscular atrophy; SMA) je nervosvalové onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Postihuje  $\alpha$ -motoneurony předních míšních rohů, což vede k progresivní svalové slabosti. Incidence nemoci je zhruba 1:10 000 a frekvence přenašečů 1:40–1:60. SMA se dělí na čtyři typy na základě stupně projevu a doby, kdy se objeví první příznaky. Doba dožití se liší dle stupně SMA, pacienti s nejzávažnější formou se dožívají kolem dvou let, ti s méně závažným typem SMA se zpravidla dožívají normálního věku. Nemoc je způsobena mutací genu *SMN1*, který leží na pátém chromozomu, ve většině případů se jedná o homozygotní delecii v tomto genu.

## Klíčová slova:

Spinální svalová atrofie; neuromuskulární onemocnění; alfa motoneurony; autozomálně recesivní onemocnění; *SMN1*; *SMN2*

## Abstract

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder which affects  $\alpha$ -motor neurons in anterior horns of spinal cord resulting in progressive muscle weakness. The estimated incidence is 1:10 000 and carrier frequency 1:40–1:60. SMA is classified into four grades depending on the age of onset and its severity. Life expectancy differs according to grade of SMA, patients suffering from the most serious grades live about two years, milder could live to adulthood. This disorder is caused by mutation of the *SMN1* gene which is located on the fifth chromosome. In the majority of cases the type of mutation is homozygous deletion in *SMN1* gene.

## Keywords:

Spinal muscular atrophy; neuromuscular disorder; alpha motor neurons; autosomal recessive disorder; *SMN1*; *SMN2*

## Seznam použitých zkratek:

<b>CK</b>	creatine kinase	kreatinkináza
<b>EMG</b>	electromyography	elektromyografie
<b>ESE</b>	exonic splincing enhancer	zesilovač sestřihu
<b>ESS</b>	exonic splicing silencer	zeslabovač sestřihu
<b>hnRNP R</b>	heterogenous nuclear ribonucleoprotein R	heterogenní jaderný ribonukleoprotein R
<b>MLPA</b>	multiplex ligation-dependent probe amplification	multiplexní amplifikace ligačně závislých sond
<b>NCS</b>	nerve conduction study	studie nervových vedení
<b>NCV</b>	nerve conduction velocity	rychlost vedení nervu
<b>NMJ</b>	neuromuscular junction	nervosvalové spojení
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
<b>RFLP</b>	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
<b>SMA</b>	spinal muscular atrophy	spinální svalová atrofie
<b>SMN (protein)</b>	survival of motor neuron protein	protein pro „přežití“ motoneuronu
<b>SMN1 (gen)</b>	survival of motor neuron 1, telomeric	gen pro „přežití“ motoneuronu 1, telomerická varianta
<b>SMN2 (gen)</b>	survival of motor neuron 2, centromeric	gen pro „přežití“ motoneuronu 2, centromerická varianta
<b>(U) snRNP</b>	(uridine-rich) small nuclear ribonucleoprotein	malý jaderný ribonukleoprotein (s vyšším množstvím uridinu)
<b>SSCP</b>	single-strand conformation polymorphism, single-strand chain polymorphism	polymorfismus konformace jednoduchých řetězců

## Obsah:

1. Úvod .....	- 1 -
2. Podstata onemocnění.....	- 2 -
2.1 Fyziologické aspekty SMA.....	- 2 -
2.2 Genetické aspekty SMA .....	- 3 -
2.2.1 Evoluce genů <i>SMN1</i> a <i>SMN2</i> .....	- 4 -
2.2.2 Rozdíly mezi geny <i>SMN1</i> a <i>SMN2</i> .....	- 5 -
2.2.3 Mutace genu <i>SMN1</i> .....	- 7 -
2.2.4 Souvislost mezi genotypem a fenotypem .....	- 8 -
2.3 Protein SMN.....	- 9 -
3. Typy a dělení SMA .....	- 13 -
3.1 Typ I – Akutní infantilní forma.....	- 13 -
3.2 Typ II – Intermediální forma.....	- 14 -
3.3 Typ III – Juvenilní forma.....	- 15 -
3.4 Typ IV – Adultní forma .....	- 15 -
4. Diagnostika.....	- 16 -
4.1 Prenatální diagnostika .....	- 16 -
4.2 Molekulární diagnostika.....	- 16 -
4.3 Test na přenašečství.....	- 17 -
5. Možnosti léčby .....	- 19 -
5.1 Léčiva .....	- 19 -
5.2 Regulace SMN .....	- 20 -
5.2.1 RNA regulace <i>SMN2</i> .....	- 20 -
5.2.2 Trans-splicing RNA.....	- 21 -
5.3 Kmenové buňky .....	- 22 -
6. Závěr .....	- 23 -
Seznam použité literatury:.....	- 24 -
Seznam použitých ilustrací:.....	- 33 -

## 1. Úvod

Spinální svalová atrofie (spinal muscular atrophy; SMA) je pojem označující skupinu geneticky podmíněných onemocnění, která způsobují ochabování svalů z důvodu špatné funkce a odumírání motorických neuronů. Onemocnění patří mezi nejčastější autozomálně recesivní dědičná onemocnění, v jejichž rámci je SMA I. typu, neboli Werdnigův-Hoffmannův syndrom, nejčastějším onemocněním vedoucím ke smrti novorozenců. Po cystické fibróze je druhou nejčastější autozomálně recesivní nemocí způsobující výrazné zkrácení života (Roberts *et al.* 1970, Sugarman *et al.* 2012).

Spinální svalová atrofie se může projevit v různé intenzitě, dělíme ji proto na 4 základní typy, které budou zmíněny dále v práci. Nejvyšší incidenci má SMA I. typu, která postihuje novorozence. Průměrná doba jejich dožití se pohybuje kolem dvou let. Jednotlivé typy SMA se odlišují rozsahem postižení a dobou, kdy se objeví první příznaky, přičemž pozdější nástup onemocnění je spojen s menšími zdravotními komplikacemi. Nemoc se může projevit v jakémkoli věku, zejména SMA I. typu limituje postižené jedince v pohybu, dýchání, polykání.

Obvykle uváděná frekvence přenašečů v populaci je 1:40–1:60. Údaj z roku 2012 uvádí frekvenci přenašečů ve Spojených státech 1:54 (Sugarman *et al.* 2012). Incidence nemoci je 1:10 026 (Prior *et al.* 2010), což odpovídá obvykle uváděným údajům, které se pohybují od 1:6000–1:10 000 (Pearn 1978).

Stěžejními geny pro SMA jsou geny *SMN1* a *SMN2* (survival of motor neuron gene 1 a 2) na chromozomu 5. Kódují protein SMN (survival of motor neurone), jehož nedostatek vede k mnoha defektům, zvláště u motorických neuronů.

Prozatím je známa jen symptomatická léčba, která vede pouze ke zlehčování následků a projevů nemoci, nikoli k vyléčení.

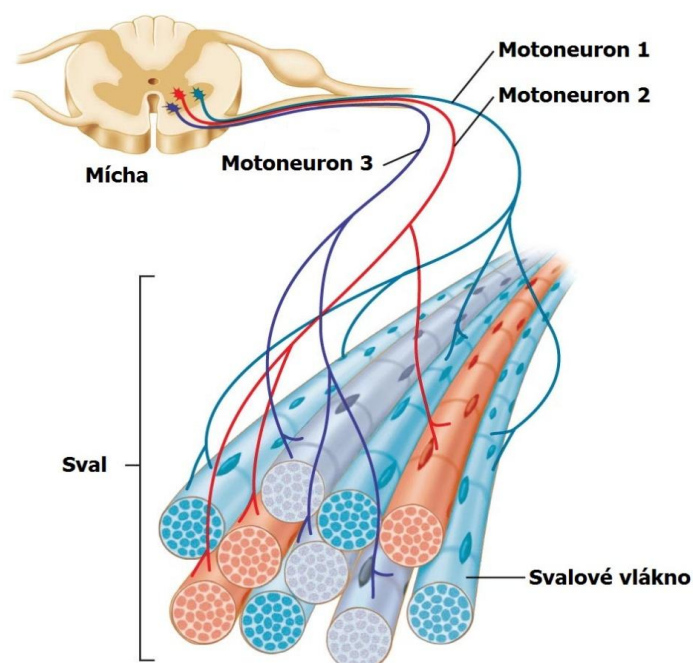
Ve své práci se zaměřím pouze na formy závislé na genu *SMN* na chromozomu 5q13.2. Existují i další formy dědičných onemocnění motorických neuronů, které jsou způsobeny mutacemi jiných genů. Jedná se například o spinální a bulbární svalovou atrofii vázanou na chromozom X a jiné.

## 2. Podstata onemocnění

### 2.1 Fyziologické aspekty SMA

Kosterní svaly jsou aktivovány prostřednictvím motorických neuronů (motoneuronů). Motorický neuron společně se všemi svalovými vlákny, které inervuje, tvoří motorickou jednotku. Počet svalových vláken, která jsou inervována jedním motoneuronem, může být několik desítek až stovek. Alfa-motoneurony v předních míšních rozích jsou konečnou drahou aktivace kosterního svalstva (viz obr. 1).

Společným znakem všech typů SMA je svalová slabost, způsobená ztrátou motorických neuronů. Pokud chybí inervace svalů, svaly postupně ochabují a atrofují. U denervovaných svalů se občas zachová malé množství motorických jednotek, tvořených jedním motorickým neuronem a jedním svalovým vláknem, ty pak způsobují sporadické škrábání (fascikulace, viz obr. 2) v prstech a jazyce, čehož se využívá k diagnostice SMA (Markowitz *et al.* 2004).

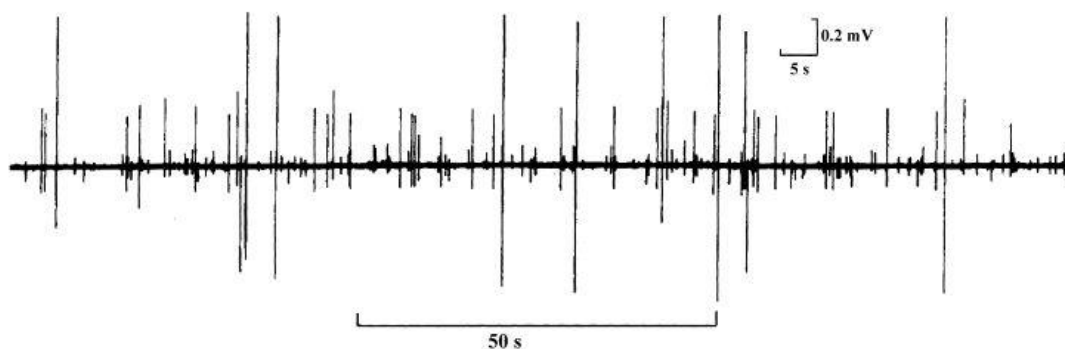


© 2011 Pearson Education, Inc.

Obr. 1: Inervace kosterního svalů. Barevně jsou vyznačeny jednotlivé motoneurony a stejnou barvou k nim příslušná svalová vlákna, dohromady tvoří motorickou jednotku. (převzato a upraveno z: [http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter\\_11%20Fall%202011.htm](http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter_11%20Fall%202011.htm))



Svalová činnost se hodnotí pomocí elektromyografie (EMG), na základě elektrických signálů vycházejících ze svalů. Výsledky EMG u dětí se SMA ukazují těžkou denervací, která je způsobena sníženým počtem motorických jednotek (Hausmanowa-Petrusewicz 1988 in Crawford *et Pardo* 1996). Tyto výsledky se samozřejmě liší dle závažnosti SMA. U méně závažných případů převládají ve svalech velké motorické jednotky a není zde přítomna abnormální spontánní svalová aktivita, což je způsobeno tím, že přeživší axony reinervují sousední svalová vlákna, která nemají své axony. U závažnějších případů díky EMG vidíme fibrilační potenciál, způsobený náhle denervovanými svalovými vlákny, přestože motorické jednotky mají zachovanou svou velikost. Existuje tedy spojitost mezi typem SMA a schopností motorických neuronů, zahájit v případě denervace sousedních svalových vláken terminální axonální růst (Crawford *et Pardo* 1996).



Obr. 2: EMG – fascikulační potenciály. Tento záznam ukazuje velké množství potenciálů s nepravidelnými hodnotami. Podle rozdílů ve výšce amplitud, lze usuzovat na více fascikulujících motorických jednotek (převzato z Brown 1984).

## 2.2 Genetické aspekty SMA

Gen podmiňující vznik SMA byl nalezen na chromozomu 5 konkrétně na jeho dlouhém raménku v regionu 11.2–13.3 (Brzustowicz *et al.* 1990). Chromozom 5 je jeden z největších lidských chromozomů, obsahuje mnoho intragenových duplikací a proto jeho genová denzita není příliš vysoká. Nejvíce duplikací se na chromozomu 5 vyskytuje v úseku o velikosti 1–2 Mb v oblasti 5q13.3 (Schmutz *et al.* 2004).

Přesná lokalizace genu *SMN* byla provedena v roce 1995 kombinací genetického a fyzického mapování DNA. V oblasti 5q13 byla identifikována invertovaná duplikace o

velikosti 500 kb. V té se mimo jiné nachází i gen *SMN* o velikosti 20 kb a to ve dvou kopiích, z nichž je s ohledem na vzájemnou pozici jedna označena jako varianta telomerická, druhá jako centromerická (Lefebvre *et al.* 1995).

Lefebvre *et al.* (1995) našli oba dva geny podmiňující SMA a taktéž prokázali, že oba dva jsou exprimovány. Vzhledem k tomu, že centromerická varianta genu (*SMN2*) byla přítomna jen u 95,5 % kontrolních vzorků, zatímco telomerická varianta (*SMN1*) u 100 %, předpokládá se, že telomerická varianta je ancestrální gen, z kterého duplikací vznikla později i varianta centromerická. Gen *SMN* je složen z osmi exonů, což bylo objeveno pomocí genomové sekvenční analýzy (Lefebvre *et al.* 1995). O rok později však Bürglen *et al.* (1996) uvádí, že je složen z exonů devíti. Pro předejití chaosu v číslování byl rozdělen exon 2 na 2a a 2b a ostatní exony zůstaly zachovány. Terminační kodón pro protein SMN se nachází v exonu 7, exon 8 je zodpovědný za připojení poly-A konce na mRNA (Le *et al.* 2000).

Battaglia *et al.* (1997) našli ortologní gen u krysy a dále se věnovali výzkumu exprese SMN v CNS u krysy, opice a lidí pomocí imunocytochemie a hybridizace *in situ*. Transkript a proteinový produkt genu *SMN* byl hojně, ale nerovnoměrně přítomen v oblastech mozku a míchy.

Byl nalezen i myší homologní gen *SMN*, který leží na chromozomu 13 v konzervované syntenii s lidským chromozomem 5q13. Nebyl pozorován žádný alternativní sestřih, na rozdíl od lidského *SMN*. Aminokyselinová sekvence, kterou gen kóduje je v 82 % shodná se sekvencí člověka. Duplikace SMA regionu u myši nebyla nalezena (DiDonato *et al.* 1997).

### 2.2.1 Evoluce genů *SMN1* a *SMN2*

Dle molekulárních fosílií a molekulárních hodin se předpokládá, že duplikace genu *SMN* se mohla objevit před 3 miliony let, nicméně tyto přístupy neberou v potaz možnou sekvenční homogenizaci prostřednictvím genové konverze, tudíž byla použita kvantitativní PCR a analýza alelických variant, aby se prokázal/vyvrátil důkaz duplikace genu *SMN* u šimpanze, jakožto nejbližšího příbuzného člověka. Studie odhalila, že šimpanzi mají v diploidním genomu 2-7 kopií genu *SMN*, nicméně u nich nebyl nalezen gen *SMN2* – chyběl mRNA produkt SMN $\Delta$ 7. Oproti tomu byl gen *SMN2* objeven zatím u všech studovaných lidských populací. To znamená, že genová duplikace se objevila před

více než 5 miliony lety, ještě před rozdělením šimpanze a člověka, ale gen *SMN2* je specifický pouze pro *Homo sapiens* (Rochette *et al.* 2001).

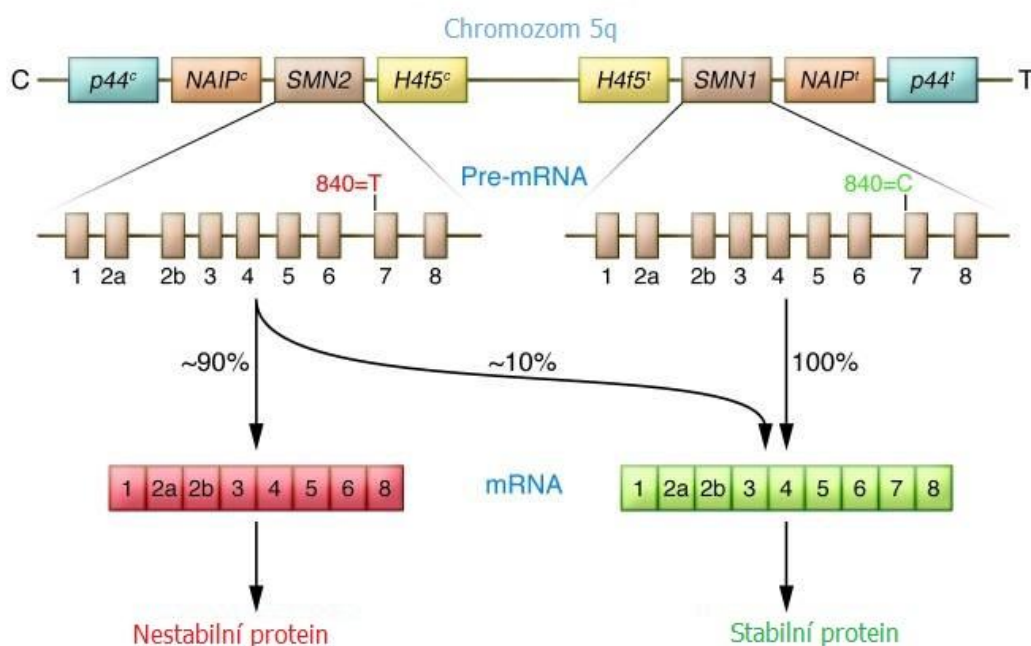
### 2.2.2 Rozdíly mezi geny *SMN1* a *SMN2*

Na chromozomu 5q13 jsou přítomny dva téměř identické geny *SMN* – *SMN1* neboli telomerická varianta, někdy označována jako *SMN<sup>T</sup>*, a *SMN2* neboli centromerická varianta, někdy označována jako *SMN<sup>C</sup>* (viz obr. 3). Tyto dva geny odlišuje pouhých 5 nukleotidů (jeden v intronu 6, dva v intronu 7, jeden v exonu 7 a jeden v exonu 8) (Lefebvre *et al.* 1995; Bürglen *et al.* 1996). Exony genů jsou tedy rozdílné jen ve 2 bazích, přičemž jedna z nich, záměna C>T v exonu 7, ovlivňuje sestřih mRNA. Záměna v exonu 8 leží v 3' nepřekládané oblasti. Transkript *SMN1* je tedy kompletní, zatímco naprostá většina transkriptu *SMN2* (90 %) postrádá exon 7. Tento odlišný transkript se někdy označuje jako *SMNΔ7* (Lorson *et al.* 1999; Monani *et al.* 1999). Záměna C>T u *SMN2* neovlivňuje tedy kódovanou aminokyselinu, ale naruší zesilovač sestřihu (exonic splicing enhancer; ESE), resp. dojde ke ztrátě SF2/ASF-závislého zesilovače sestřihu. Alternativním modelem je pak vznik hnRNP A/B-závislého zeslabovače sestřihu (exonic splicing silencer; ESS). K prvnímu modelu se po rozsáhlém testování přiklání i Cartegni *et al.* (2006). Jsou ale i studie, které více podporují druhý model, který říká, že záměna v exonu 7 vede ke vzniku zeslabovače sestřihu, který váže represor hnRNP A1. Byla objevena silná a specifická interakce mezi hnRNP A1 a exonem 7, což podporuje myšlenku, že sestřih exonu 7 je potlačován při navázání hnRNP A1 a ESS (Kashima *et al.* 2003; Kashima *et al.* 2007). Transkript, kterému chybí exon 7, dává vznik méně stabilnímu proteinu, který rychleji degraduje (Lorson *et al.* 2000).

Jak bylo uvedeno, zásadním rozdílem mezi geny *SMN1* a *SMN2* je tedy silent C>T tranzice v *SMN2*, která určuje vystřižení exonu 7. *SMN1* s cytosinem na pozici 840 preferenčně zahrnuje exon 7, což vede k tvorbě nezkrácené verze transkriptu a potažmo proteinu, zatímco *SMN2* s thyminem na této pozici převážně vystřihuje exon 7, a to vede ke zkrácené variantě transkriptu a nestabilní formě proteinu. Sestřih exonu 7 je regulován množstvím exonových a intronových sestřihově regulačních sekvencí a také trans-faktory, které se na ně vážou. Byly identifikovány dvě regulační oblasti v intronu 7, které ovlivňují sestřih, a to nezávisle na buněčném typu. Další analýza ukázala, že pokud v jedné z těchto oblastí došlo k delecii či jiné mutaci, zvýšilo se relativní množství transkriptu genu *SMN* neobsahujícího exon 7. Naopak amplifikace výše uvedených

oblastí může obnovit správný sestřih *SMN*. Tímto způsobem byla objevena nová intronová splicing enhancer sekvence ležící v posledním intronu genů *SMN* (Gladman *et al.* 2009).

Proto také absence *SMN1* vede k projevu SMA, zatímco absence *SMN2* nemá žádný fenotypový projev. Protože však malé množství funkčního proteinu vzniká i díky *SMN2*, ovlivňuje počet kopií tohoto genu závažnost nemoci (Lefebvre *et al.* 1997).



Obr. 3: Geny *SMN1* a *SMN2* se liší pouze o několik bází a z toho pouze dvě jsou přítomny v oblasti exonů. Kritický je však nukleotid na pozici 840 v exonu 7, ovlivňuje totiž sestřih mRNA, přičemž následně dochází ke ztrátě exonu 7 (převzato a upraveno z Swoboda 2011).

Již v roce 1995 Gennarelli *et al.* identifikovali čtyři různé izoformy mRNA genu *SMN*. Tyto izoformy vznikly alternativním sestřihem exonu 5 a 7 *SMN1* a *SMN2*. Později však díky analýze mRNA exprese genu *SMN* v buňkách z periferní krve u zdravých jedinců, přenašečů i pacientů se SMA bylo objeveno 6-8 transkriptů genu *SMN*, vzniklých alternativním sestřihem ne/zahrnujícím exony 3, 5 a 7. Jedinci se SMA vykazovali vyšší množství sestřihových variant a velmi malé nebo žádné množství exonu 7. Většina transkriptu *SMN1* obsahovala všechny exony – jeho délka byla 973 bp. Transkripty, kterým chyběl exon 7, byly dlouhé 919 bp, v případě absence exonu 5 pak měly 877 bp a malé množství transkriptu postrádajícího exon 3 dosahovalo délky 722 bp. Případné další varianty transkriptů měly chybějící exony 5 a 7 (823 bp) nebo 3 a 7 (718 bp). V případě genu *SMN2* postrádala většina transkriptů exon 7, méně pak byl zastoupen

transkript bez exonu 3 a 7 případně 5 a 7. Objevil se však i transkript bez všech tří exonů o délce 622 bp doprovázen transkriptem v plné délce a transkriptem bez exonu 3. Nebyla však nalezena souvislost mezi jednotlivými typy (případně množstvím) mRNA a fenotypem SMA. Potvrdil se však rozdíl v množství transkriptu obsahujícím exon 7 u normálních jedinců, přenašečů a pacientů se SMA. Díky poměru mezi fragmentem s/bez exonu 7 bylo zjištěno, že pacienti se SMA se blíží nule, přenašeči jedné a zdraví jedinci více než jedné (Jong *et al.* 2000).

Promotorová sekvence a aktivita je u obou variant genů téměř identická, oba mají tedy velmi podobnou transkripční regulaci. Rozdíl v množství proteinu, který kódují, je dán jinými regulačními sekvencemi, nebo posttranskripčními regulacemi (Echaniz-Laguna *et al.* 1999; Monani *et al.* 1999).

### 2.2.3 Mutace genu *SMN1*

Gen *SMN1*, který je zodpovědný za projev SMA, může být nefunkční z více důvodů. 96,4 % pacientů nese homozygotní delecí, která zahrnuje exon 7 a 8, v některých případech se jedná o izolovanou delecí exonu 7. Delece v *SMN1* na obou chromozomech se vyskytuje s vyšší frekvencí u pacientů se SMA I. a II. typu (96 % resp. 94 % pacientů) než u těch se SMA III. typu (86 % pacientů). Zbývající 3,6 % pacientů má delecí/konverzi na jednom chromozomu a bodovou mutaci na chromozomu druhém. Bodových mutací bylo objeveno cca 23, z toho nejčastěji (v pětinach případů) se jedná o missense mutaci c.815A>G v exonu 6, která způsobuje záměnu aminokyseliny, konkrétně p.Y272C (Wirth 2000).

Analýza bodových mutací byla provedena i v České republice, konkrétně ve Fakultní nemocnici v Motole a Fakultní nemocnici v Brně. Celkem bylo vyšetřeno 301 pacientů se SMA, z nichž u 287 byla nalezena homozygotní delecí v genu *SMN1*. U zbylých 14 pacientů byla delecí postižena heterozygotně pouze jedna alela. U 6 pacientů z těchto 14 byla v nedeletované alele odhalena bodová mutace. Jednalo se o c.815A>G (p.Y272C) shodně u třech pacientů, c.821C>T (p.T274I), c.98delT (p.I33IfsX6) a c.562G>T (p.A188S). Poslední dvě uvedené mutace nebyly do té doby popsány a obě byly přítomny u pacientů se SMA I. typu. Mimojiné i tato studie potvrzuje, že zvýšené množství kopií *SMN2* je asociováno s lehčím projevem SMA (Zapletalová *et al.* 2007).

Při genové konverzi se z genu *SMN1* v podstatě stane gen *SMN2* (protože se tyto dva geny liší prakticky jen exonem 7, stačí, aby ten byl v *SMN1* nahrazen), tím se také

vysvětluje nárůst kopií *SMN2* u postižených jedinců, k čemuž dochází více u pacientů s SMA II. a III. typu (Campbell *et al.* 1997).

Bodové mutace fungují na bázi narušení zesilovače sestřihu (exonic splicing enhancer), což posléze naruší normální chod sestřihu. Jediná záměna nukleotidu u *SMN2* způsobí vystřížení exonu 7, tato záměna se vyskytuje v rámci heptamerového motivu zesilovače sestřihu (Cartegni *et Krainer* 2002).

Molekulární analýza 42 pacientů, kterým chyběl exon 7, ale ne exon 8 genu *SMN1*, ukázala, že se jedná o hybridní gen *SMN1/SMN2*. Na základě rozdílů mezi introny 6 a 7 a exonem 7 lze zjistit původ, bylo tedy zjištěno, že exon 8 pochází z genu *SMN1* a zbývající exony z genu *SMN2*. Přibližně u poloviny pacientů byl nalezen shodný haplotyp, což napovídá společnému původu (Hahnen *et al.* 1996).

Byly popsány též mutace v exonu 3. Sossi *et al.* (2001) popsali tři nepříbuzné pacienty, kteří nesli pouze jednu alelu *SMN1* (druhá byla deletovaná) a dvě alely *SMN2*, přičemž u všech tří byla v exonu 3 genu *SMN1* odhalena nonsense mutace (u dvou z nich shodná tranzice c.305G>A (p.Y102X) a u jednoho delece c.425del5). Pacient nesoucí delecí měl diagnostikovanu SMA I. typu, pacienti nesoucí substituci jeden SMA II. typu a druhý SMA III. typu. U všech tří pacientů byl v buňkách přítomen transkript genu *SMN1*, z něhož byl ovšem vystřížen celý exon 3 – mutace zřejmě indukovaly mechanismus tzv. *exon skipping*, cíleného vystřížení mutovaného exonu, což v konečném důsledku vedlo k produkci deformovaného proteinu SMN, který si však udržel částečnou funkčnost a mohl do jisté míry vyrovnávat chybějící *SMN1*, resp. nízký počet kopií *SMN2*. Přestože by se dala předpokládat vážnější forma fenotypu, fibroblasty těchto pacientů vykazovaly velké množství jaderného SMN proteinu – gemů. Izoforma proteinu postrádající oblast kódovanou exonem 3 tedy přispívá k tvorbě jaderného proteinového komplexu, který může být důvodem mírnějšího fenotypového projevu (Sossi *et al.* 2001).

#### 2.2.4 Souvislost mezi genotypem a fenotypem

U více než 95 % (viz výše: Wirth 2000 uvádí 96,4 %) pacientů dochází k homozygotní ztrátě funkce genu *SMN1*, kdy exon 7 je deletován nebo konvertován na *SMN2*. U zbylých případů je deletována jedna kopie *SMN1* a druhá podléhá jiné mutaci (Lefebvre *et al.* 1995).

Vzhledem k tomu, že i při ztrátě funkce *SMN1* dochází k tvorbě velmi malého množství proteinu SMN díky zbylému *SMN2*, můžeme hledat korelaci mezi množstvím *SMN2* a stupněm projevu SMA. Existují dva typy alel *SMN2* podle původu: a) původní alely *SMN2*, b) alely *SMN2* vzniknuvší genovou konverzí. Ne všechny alely *SMN2* jsou rovnocenné. Ty, které se vyskytují u pacientů se SMA II. a III. typu jsou schopny produkovat proteiny, které se poté formují do gemů, zatímco alely *SMN2* u pacientů s SMA I. typu takovéto proteiny nejsou schopné produkovat. Počet kopií *SMN2* může ovlivnit počet gemů (Coover *et al.* 1997).

Ve velmi ojedinělých případech se v rodinách, kde se vyskytovala SMA, objevili jedinci s homozygotní delecí *SMN1* bez jakýchkoliv příznaků SMA. Všichni měli totiž zvýšené množství kopií *SMN2*, konkrétně pět. Dalo by se tedy usuzovat, že pět kopií *SMN2* stačí na kompenzaci ztráty *SMN1* (Prior *et al.* 2004). Další studie tří rodin s asymptomatickými nositeli homozygotní delecce *SMN1* ukázala, že počet kopií *SMN2*, který se u jedinců bez projevů nemoci pohybuje od čtyř do pěti, ovlivňuje fenotyp, ale není to jediný určující prvek. V jedné rodině se totiž objevili tři sourozenci se čtyřmi kopiemi *SMN2*, žádnou kopií *SMN1* a dva z nich trpěli SMA III. typu, zatímco třetí neprokazovala žádné symptomy nemoci (Jedrzejowska *et al.* 2008).

### 2.3 Protein SMN

Telomerická (*SMN1*) i centromerická (*SMN2*) varianta genu *SMN* kóduje 38 kDa velký protein SMN (survival of motor neurone), který je složen z 294 aminokyselin. Tento protein je všudypřítomný v buňkách, vyskytuje se v jádru i v cytoplazmě (Liu *et Dreyfuss* 1996). Protein přítomný v jádru se slučuje do specifických struktur nazývaných *gemy*. Toto označení vzniklo jako zkratka slov *Gemini of coiled bodies* („Blíženci“ Cajalových tělísek), protože se většinou nachází v jejich těsné blízkosti. Velikost gemů je přibližně 0,1-1 mikrometru (Liu *et Dreyfuss* 1996). Peptidy kódované exony 2b, 3 a 6 hrají roli v rozložení SMN v buňce. Byl nalezen devíti aminokyselinový motiv v konzervované sekvenci kódované exonem 2b, který zprostředkovává umístění SMN v blízkosti Cajalových tělísek. Delece této domény dramaticky ovlivňuje aktivitu SMN a vede k extenzivní buněčné smrti (Morse *et al.* 2007).

Protein je translatován z obou genů, jak prokázal Coover *et al.* (1997) použitím skupiny anti-SMN protilátek. Pacienti s diagnostikovanou SMA I. typu mají nejmenší

množství gemů, tudíž na základě počtu gemů by se taktéž dal diagnostikovat typ SMA. Produkt genu *SMN2*, protein bez sekvence kódované exonem 7, není schopen vytvářet gemy. Při ztrátě exonu 5 nebo při missense mutaci v exonu 3 dochází k normální tvorbě gemů (Mohaghegh *et al.* 1999). O rok později však Le *et al.* uvádí, že izoformy SMN, které nemají exon 7, mohou také vytvářet gemy, i když s nižší účinností, ovšem izoformy SMN postrádající exon 5 i 7 nikoli. Mutace na N-konci způsobují, že se SMN akumuluje v jádru, tudíž tato doména je zásadní pro správnou distribuci proteinu SMN (Le *et al.* 2000).

Mutant SMN s tzv. dominantně negativním účinkem, kterému chybí prvních 27 aminokyselin na N-konci, reorganizuje snRNP v jádru, dále také inhibuje pre-mRNA sestřih, zatímco wild-type SMN stimuluje sestřih. SMN mutanty u pacientů se SMA nedokáží stimulovat sestřih, z čehož vyplývá, že SMN hraje důležitou roli ve výrobě pre-mRNA sestřihové mašinerie, a tedy v biogenezi mRNA (Pellizzoni *et al.* 1998).

Protein SMN je nejvíce exprimován v tkáních mozku, ledvin a jater, méně v kosterním a srdečním svalstvu, nejméně ve fibroblastech a lymfocytech. Snížení exprese proteinu SMN v míše, kde množství SMN proteinu je až stokrát nižší (u pacientů se SMA I. typu), vede pak k projevům nemoci (Coovert *et al.* 1997). Není zcela jasné, kde a kdy je protein potřebný při ontogenezi motorických jednotek.

Na myším modelu, který má pouze jednu alelu genu *SMN*, lze demonstrovat důležitost proteinu SMN. Když u myši homozygotně vyřadíme tento gen z funkce, dojde k velkým ztrátám buněk v embryonálním vývoji, což následně vede ke smrti embrya. Gabanella *et al.* (2005) zpozorovali u myši vyšší hladiny SMN během embryonálního a raně postnatálního vývoje CNS. Poté následoval pokles na bazální hladinu SMN, nejprve u míchy a následně u mozkové tkáně společně s nástupem myelinizace. Protein SMN je velmi důležitý pro funkci a přežití buněk (Schrank *et al.* 1997).

Přesná funkce proteinu SMN není zcela jasná, převládají dva různé názory. První z nich říká, že SMN je nezbytný jako tzv. housekeeping protein v biogenezi snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) a sestřihu pre-mRNA. V buňkách se sníženým množstvím SMN tak dochází k poruchám ve skládání snRNP a tím pádem i k poruchám ve splicingu (Wan *et al.* 2005).

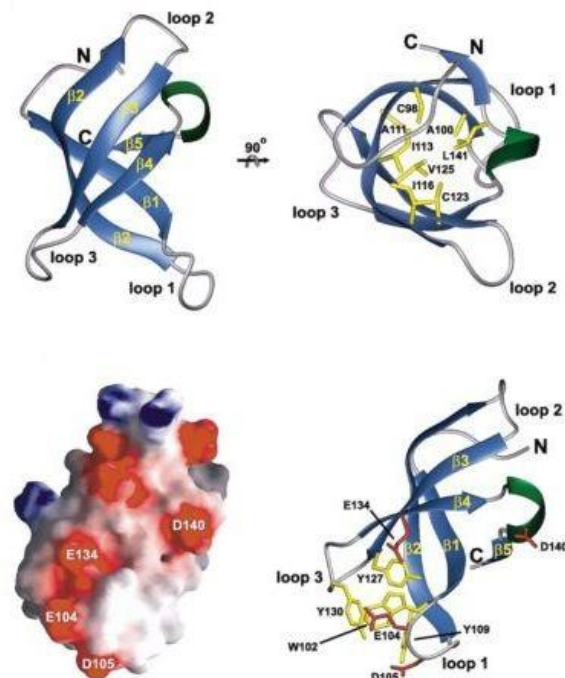
Protein SMN těsně asociuje s proteinem SIP1 (SMN-interacting protein 1) a dohromady s několika spliceosomálními snRNP proteiny vytváří specifický komplex. Protein SMN může také přímo interagovat se snRNP Sm proteiny a má tedy dvě vazebná místa – jedno pro SIP1 a druhé pro Sm proteiny (Liu *et al.* 1997).



Proteiny SMN mezi sebou interagují společně se spliceozomálními Sm proteiny (tj. RNA vázající proteiny) snRNP. Tento komplex hraje rozhodující úlohu při sestřihu pre-mRNA. Poškozené SMN proteiny, objevující se u pacientů se SMA, nejsou schopné se navázat na proteiny Sm, zatímco normální proteiny SMN jsou schopny oligomerizace a pak mají mnohem vyšší afinitu k proteinům Sm (Pellizzoni *et al.* 1999).

SMN v cytoplazmě přímo interaguje se spliceozomálními Sm proteiny a usnadňuje jejich uspořádání na U snRNA (uridine-rich small nuclear ribonucleic acid). SMN v jádru zprostředkovává recyklaci pre-mRNA sestřihových faktorů. Monoklonální protilátky proti SMN inhibují pre-mRNA sestřih, což přidává další funkci SMN v jádru – ovlivnění sestřihu modulací Sm proteinového složení U snRNP (uridine-rich small ribonucleoprotein). Interakce SMN-Sm protein tedy není omezena pouze na cytoplazmu (Meister *et al.* 2000).

Lorson *et al.* (1998) prokázali přímou schopnost proteinu SMN vázat RNA, posléze i ssDNA a dsDNA. Úsek proteinu, díky kterému má takové schopnosti je kódován exonem 2. Tato doména je společná více faktorům, které jsou schopné vázat nukleové kyseliny.



Obr. 4: Tudor doména proteinu SMN. V dolní části obrázku je červeně a modře vyznačen kladně resp. záporně nabitý povrch, vpravo pak stejný pohled v provedení vláseňkové struktury (převzato z Selenko *et al.* 2001).

Protein SMN obsahuje centrální *Tudor* doménu (viz obr. 4), která umožňuje SMN-Sm proteinovou vazbu, bodová mutace c.400G>A (p.E134K) v této doméně znemožňuje vazbu, a tudíž podmiňuje vznik SMA. Struktura *Tudor* domény má záporně nabitý povrch, který interaguje s kladně nabitými C-koncovými argininy a glyciny Sm proteinů. Záměna aminokyseliny nenaruší samotnou *Tudor* doménu, ale má vliv na rozdělení nábojů na jejím povrchu (Bühler *et al.* 1999; Selenko *et al.* 2001). Název této domény pochází od *tudor* proteinu, což je protein, potřebný při ontogenezi octomilky *Drosophila melanogaster*, který obsahuje několik kopií této domény (Callebaut *et Mornon* 1997).

Sun *et al.* (2005) zkoumali, jestli missense mutace způsobující SMA, které identifikovali, souvisí s interakcemi mezi proteinem SMN a dalšími komponenty SMN komplexu. Mutace G95R (c.332C>G transverze v exonu 3) a A111G (c.283G>C transverze v exonu 3) snižují vazbu SMN k Sm proteinům, což potvrzuje, že *Tudor* doména je esenciální vazebné místo pro protein SMN a Sm proteiny.

Na druhé straně stojí názor, který na základě pozorování demonstruje, že protein SMN se akumuluje v axonech a růstových kuželech, což znamená, že SMN může plnit neuronálně a svalově specifické funkce (Fan *et Simard* 2002).

Komplex SMN a hnRNP R (heterogenous nuclear ribonucleoprotein R) asociuje s mRNA  $\beta$ -aktinu a translokuje se do axonů motoneuronů. Následně by pak mohlo dojít ke snížení množství  $\beta$ -aktinu v růstových kuželech neuronů, tím pádem i k redukci axonálního růstu u SMA (Rossoll *et al.* 2003).

Velké motorické neurony míchy vykazují největší množství proteinu SMN, společně s neurony prodloužené míchy, pyramidálními buňkami mozkové kůry a Purkyňovými buňkami mozečku. Exprese probíhá již u osmitýdenního plodu a posléze po celou dobu života (Tizzano *et al.* 1998).

Protein s podobnou funkcí byl objeven i u hlístice *Caenorhabditis elegans* a u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* (Talbot *et al.* 1997), kde dostal název Yab8p. Je strukturně i funkčně velmi podobný proteinu SMN vyšších eukaryot, což potvrzuje jeho důležitost pro životaschopnost buněk (Hannus *et al.* 2000).

### 3. Typy a dělení SMA

Spinální svalová atrofie má několik stupňů projevu. Základní dělení je na 4 typy, které se liší mírou rozsahu postižení a stupněm zasažení svalové soustavy (Emery 1971). Dalším faktorem pro určení typu SMA je doba, kdy se objeví prvotní příznaky. Někdy určení konkrétního typu SMA není zcela jasné, symptomy se mohou mnohdy prolínat, případně vývoj nemoci nemusí být vždy zcela stejný.

Tab. 1: Dělení SMA a charakteristika jednotlivých typů (vytvořeno na základě údajů z Wang *et al.* 2007 a Arnold *et al.* 2015)

typ	první příznaky	rozsah postižení	doba dožití	zastoupení SMA v %
I. infantilní akutní forma (Werdnig–Hoffmannova nemoc)	do prvního půl roku života	neschopnost sezení bez opory	do 2 let	45%
II. intermediální forma	7. – 18. měsíc věku	schopnost sedět, neschopnost chodit	2 roky – 25 let	20%
III. juvenilní forma (Kugelberg–Welanderové nemoc)	po 18. měsíci věku (obvykle pozdní dětství/adolescencce)	schopnost chodit	do dospělosti	30%
IV. adultní forma	druhá – třetí dekáda života	-	do dospělosti	<5%

#### 3.1 Typ I – Akutní infantilní forma

Akutní infantilní forma, neboli SMA I. typu (MIM#253300) je nejčastějším typem SMA a taktéž jedno z nejčastějších autozomálně recesivních onemocnění vedoucích ke smrti novorozenců (Pearn 1978). SMA I. typu se někdy nazývá Werdnig–Hoffmanova nemoc, dle objevitelů G. Werdniga a J. Hoffmanna, kteří nemoc popsali v 90. letech 19. století. Ve svém výzkumu popsali brzký projev nemoci, výskyt u dětí, které mají zdravé rodiče, progresivní slabost, třes rukou a smrt v raném dětství jako následek selhání dýchání. Postihuje novorozence do 6. měsíce. Průměrná doba dožití postižených jedinců

je 2 roky. Příčinou smrti je nejčastěji selhání dýchání nebo infekce dýchacích cest. Délku života může zvýšit tracheostomie, která přináší také určitá rizika, nebo neinvazivní ventilace (Bach *et al.* 2007). Díky pokroku lékařské péče a zpřístupnění neinvazivní ventilace a gastrostomie od 90. let významně vzrostla průměrná doba dožití pacientů s SMA I. typu. Medián doby dožití u pacientů narozených mezi lety 1980–1994 byl 7,5 měsíce, zatímco u pacientů narozených od 1995–2006 vzrostl na 24 měsíců (Oskoui *et al.* 2007).

SMA I. typu lze rozdělit do třech podkategorií – 1. postižení se projeví ještě před porodem nebo těsně po něm, jedinec není schopný udržet hlavičku, 2. postižení se projeví do 2. měsíce věku, jedinec není schopný udržet hlavičku, 3. postižení se projeví později, jedinec je chopen udržet hlavičku – některé z těchto dětí jsou poté schopny sedět s oporou (Bertini *et al.* 2005).

Zhruba v jedné třetině případů dojde k odhalení nemoci již v prenatálním období. Projevuje se abnormálními sníženými pohyby plodu (Pearn *et Wilson* 1973). Zvláště u matek, které již mají zkušenost s prvním dítětem postiženým touto nemocí, se objevuje větší obezřetnost. Abnormality se mohou vyskytnout již ve 4. měsíci, kdy se začíná projevovat inhibice růstu axonů a Schwannových buněk motoneuronů (Chou *et Fakadej* 1971). U matek bez předchozích zkušeností často nedojde k včasnému rozpoznání příznaků.

### **3.2 Typ II – Intermediální forma**

SMA II. typu (MIM #253550) je méně závažná, postižený jedinec je schopen sám sedět, v některých případech i s pomocí stát, ojediněle i chodit. První příznaky se projevují mezi 7. a 18. měsícem věku. Obvykle se objevuje třes horních končetin a chybí šlachové reflexy. V závažnějších případech se může objevit kyfoskolióza a poruchy pohyblivosti kloubů. Ochabnutí žvýkacích svalů ztěžuje příjem potravy, problémy s polykáním se vyskytují zřídka. Často se objevují fascikulace (záškuby) jazyka. Projev této formy se velmi liší u konkrétních pacientů. Jedinci trpící SMA II. typu mají velmi slabé mezižeberní svaly, proto dýchají převážně bránicí. U nejvíce postižených jedinců se může objevit respirační selhání, kdy je nutno zavést mechanickou ventilaci. Chlapci jsou postihováni častěji a projevy jsou u nich závažnější. Častou příčinou smrti během

adolescence je respirační insuficience. Dle studie z roku 1996 se 98,5 % pacientů s SMA II. typu dožije 5 let a 68,5 % i 25 let (Zerres *et al.* 1997).

### 3.3 Typ III – Juvenilní forma

Lidé postiženi touto formou (MIM #253400) mají odlišné klinické projevy onemocnění, které se obvykle objeví po 18. měsíci věku. Dle toho můžeme dále pacienty rozdělit na pacienty s IIIa SMA – s projevy do tří let, a pacienty s IIIb SMA – s projevy po třetím roce věku. Mezi první příznaky patří špatná stabilita, problémová chůze do schodů a další projevy slabosti. Někdy může dojít ke ztrátě schopnosti chodit, což obvykle přichází s postupem nemoci. Délka života není vlivem SMA III. typu zkrácena (Zerres *et al.* 1997).

### 3.4 Typ IV – Adultní forma

Tento typ SMA (MIM#271150) se často ani neuvádí v klasickém třídění. Problémy se obvykle objeví až po 30. roce. Dle různě postižených částí těla lze dělit na distální a segmentální, kdy v prvním případě je rozšíření ochabování svalů symetrické, v druhém naopak. Pacienti nemají problémy s chůzí ani dýcháním. Nezkracuje věk dožití ani nijak výrazně nelimituje postižené. Je nejméně závažnou formou SMA.

U SMA IV. typu byla prokázána možnost genové konverze – což podporuje hypotézu, že genová konverze je často spojena s lehčím typem SMA. Konkrétně se jednalo o konverzi exonu 7, kdy exon 7 genu *SMN1* byl nahrazen exonem 7 genu *SMN2* (Mazzei *et al.* 2004).

## 4. Diagnostika

Typickými klinickými příznaky, jak je již uvedeno výše, jsou celková slabost a snížená hybnost jedince. Svalová slabost se liší dle typu SMA a je doprovázena fascikulacemi, samovolnými záškuby svalových vláken. Fascikulace se velmi zřídka objevují u primárních svalových onemocnění, u SMA svědčí o degeneraci buněk předních míšních rohů a objevují se ve svalech končetin a/nebo jazyka (Emery 1971). Stupeň celkového rozsahu závisí na typu SMA, u nejzávažnějších případů jsou dalšími klinickými příznaky: špatné dýchání a polykání, problémy s vykašláváním, slabá opora hlavy, atrofie a fascikulace jazyka a taktéž dýchání pomocí bránice. Intelektuální ani rozpoznávací schopnosti nejsou zasaženy.

### 4.1 Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostika je velmi důležitá, zejména u rodin s vysokým rizikem onemocnění. Díky ní totiž lze nemoc včas odhalit a zahájit opatření, jak nejdříve je to možné. Běžné metody jako RFLP a MLPA (Wang *et al.* 2009) odhalí sice počet *SMN1/SMN2*, nicméně nejsou schopny detekovat genovou konverzi. Existují i metody, které by byly schopné konverze odhalit, jako například kapilární elektroforéza, jsou ale dražší a komplikovanější (Kekou *et al.* 2015).

### 4.2 Molekulární diagnostika

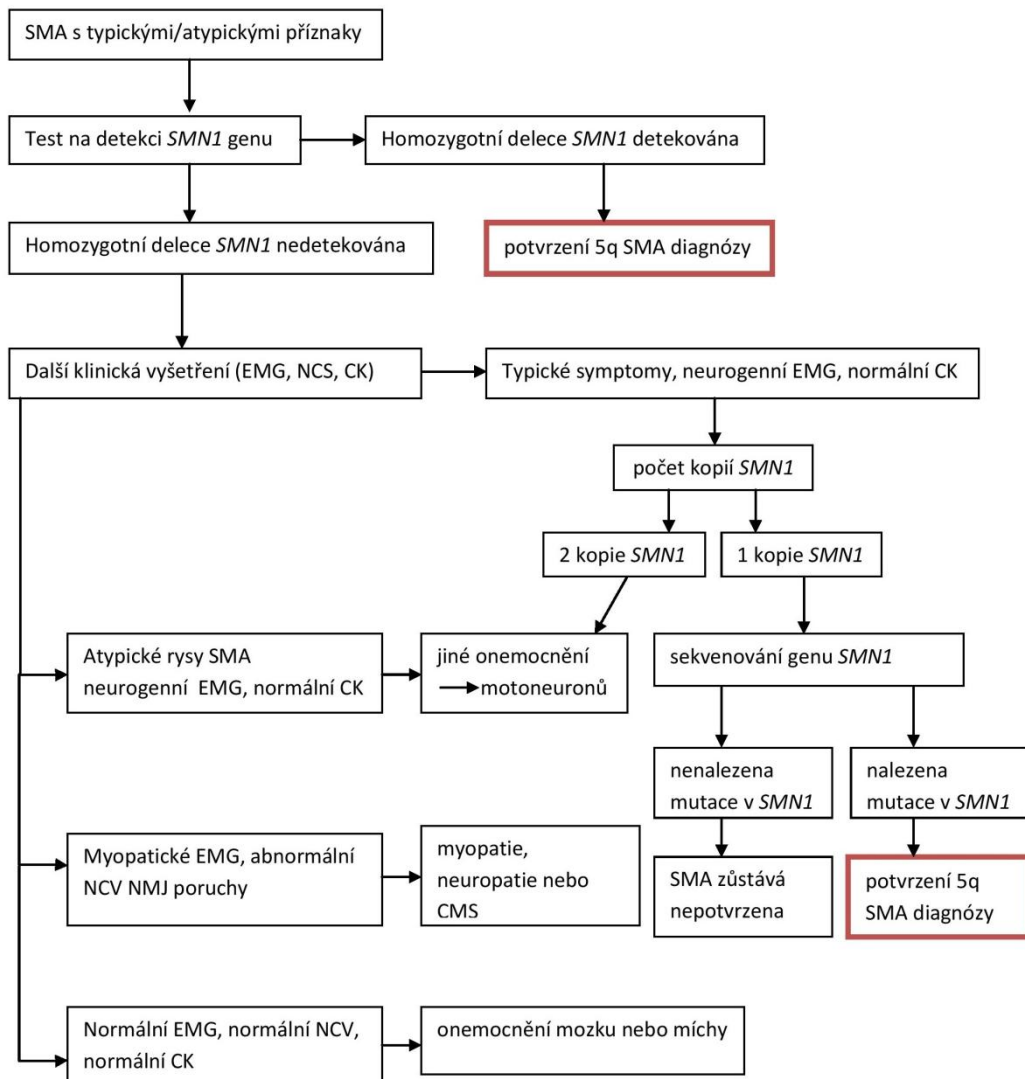
Molekulární diagnostika spočívá v odhalení nepřítomnosti exonu 7 a 8 genu *SMN1* pomocí analýzy PCR (Van der Staage *et al.* 1995). Rozdíl jedné báze mezi exony 7 genů *SMN1* a *SMN2* umožňuje snadno rozlišit tyto dva geny pomocí PCR. Restriční enzym DraI štěpí pouze PCR produkt *SMN2* exonu 7. Pokud tedy chybí nevyštěpený exon 7 genu *SMN1*, můžeme s jistotou potvrdit diagnózu SMA. Takto se nicméně nedají odhalit přenašeči SMA, protože analýza PCR není analýza kvantitativní a neodhalí tak heterozygotní delecii, kdy je přítomna jedna kopie genu *SMN1* (Prior 2007) (viz obr. 5).

### 4.3 Test na přenašečství

Rodiče postiženého jedince jsou přenašeči mutované alely genu, jen tímto způsobem se může s 25% pravděpodobností narodit dítě, které bude mít postižené obě kopie genu *SMN1* a s 50% pravděpodobností se narodí přenašeč SMA. Zbývajících 25 % připadá na pravděpodobnost narození zdravého jedince, kdy se sejdou dvě nemutované alely genu *SMN1*. Velmi vzácně může dojít k mutaci v průběhu tvorby vajíčka/spermie, potom stačí, aby byl přenašeč jen jeden z rodičů. Wirth *et al.* (1997) uvádí, že k novým mutacím – ke ztrátě telomerické varianty genu *SMN1* (resp. exonu 7 i 8) – dochází u 2 % případů. Z 340 rodin, kde se vyskytla SMA, odhalil 7 případů, kde u 4 z nich šlo o nerovnoměrný crossing-over a u ostatních došlo k intrachromozomální mutaci – delecí, konverzi. Pět z pacientů mělo SMA I. typu, jeden SMA II. typu a jeden SMA III. typu. Nerovnoměrné rekombinace způsobují rozsáhlejší delece, jsou tedy spojeny se závažnějšími fenotypovými projevy než intrachromozomální mutace.

McAndrew *et al.* (1997) popisuje kvantitativní PCR analýzu, která umožňuje detekovat počet kopií *SMN1* a *SMN2*. Tato umožňuje odhalit jedince s heterozygotní delecí v genu *SMN1* a to tak, že je přítomna pouze jedna kopie exonu 7 a 8 tohoto genu. Tato analýza využívá exonu z CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) jako standard k určení relativní dávky *SMN1* a *SMN2* a lze tak předejít zkreslení vzhledem ke kolísajícímu počtu *SMN2*, což umožňuje přesně rozlišit složené heterozygoty od případů, kdy SMA není závislá na chromozomu 5. Analýza normálních jedinců a přenašečů ukázala, že počet kopií *SMN1* a *SMN2* se pohybuje od žádné až po dvě na chromozom a že většina přenašečů nese jednu funkční kopii *SMN1* na neporušeném chromozomu.

V roce 2002 přichází Feldkötter *et al.* s novým, rychlým a vysoce spolehlivým testem na základě LightCycler real-time PCR, který amplifikuje *SMN1* nebo *SMN2*. Specificita testu je 100 %, senzitivita 96,2 %. Kvantitativní analýza počtu kopií genu *SMN2* u 375 pacientů s různým typem SMA ukázala významnou souvislost mezi počtem kopií *SMN2* a typem SMA. 80 % pacientů se SMA I. typu neslo jednu nebo dvě kopie *SMN2*, 82 % se SMA II. typu neslo tři kopie tohoto genu a 96 % pacientů se SMA III. typu mělo tři až čtyři kopie genu *SMN2*. Mezi 113 pacienty se SMA I. typu se 9 z nich s jednou kopií *SMN2* dožilo méně než 11 měsíců, 88 (z 94) se dvěma kopiemi *SMN2* se dožilo méně než 21 měsíců a 8 (z 10) se třemi kopiemi se dožilo od 33 do 66 měsíců. Na základě počtu kopií *SMN2* lze tedy vypočítat pravděpodobnost, zda se u pacienta s homozygotní delecí *SMN1* později vyskytne SMA I. typu, II. typu, nebo III. typu.



Obr. 5: Schéma algoritmu diagnostiky SMA (převzato a upraveno dle D'Amico *et al.* 2011)

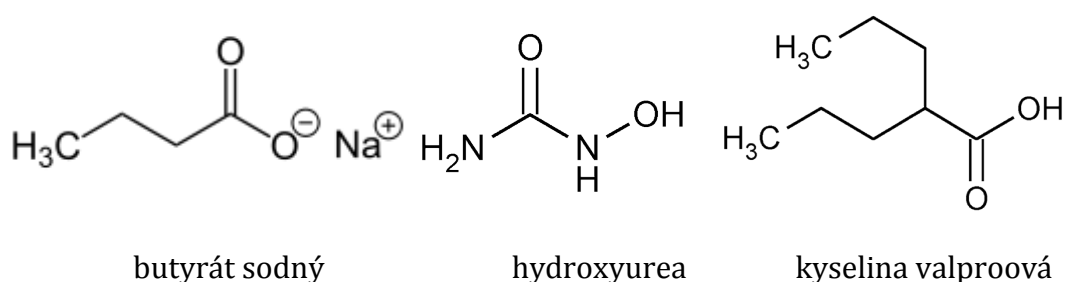


## 5. Možnosti léčby

Různé způsoby léčby jsou momentálně ve vývoji, nicméně úspěch léčení každého jedince závisí především na včasném odhalení diagnózy, aby došlo k co nejmenší ztrátě motoneuronů, která je nevratná.

### 5.1 Léčiva

Butyrát sodný zvyšuje množství nezkráceného transkriptu *SMN2* (neboli proteinu, který zahrnuje translatovaný exon 7) u pacientů se SMA, zvyšuje množství alternativního sestřihu. Butyrát sodný zvyšuje množství specifických SR proteinů, které hrají důležitou roli v procesu alternativního sestřihu (Chang *et al.* 2001). Taktéž hydroxyurea (hydroxymočovina) modifikuje expresi *SMN2* a zvyšuje tak množství proteinu SMN (Grzeschik *et al.* 2005). Mezi další léčivé látky patří kyselina valproová, která se používá například i k dlouhodobé léčbě epilepsie, u pacientů se SMA zvyšuje množství nezkráceného transkriptu *SMN2* dva až čtyřikrát (Brichta *et al.* 2003). Kyselina valproová patří mezi inhibitory histondeacetyláz, které, jak název vypovídá, brání deacetylaci histonů, což obecně vede k vyšší expresi genů, konkrétně u *SMN2* dochází k aktivaci promotoru genu a tím pádem ke zvýšení jeho transkripce (Harahap *et al.* 2011) (viz obr. 6).



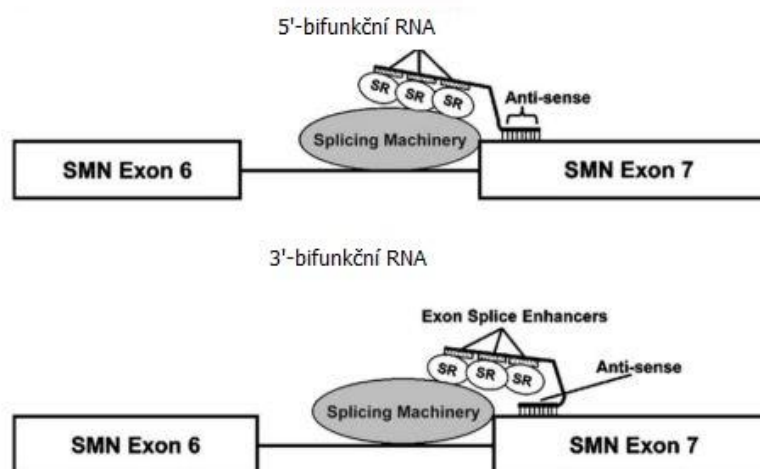
Obr. 6: Strukturní vzorce butyrátu sodného, hydroxyurey a kyseliny valproové

## 5.2 Regulace SMN

Vzhledem k tomu, že pacienti se SMA mají stále přítomných několik kopií genu *SMN2*, který kóduje malé množství plně funkčního proteinu SMN, skrývá se zde potenciál léčby. Stačí pouze upravit sestřih mRNA, aby nedocházelo k vyštěpení exonu 7, díky čemuž tak vznikne více stabilního SMN. Proto je toto jeden z cílů, kam směřuje vývoj metody léčby.

### 5.2.1 RNA regulace *SMN2*

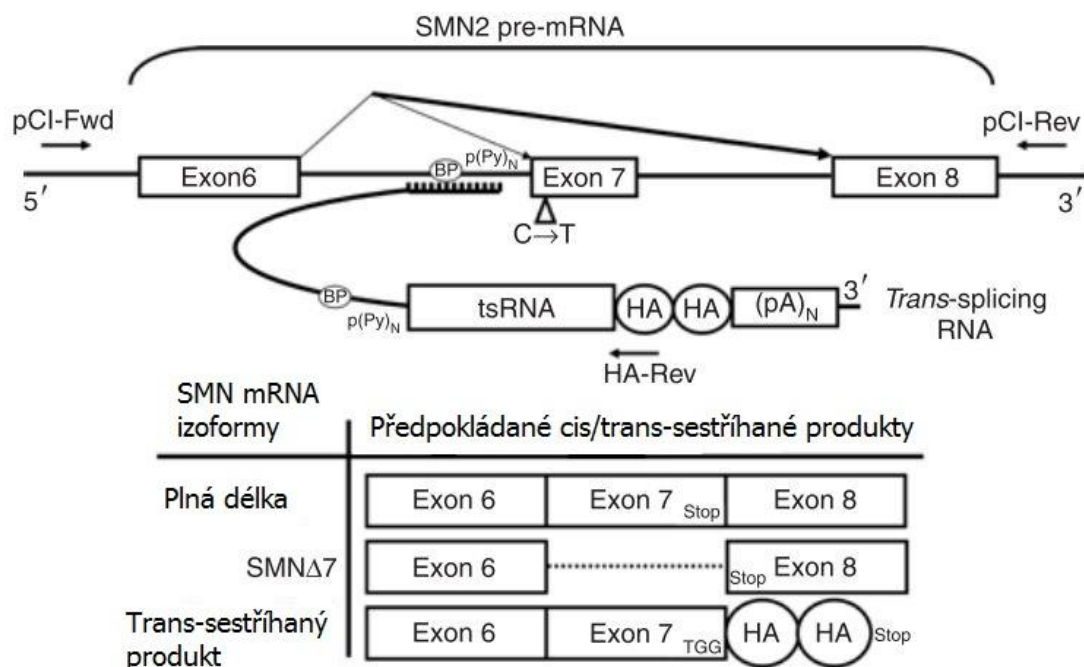
Sestřih transkriptu *SMN2* se dá modulovat pomocí tzv. bifunkčních RNA. Bifunkční proto, že mají dvě části – antisense RNA sekvenci specifickou pro cílový úsek RNA a RNA segment, který slouží jako vazebné místo pro sestřihové faktory. Tyto bifunkční RNA jsou do buňky dopraveny pomocí adeno-asociovaných virových vektorů. Bifunkční RNA „zajistí“ zahrnutí exonu 7 do přepisované mRNA a tím i plně funkční protein SMN (Baughan *et al.* 2006) (viz obr. 7).



Obr. 7: Schéma bifunkčních RNA. Obecně je složení 3' i 5' bifunkčních RNA podobné, až na změněnou orientaci ESE sekvencí – u 5' bifunkčních RNA jsou na 5' antisense oblasti a naopak (SR – SR proteiny) (převzato a upraveno z Baughan *et al.* 2006).

## 5.2.2 Trans-splicing RNA

Tato metoda léčby spočívá v dodání syntetické RNA do RNA vzniknuvší přepisem z *SMN2*. Dodávaná RNA se skládá ze tří částí – specifické vazebné domény, která se naváže na cílové místo, sestřihové domény, která reaguje s vybraným intronem a exonu (případně více exonů), které nahradí poškozený úsek genu. Takto trans-sestřihnutá chimerická mRNA je posléze translatována do funkčního proteinu (Coady *et al.* 2007) (viz obr. 8)



Obr. 8: Schéma trans-splicing. Trans-sestřihová RNA ( $tsRNA^{HA}$ ) se váže na pre-mRNA (exony 6-8) v oblasti intronu 6 díky komplementaritě párování bazí. Exon 7 SMN1 je obsažen v tsRNA společně s dvěma hemaglutininovými epitopy (HA) a polyadenylačním signálem (pA). Primery pro reverzní transkripci PCR jsou znázorněny šipkami. V dolní části obrázku jsou znázorněny různé podoby mRNA v závislosti na kombinaci primerů a možných sestřihů (Coady *et al.* 2007).

### 5.3 Kmenové buňky

Léčba pomocí kmenových buněk spočívá v nahrazení starých neuronů a podpoře růstu nových nervových buněk transplantací buněk kmenových. Kmenové buňky mohou být získány buď zráním buněk *in vitro*, nebo aktivací endogenních kmenových buněk v CNS.

V roce 2010 byla zveřejněna studie S. Corti *et al.*, která se zabývala problematikou kmenových buněk a SMA a testovala ji na myším modelu. Ve výsledcích studie uvádí, že transplantované pluripotentní (posléze nervové) kmenové buňky migrují do parenchymu a vytváří motorické neurony a poskytují ochranu neuronů. Myši se SMA s těmito buňkami pak vykazovali zlepšený fenotyp a vyšší fitness.

## 6. Závěr

Cílem práce bylo shrnout problematiku spinální svalové atrofie a poukázat na souvislost mezi genotypem a fenotypem jednotlivých typů tohoto onemocnění. SMA je závažné genetické onemocnění, které se může projevit v jakémkoli věku a v různém rozsahu. Je nejčastější geneticky podmíněnou nemocí vedoucí ke smrti u novorozenců.

Zcela určující roli při vzniku a rozvoji této choroby, stejně jako pro stupeň závažnosti klinických projevů, má množství nezkráceného a plně funkčního proteinu SMN v buňkách organismu. U absolutní většiny pacientů se SMA došlo k homozygotní ztrátě funkce genu *SMN1*, proto se množství funkčního proteinu SMN odvíjí od množství kopií genu *SMN2*. Alternativní sestřih transkriptu genu *SMN2* vede k tomu, že pouze menší podíl vznikajícího proteinu SMN je stabilní a plně funkční. Amplifikace *SMN2* ovšem může co do absolutního množství funkčního proteinu SMN tento jev kompenzovat. Pět kopií *SMN2* již plně nahradí ztrátu *SMN1*. Počet kopií *SMN2* tedy do značné míry určuje závažnost klinických projevů SMA a lze jej, ovšem v omezené míře, využít též v rámci diagnostiky a predikce vývoje onemocnění u konkrétního pacienta. Výsledný fenotyp ale ovlivňují i jiné faktory, zejména typ mutace v *SMN1*. Mírnější fenotypový projev a pozdější projev nemoci je často spojený s genovou konverzí.

Přestože gen podmiňující tuto chorobu byl objeven před dvaceti lety, stále ještě není známa metoda, která by vedla k vyléčení pacientů. Ve fázi vývoje je však již několik kandidátních léčebných postupů, které byly úspěšně otestovány na zvířecích modelech, a nyní probíhá jejich klinické testování. Stále se zdokonaluje symptomatická léčba, která zvyšuje věk dožití postižených a vede ke zkvalitnění jejich života.

## Seznam použité literatury:

- Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. 2015. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle & Nerve* 51:157–167.
- Bach JR, Saltstein K, Sinquee D, Weaver B, Komaroff E. 2007. Long-term survival in Werdnig-Hoffmann disease. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation* 86:339–345.
- Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M. 1997. Expression of the *SMN* gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Human Molecular Genetics* 6:1961–1971.
- Baughan T, Shababi M, Coady TH, Dickson AM, Tullis GE, Lorson CL. 2006. Stimulating Full-Length *SMN2* Expression by Delivering Bifunctional RNAs via a Viral Vector. *Molecular Therapy* 14:54–62.
- Bertini E, Burghes A, Bushby K, Estournet-Mathiaud B, Finkel RS, Hughes RAC, Iannaccone ST, Melki J, Mercuri E, Muntoni F, Voit T, Reitter B, Swoboda KJ, Tiziano D, Tizzano E, Topaloglu H, Wirth B, Zerres K. 2005. 134th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Treatment of Spinal Muscular Atrophy 11-13 February 2005 Naarden, the Netherlands. *Neuromuscular Disorders* 15:802–816.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubi FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B. 2003. Valproic acid increases the *SMN2* protein level: A well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 12:2481–2489.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ott J, Munsat TL, and Gilliam TC. 1990. Genetic Mapping of Chronic Childhood-Onset Spinal Muscular Atrophy to Chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344:540-541
- Bühler D, Raker V, Lührmann R, Fischer U. 1999. Essential role for the tudor domain of *SMN* in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 8:2351–2357.

- Bürglen L, Lefebvre S, Lermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. 1996. Structure and Organization of the Human Survival Motor Neurone (*SMN*) Gene. *Genomics* 32:479-482.
- Callebaut I, Mornon JP. 1997. The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochemical Journal* 321:125-132.
- Campbell L, Potter a, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. 1997. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *American Journal of Human Genetics* 61:40-50.
- Cartegni L, Krainer AR. 2002. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in *SMN2* causes spinal muscular atrophy in the absence of *SMN1*. *Nature Genetics* 30:377-384.
- Coady TH, Shababi M, Tullis GE, Lorson CL. 2007. Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs *SMN2* pre-mRNA splicing. *Molecular Therapy* 15:1471-1478.
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AHM. 1997. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 6:1205-1214.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. 2010. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain* 133:465-481.
- Crawford TO, Pardo CA. 1996. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiology of Disease* 3:97-110.
- Didonato CJ, Chen X, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. 1997. Cloning , Characterization , and Copy Number of the Murine Survival Motor Neuron Gene : Homolog of the Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Genome Research* 7:339-352.
- Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J. 1999. The promoters of the survival motor neuron gene (*SMN*) and its copy (*SMNc*) share common regulatory elements. *American Journal of Human Genetics* 64:1365-1370.

- Emery AEH. 1971. The nosology of the spinal muscular atrophies. *Journal of Medical Genetics* 8:481–495.
- Fan L, Simard LR. 2002. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Human Molecular Genetics* 11:1605–1614.
- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. 2002. 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. *American Journal of Human Genetics* 70:358–368.
- Gabanella F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L. 2005. The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Human Molecular Genetics* 14:3629–3642.
- Gavrilov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH. 1998. Differential *SMN2* expression associated with SMA severity. *Nature Genetics* 20:230–231.
- Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B. 1995. Survival Motor-Neuron Gene Transcript Analysis in Muscles from Spinal Muscular-Atrophy Patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 213:342–348.
- Gladman JT, Chandler DS. 2009. Intron 7 conserved sequence elements regulate the splicing of the *SMN* genes. *Human Genetics* 126:833–841.
- Grzeschik SM, Ganta M, Prior TW, Heavlin WD, Wang CH. 2005. Hydroxyurea enhances *SMN2* gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Annals of Neurology* 58:194–202.
- Hahnen E, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B. 1996. Hybrid Survival Motor Neuron Genes in Patients with Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy: New Insights into Molecular Mechanisms Responsible for the Disease. *American Journal of Human Genetics* 59:1057–1065.
- Hannus S, Bühler D, Romano M, Seraphin B, Fischer U. 2000. The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Human Molecular Genetics* 9:663–674.
- Harahap ISK, Saito T, San LP, Sasaki N, Gunadi, Nurputra DKP, Yusoff S, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Lee MJ, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. 2012. Valproic



acid increases *SMN2* expression and modulates SF2/ASF and hnRNPA1 expression in SMA fibroblast cell lines. *Brain and Development* 34:213–222.

<sup>1</sup>Hausmanowa-Petrusewicz I, Karwanska A. 1986. Electromyographic findings in different forms of infantile and juvenile proximal spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 9: 37–46.

Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. 2001. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9808–9813.

Chou SM, Fakadej AV. 1971. Ultrastructure of chromatolytic motoneurons and anterior spinal roots in a case of Werdnig-Hoffmann disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 30:368–379.

Jedrzejowska M, Borkowska J, Zimowski J, Kostera-Pruszczyk A, Milewski M, Jurek M, Sielska D, Kostyk E, Nyka W, Zaremba J, Hausmanowa-Petrusewicz I. 2008. Unaffected patients with a homozygous absence of the *SMN1* gene. *European Journal of Human Genetics* 16:930–934.

Jong YJ, Chang JG, Lin SP, Yang TY, Wang JC, Chang CP, Lee CC, Li H, Hsieh-Li HM, Tsai CH. 2000. Analysis of the mRNA transcripts of the survival motor neuron (*SMN*) gene in the tissue of an SMA fetus and the peripheral blood mononuclear cells of normals, carriers and SMA patients. *Journal of Neurological Sciences* 173:147–153.

Kashima T, Manley JL. 2003. A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics* 34:460–463.

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JI. 2007. hnRNP A1 functions with specificity in repression of *SMN2* exon 7 splicing. *Human Molecular Genetics* 16:3149–3159.

Kekou K, Sofocleous C, Konstantinidis G, Fryssira H, Mavrou A, Kitsiou S, Kanavakis E. 2015. SMA prenatal diagnosis: A modified protocol to help differentiation between deletions and gene conversion. *Molecular and Cellular Probes* 29:71–73

Le TT, Coovert DD, Monani UR, Morris GE, Burghes a H. 2000. The survival motor neuron (*SMN*) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics* 3:7–16.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Paslier D Le, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A,

---

<sup>1</sup> Publikace je citována sekundárně.

- Melki J. 1995. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell* 80:155–165.
- Lefebvre S, Burllet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. 1997. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genetics* 16:265–269.
- Liu Q, Dreyfuss G. 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *The EMBO Journal* 15:3555–3565.
- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. 1997. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90:1013–1021.
- Lorson CL, Androphy EJ. 1998. The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Human Molecular Genetics* 7:1269–1275.
- Lorson CL, Androphy EJ. 2000. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene *SMN*. *Human Molecular Genetics* 9:259–265.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. 1999. A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6307–6311.
- Markowitz JA, Tinkle MB, Fischbeck KH. 2004. Spinal Muscular Atrophy in the Neonate. *Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing* 33:12–20.
- Mazzei R, Gambardella A, Conforti FL, Magariello A, Patitucci A, Gabriele AL, Sprovieri T, Labate A, Valentino P, Bono F, Bonavita S, Zappia M, Muglia M, Quattrone A. 2004. Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy. *Acta Neurologica Scandinavica* 109:151–154.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes a H. 1997. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of *SMNT* and *SMNC* gene copy number. *American Journal of Human Genetics* 60:1411–1422.
- Meister G, Bühler D, Laggerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U. 2000. Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Human Molecular Genetics* 9:1977–1986.

- Mohaghegh P, Rodrigues NR, Owen N, Ponting CP, Le TT, Burghes AHM, Davies KE. 1999. Analysis of mutations in the tudor domain of the survival motor neuron protein SMN. *European Journal of Human Genetics* 7:519–525..
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AHM, McPherson JD. 1999. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Human Molecular Genetics* 8:1177–1183.
- Monani UR, McPherson JD, Burghes AHM. 1999. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (*SMN(C)* and *SMN(T)*). *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1445:330–336
- Morse R, Shaw DJ, Todd AG, Young PJ. 2007. Targeting of SMN to Cajal bodies is mediated by self-association. *Human Molecular Genetics* 16:2349–2358.
- Oskoui M, Levy G, Garland CJ, Gray JM, O'Hagen J, De Vivo DC, Kaufmann P. 2007. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology* 69:1931–1936.
- Pearn J. 1978. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *Journal of Medical Genetics* 15:409-413.
- Pearn JH, Wilson J. 1973. Acute Werdnig-Hoffmann disease: Acute infantile spinal muscular atrophy. *Archives of Disease in Childhood* 48:425–430.
- Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G. 1999. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11167–11172.
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. 1998. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95:615–624.
- 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. 2010. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A:1608–1616.
- Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ. 2004. Homozygous *SMN1* deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by *SMN2*. *American Journal of Medical Genetics* 130 A:307–310.
- Prior TW. 2007. Spinal muscular atrophy diagnostics. *Journal of Child Neurology* 22:952–956.

- Roberts DF, Chavez J, Court SDM. 1970. The Genetic Component in Child Mortality. *Archive of Disease in Childhood* 45:33–38.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. 2001. *SMN* gene duplication and the emergence of the *SMN2* gene occurred in distinct hominids: *SMN2* is unique to *Homo sapiens*. *Human Genetics* 108:255–266.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. 2003. *Smn*, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of Cell Biology* 163:801–812.
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M. 2001. *SMN* tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nature Structural Biology* 8:27–31.
- Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Chan YM, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng J, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, and Rubin EM. 2004. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* 431: 268-274
- Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka K V, Smith AG, Sendtner M. 1997. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9920–9925.
- Sossi V, Giuli a, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C. 2001. Premature termination mutations in exon 3 of the *SMN1* gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *European Journal of Human Genetics* 9:113–120.
- Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfes EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto B a. 2012. Pan-ethnic carrier screening and prenatal

- diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *European Journal of Human Genetics* 20:27–32
- Sun Y, Grimmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B. 2005. Molecular and functional analysis of intragenic *SMN1* mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Human Mutation* 25:64–71.
- Talbot K, Porting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE. 1997. 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? *Human Molecular Genetics* 6:497–500.
- Tizzano EF, Cabot C, Baiget M. 1998. Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *American Journal of Pathology* 153:355–361.
- Van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CHCM. 1995. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *The Lancet* 345:985–986.
- Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitzi AK, Kolb SJ, Wang J, Dreyfuss G. 2005. The Survival of Motor Neurons Protein Determines the Capacity for snRNP Assembly: Biochemical Deficiency in Spinal Muscular Atrophy. *Molecular and Cellular Biology* 25:5543–5551.
- Wang CC, Chang JG, Jong YJ, Wu SM. 2009. Universal multiplex PCR and CE for quantification of *SMN1/SMN2* genes in spinal muscular atrophy. *Electrophoresis* 30:1102–1110.
- Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A. 2007. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology* 22:1027–1049.
- Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Krawczak M, Müller-Myhsok B, Schönling J, Zerres K. 1997. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *American Journal of Human Genetics* 61:1102–1111.
- Wirth B. 2000. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation* 15:228–237.

Zapletalová E, Hedvičáková P, Kozák L, Vondráček P, Gaillyová R, Maříková T, Kalina Z, Jüttnerová V, Fajkus J, Fajkusová L. 2007. Analysis of point mutations in the *SMN1* gene in SMA patients bearing a single *SMN1* copy. *Neuromuscular Disorders* 17:476–481.

Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska a, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. 1997. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *Journal of the Neurological Sciences* 146:67–72.

[www.omim.org](http://www.omim.org)

### Seznam použitých ilustrací:

- Baughan T, Shababi M, Coady TH, Dickson AM, Tullis GE, Lorson CL. 2006. Stimulating Full-Length *SMN2* Expression by Delivering Bifunctional RNAs via a Viral Vector. *Molecular Therapy* 14:54–62.
- Brown WF. 1984. *The Physiological and Technical Basis of Electromyography*. Boston, Butterworth. 345.
- Coady TH, Shababi M, Tullis GE, Lorson CL. 2007. Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs *SMN2* pre-mRNA splicing. *Molecular Therapy* 15:1471–1478.
- D’Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. 2011. Spinal muscular atrophy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:71.
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M. 2001. SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nature Structural Biology* 8:27–31.
- Swoboda KJ. 2011. Of SMN in mice and men: A therapeutic opportunity. *Journal of Clinical Investigation* 121:2978–2981.
- [http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter\\_11%20Fall%202011.htm](http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter_11%20Fall%202011.htm)