

Spinal Muskuler Atrofili Olgularında Survival Motor Neuron Gen 1 (SMN1) Delesyon Sıklığı

PREVALANCE OF SURVIVAL MOTOR NEURON GENE 1 (SMN1) DELETIONS IN PATIENS WITH SPINAL MUSCULAR ATROPHY

Elçin BORA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Otozomal resesif bir nöromusküler hastalık olan Spinal Muskuler Atrofi, proksimal kaslarda ilerleyici tarzda güçsüzlük ve atrofi ile karakterizedir. Bu hastalık survival motor neuron gen 1 (SMN1)'in homozigot kaybı sonucu meydana gelir. Bu çalışmada SMN1 geninde bulunan ekzon 7 ve 8'deki delesyonların sıklığı araştırılmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada SMA ön tanılı 42 olguda SMN1 geninde bulunan delesyonlar moleküler genetik yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Fragmanların Uzunluk Polimorfizmleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Olguların 28'inde (%67) ekzon 7 ve 8'de delesyon saptanmıştır.

Sonuç: Çalışma grubunda ekzon 7 ve 8 için saptanan oran literatürdeki sonuçlardan daha düşük bulunmuştur. Bu farklılığın oluşumunda tanı kriterlerinin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Spinal muskuler atrofi, survival motor neuron gen 1

SUMMARY

Objective: Spinal muscular atrophy, an autosomal recessive neuromuscular disorder, characterized by progressive proximal manifestation of muscle weakness and atrophy. This disease occurs due to the homozygous loss of the survival motor neuron gene 1.

Material and method: In this study 42 cases with the diagnosis of SMA were analysed by PCR-RFLP for deletions of exon 7 and 8 located in SMN1 gene.

Results: Twenty eight cases had exon 7 and 8 deletions (67 %).

Conclusion: In the study group the determined ratios for exon 7 and 8 are lower than the reports in the literature. The occurs of this difference depends on diagnostic criterias.

Key words: Spinal muscular atrophy, survival motor neuron gene 1

Elçin BORA

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD
35340 İnciraltı, İZMİR
Tel: (232) 4123668
GSM: (505) 5250962
e-posta: elcin.bora@deu.edu.tr

Spinal Muskuler Atrofi (SMA), kalıtım modeli olarak; otozomal resesif, X'e bağlı resesif veya otozomal dominant geçişli olan kalıtsal nöromuskuler hastalıklar grubudur. SMA, spinal kord ön boynuz hücrelerinin ve beyin sapı motor nükleuslarının tutulduğu, hızlı ilerleyen, programlanmış hücre ölümü ile patolojisini açıklayabileceğimiz bir hastalıktır (1). Sonuçta vücutta istemli kasların simetrik kuvvetsizliği ve erimesi ile progressif güç kaybı, endüransta azalma, farklı vücut yapısı, mobilitede ve pulmoner fonksiyonlarda gerileme ortaya çıkar (2).

Kalıtım şekillerinden en sık görüleni; Otozomal resesif formudur ve proksimal SMA olarak adlandırılan bu grup 5q11,2-13,3 de haritalanmış Survival Motor Neuron (SMN) genin üzerindeki delesyonlar ile ortaya çıkar. İnsidansı 1/6000-1/10000 olup, genel popülasyonda bozuk gen taşıyıcı sıklığı 1/40 civarındadır. Hastalık bu oranları ile, pediatrik grup nöromusküler hastalıklardan olan Duchenne müsküler distrofiden sonra ikinci sıklıkta görülür. Ayrıca kistik fibrozisten sonra da ikinci sıklıkta fatal olması ile de önemlidir (1). Otozomal resesif formu % 95 sıklıkla görülür ve dört tipi vardır; SMA Tip I (Werdnig-

Hoffmann hastalığı), en erken görülen ve en ağır seyreden tiptir. Doğumda ya da ilk altı ay içinde görülebilir. Genellikle ilk 2 yıldan önce ölümler sonuçlanır. SMA Tip II (Subakut form), 18 aydan önce, genellikle 8 ay civarında başlar. Belirtiler tip I'e benzese de daha hafif ve yavaş gidişlidir. Çoğu hasta erişkin döneme ulaşabilir. SMA Tip III (Kugelberg-Welander hastalığı), 2 yaştan sonra başlar. Genellikle ilk belirti yürüme zorluğudur. En hafif tiptir. Bu hastalarda yaşam süresinde kısılma genellikle görülmez (3). Tip IV, yetişkin çağda başlar (4). Bu dört tipin tanıları arasındaki bulgular kesin olmadığı için 1992 de Uluslararası SMA Konsorsiyumu objektif verileri değerlendirerek kriterler belirlemiştir. Günümüzde hastalarda tanı bu kriterler ile konmaktadır (5).

SMN geninin telomerik (SMN1) ve sentromerik (SMN2) olarak iki kopyası bulunmaktadır. Hastaların % 98'inde SMN1 de delesyon saptanmaktadır (6,7). Bu iki kopya iki tek nükleotid ile farklılık gösterir. Biri ekzon 7'de aminoasit kompozisyonunu değiştirmez. Ekzon 8'deki ise çevrilmeyen ekzondur. Bu yüzden her iki gende benzer proteinler bulunur. SMA'lı hastaların %95'inden fazlasında telomerik kopyanın ekzon 7'si, delesyon veya gen dönüşümü ile bozulur (6,8,9). SMN, nükleer yapının içinde olan bir proteini kodlar ve RNA bağlanma proteini ile etkileşime girer. 38 kDa'lık SMN proteini telomerik ve sentromerik SMN genlerinden eksprese olur ve sitoplazma ve nükleusta bulunur. Gen ürünleri mRNA işlenmesinde gerekli proteinler olan küçük nükleer ribonükleazların sentezinde rol alırlar. Tüm vücutta; beyin, böbrek ve karaciğerde yüksek seviyede, iskelet ve kalp kasında orta seviyede, fibroblast ve lenfositlerde düşük seviyede eksprese olurlar. Ancak en önemli etkileri motor nöronlar üzerindedir. (10,11). Bu çalışmanın amacı SMA ön tanısı olan 42 hastada, SMN1 genindeki ekzon 7 ve 8 delesyon sıklığının araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

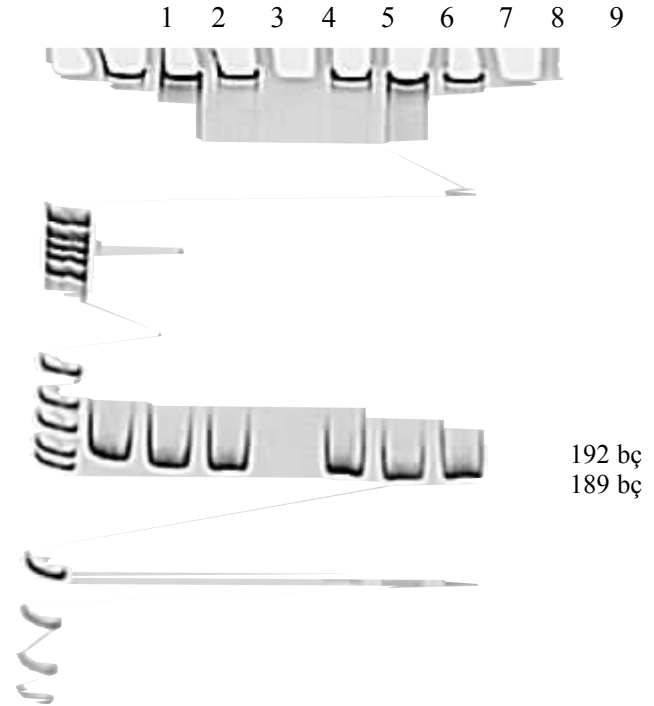
Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezine (DEGETAM) 1997 - 2007 yılları arasında farklı hastanelerin pediatrik nöroloji bilim dalları tarafından muayenesi yapılarak yönlendirilen, 0-2 yaş grubu SMA ön tanılı /tanılı olgular çalışmaya dahil edildi. İncelenen 42 olgunun kan örneklerinden tuzla çöktürme metodu ile DNA eldesi ve

elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır (12).

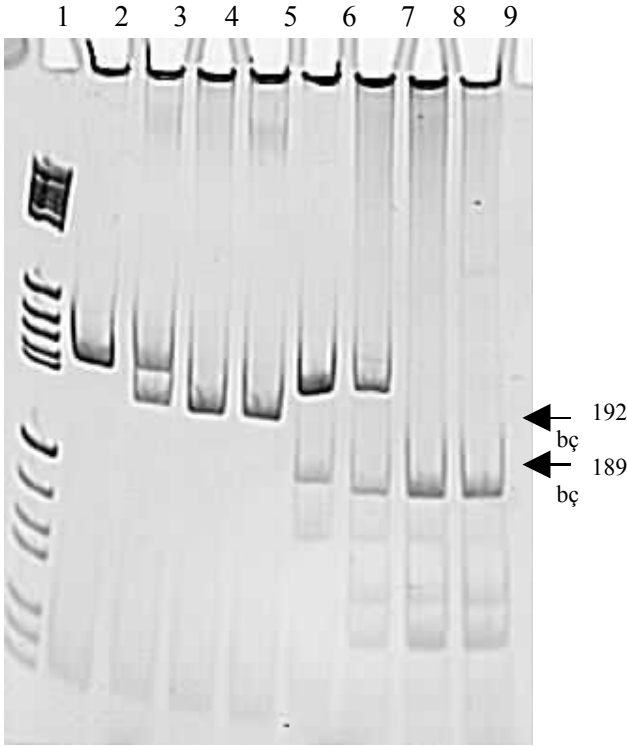
Amplifikasyonlar final konsantrasyonlar 50µl olacak şekilde hesaplanmıştır; her bir dNTP'den 200 µl, ekzon 7 ve ekzon 8 için (F/R) primerlerden 0,4µM, genomik DNA'dan 0.01 µg/ µl ve 2u Taq polimeraz. Amplifikasyon ürünleri %6 PAGE kullanılarak kontrol edildikten sonra RFLP işlemi için enzim kesimi yapılmıştır: 10 µl amplifiye olmuş DNA örneği ekzon 7 için 200 u Dral, ekzon 8 için 30 u Ddel enzimi ile 37 °C'de 90 dakika muamele edilerek kesim yapılmıştır (13). Kesim ürünleri %6 PAGE kullanılarak, sağlam ve hasta kontroller ve PCR kontrolle birlikte yüklenerek jelde yürütülmüş ve jel görüntüleme aletinde değerlendirmeye alınmıştır (14).

BULGULAR

42 SMA hastasında SMN1 geni ekzon 7 ve ekzon 8 delesyonları analiz edilmiştir (Şekil 1,2). Hastaların 28'inde ekzon 7 ve ekzon 8 delesyonları saptanmıştır.



Şekil 1. SMA olgularının amplifikasyon sonrası kontrol jeli: 1. sıra Marker V,2-4. (ekzon 7) ve 6-8. (ekzon 8) sıra amplifiye örnekler, 5. ve 9. sıra PCR kontrol



Şekil 2. Amplifiye olmuş ürünlerin kesim sonrası jel görüntüleri:

1. sıra Marker V, 2. sıra kesilmemiş ürün (ekzon 7), 3. sıra delesyon taşımayan kontrol DNA örneği, 4. sıra ekzon 7 delesyonu taşıyan DNA örneği, 5. sıra ekzon 7 delesyonu taşıyan olgu (ok), 6. sıra kesilmemiş ürün (ekzon 8), 7. sıra delesyonu taşımayan kontrol DNA örneği, 8. sıra ekzon 8 delesyonu taşıyan DNA örneği, 9. sıra ekzon 8 delesyonu taşıyan olgu (ok)

TARTIŞMA

SMA, SMN genindeki SMN1 (telomerik) ve SMN2 (sentromerik) olarak adlandırılan iki kopyada oluşan çeşitli mutasyonlar ile ortaya çıkar (15). Tüm olguların %93-98'i SMN1 mutasyonu ile ortaya çıkmaktadır. SMN2, SMN1'den sadece birkaç nükleotid dizisi ile farklıdır. Bu farklılık nedeniyle SMN2'den fonksiyonel olamayan kararsız protein sentezlenir. Bu nedenle SMN1 geni sağlam,

SMN2 mutasyonlu ise hastalık tablosu daha hafif, SMN1 mutasyonlu ancak SMN2 kopya sayısı fazla ise hastalık orta derecede şiddetli, SMN1 mutasyonlu ve SMN2 kopya sayısı az ise hastalık ciddi olarak ortaya çıkar (7,16). SMN1 mutasyonu saptanan SMA'lı hastaların her üç tipinde, 5q13'deki SMN1 geninde delesyon ve küçük intragenik mutasyonlar vardır. Saptanan hastalıklı allellerin %98'i ekzon 7 delesyonlarıdır ve %2'si de küçük intragenik mutasyonlardır (1).

Analizini yaptığımız 42 olguda %67 oranında (28/42) SMN1 geni ekzon 7 ve ekzon 8 de delesyon saptanmıştır. Önceden yapılmış çalışmalara bakıldığında farklı delesyon oranları bildirilmiştir. Fransa'da bu oran %99, Almanya'da %90 civarı iken bizim toplumumuzda %89-93 olarak bulunmuştur (8,17-20). Çalışmamızda bulunan oranın önceki çalışmalara göre daha düşük olması, klinik olarak SMA tanısının ayrıntılı incelemeden sonra konulmasının uygun olacağını düşündürmüştür. Olgu grubumuz yaş grubu açısından diğer çalışmalarla gösterilen olgular ile aynı olup, olgular bölümümüze yönlendirilirken klinik ön tanılarının elektrofizyolojik yöntemler ile değerlendirilip ön tanının desteklenmesinden sonra moleküler genetik yöntemlere başvurulması sonuçların daha yüksek oranlara ulaşmasını sağlayacaktır.

Uluslararası SMA Konsorsiyumu klinik olarak dört grup tanımlamıştır (21,22). Tip IV, erişkin formu olup genellikle 30 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Bizim olgu grubumuzda 0-2 yaş grubu incelendiği için Tip IV sınıflamaya dahil edilmemiştir. Delesyon saptanan olguların tümünde ekzon 7 ve ekzon 8 etkilenmiş bulundu. İncelemiş olduğumuz grubun 0-2 yaş aralığında olmasının olguların SMA Tip I veya Tip II tanısını desteklediğini düşündük. Delesyonlu olgularda ekzon 7 ve ekzon 8'in her ikisinde de de-lesyon saptanması SMA Tip I ön tanımını destekler niteliktedir.

NAIP geni, SMN1 geni ile aynı bölgede olup, uzun yıllar SMA hastalığında SMN geni ile birlikteliği düşünülmüştür. Ancak günümüzde NAIP gen delesyonunun SMA hastalığı için tek başına yeterli olmadığı bilindiğinden çalışmamızda NAIP genine bakılmamıştır.

SMA, tekrarlama riski %25 ve prenatal tanısı mümkün olan bir hastalık olması nedeni ile etkilenmiş bireylerin moleküler genetik tanısının konması önemlidir. Bu şekilde yeni hasta bireylerin doğması engellenebileceği gibi pre-implantasyon genetik tanı ile sağlıklı döllerin implantasyonu sağlanabilmektedir. Bu amaçla, delesyon saptanan tüm olguların ebeveynlerine kapsamlı genetik danışma verilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Talbot K. Progressive Spinal Muscular Atrophy. *J Inher Metab Dis* 1999;22: 545-554.
2. McDonald CM. Neuromuscular diseases. In: Molnar GE; Alexander MA. eds. *Pediatric Rehabilitation*, Philadelphia, Hanley & Belfus, 1999:289-330.
3. Strober JB, Tennekoon GI. Progressive muscular atrophies. *J Child Neurol* 1999;14: 691-695.
4. Wirth B, Brichta L, Schrank B, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 2006; 119: 422-428.
5. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forresy E, et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy: 569 patients. *J Neurol Sci* 1997; 146: 67-72.
6. Erdem H, Pehlivan S, Topaloglu H, et al. Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 1999; 21:86-89.
7. Dayangaç D, Erdem Yurter H. RNA "splicing" hataları sonucu ortaya çıkan kalıtsal hastalıklar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:9-12
8. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of spinal muscular atrophy determining gene. *Cell* 1995;80: 155-165.
9. Van der Steege G, Grootsholten PM, Van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995;345: 985-986.
10. Covert DD, Le TT, McAndrew PE, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Gen* 1997;6: 1205-1214.
11. Liu Q, Dreyfuss GA. A novel nuclear structure containing the survival motor neuron protein. *EMBO J* 1996;15: 3555- 3565.
12. Miller SA, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 28: 1215.
13. Van der Steege G, Grootsholten PM, Van der Vlies P, et al. PCR - based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995; 345: 985-986.
14. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook F. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; USA, 1983.
15. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet* 1990; 336:271-273.
16. Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 2002;30:377-384.
17. Christodoulou K, Kyriakides T, Hristova AH, et al. Mapping of distal form of spinal muscular atrophy with upper limb predominance to chromosome 7p. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1629-1632.
18. H.Erdem, S.Pehlivan, H.Topaloğlu, M.Özgüç. Deletion analysis in Turkish spinal muscular atrophy patients. *Brain and Development* 1999; 37: 167-170.
19. Morrison KE. Advances in SMA research: Review of gene deletions. *Neuromusc Disord* 1996; 6: 397-408.
20. Pehlivan S, Çankaya T, Özkınay F ve ark. Spinal musküler atrofi'de moleküler tanı: Ege bölgesinde bir referans merkezindeki uygulamalar. *Ege Tıp Dergisi* 2002;41: 7-10.
21. Munsat TL. Workshop report international SMA collaboration. *Neuromusc Disord* 1991; 1: 81.
22. Dubovvitz V. Chaos in classification of the spinal muscular atrophies in childhood. *Neuromusc Disord* 1991; 1: 77-78.