

DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-36-44



Исследование особенностей генетических изменений гена *SMN1* при спинальной мышечной атрофии 5q

А.В. Диль¹, В.Д. Назаров², Д.В. Сидоренко², С.В. Лапин², В.Л. Эмануэль²¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; Россия, 191015 Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41;²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8**Контакты:** Алена Владимировна Диль dil-alena@mail.ru

Введение. Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-CMA) представляет собой одно из наиболее распространенных нервно-мышечных заболеваний, в основе которого лежат аберрации гена *SMN1*. Несмотря на то, что в большинстве исследований говорят о «делеции» *SMN1* как о самой распространенной причине 5q-CMA, потеря гена связана как с классическими делециями, так и с конверсией *SMN1* и *SMN2*, а также с образованием химерных структур. На сегодняшний день недостаточно данных о распространенности того или иного типа потери *SMN1*. Однако разные виды мутаций могут оказывать различное влияние на клиническую картину и эффективность терапии. Более глубокое изучение строения генов позволит определить предикторы ответа на терапию и приблизиться к пониманию причин нестабильности региона SMN.

Цель исследования – изучить особенности генетических аберраций, а также количество копий генов *SMN1* и *SMN2* при 5q-CMA.

Материалы и методы. В исследовании приняло участие 703 пациента, для которых был проведен анализ количества копий *SMN1* и *SMN2* в Научно-методическом центре Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России за 2018–2021 гг. Анализ числа копий генов проводился методом мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA) с использованием набора SALSA MLPA P021 SMA (MRC Holland) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты. Среди 703 участников гомозиготная делеция *SMN1* обнаружена у 167 (24 %), носительство делеции – у 76 (11 %), у оставшихся 460 (65 %) аберраций не выявлено. Среди пациентов с гомозиготной делецией выявлен 41 случай (24 %) истинной делеции. Также выявлены 11 (7 %) случаев частичной делеции с гомозиготной потерей 7-го и гетерозиготной потерей 8-го экзона *SMN1*. Наиболее распространенным типом аберраций являлась конверсия *SMN1* в *SMN2* (94 (56 %) случая), которая характеризуется гомозиготной потерей *SMN1* и реципрокным увеличением числа копий *SMN2*. Кроме того, обнаружен 21 (13 %) случай формирования гибридных генов.

Выводы. Генетические аберрации при 5q-CMA на сегодняшний день изучены недостаточно. Тем не менее полученные нами результаты сопоставимы с имеющимися данными мировой литературы. Дальнейшее исследование особенностей изменений *SMN1* и *SMN2* позволит пролить свет на причины и механизмы развития данного заболевания, а также приблизиться к поиску наиболее эффективных точек приложения терапии.

Ключевые слова: спинальная мышечная атрофия, *SMN1*, *SMN2*, молекулярная диагностика, патогенетическая терапия, генная терапия

Для цитирования: Диль А.В., Назаров В.Д., Сидоренко Д.В. и др. Исследование особенностей генетических изменений гена *SMN1* при спинальной мышечной атрофии 5q. Нервно-мышечные болезни 2022;12(3):36–44. DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-36-44

Characteristics of genetic changes in the *SMN1* gene in spinal muscular atrophy 5q

A.V. Dil¹, V.D. Nazarov², D.V. Sidorenko², S.V. Lapin², V.L. Emanuel²¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia; 41 Kirochnaya St., Saint-Petersburg 191015, Russia;²I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 Lva Tolstogo St., Saint-Petersburg 197022, Russia

Contacts: Alena Vladimirovna Dil dil-alena@mail.ru

Background. Proximal spinal muscular atrophy 5q (5q-SMA) is one of the most common neuromuscular diseases, which is caused by mutations of the *SMN1* gene. Despite the fact that most studies consider *SMN1* "deletion" as the most common cause of 5q-SMA, gene loss is in fact associated with both classical deletions and conversions of *SMN1* and *SMN2*, as well as with formation of chimeric structures. Up to now, far too little attention has been paid to the prevalence of types of *SMN1* loss. However, different types of mutations can have different influence on the clinical findings and the effectiveness of therapy. A deeper study of the structure of these genes will allow us to determine the predictors of response to treatment and bring us closer to understanding the reasons for the instability of the *SMN* region.

Aim. To study genetic changes in the *SMN1* gene, as well as the number of copies of the *SMN1* and *SMN2* genes in 5q-SMA.

Materials and methods. The study involved 703 patients, for whom the analysis of the number of copies of *SMN1* and *SMN2* was performed in the center of molecular medicine of I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University for 2018–2021. Gene copy number analysis was performed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using the SALSA MLPA P021 SMA kit (MRC Holland).

Results. Among 703 participants, a homozygous *SMN1* deletion was found in 167 (24 %), 76 (11 %) were carriers of the deletion and no aberrations were found in the remaining 460 (65 %). Among patients with a homozygous deletion, 41 (24 %) cases of a true deletion were identified. Also, 11 (7 %) cases of partial deletion with a homozygous loss of the 7th exon and heterozygous of the 8th exon of *SMN1* were identified. The most common type of aberration was the conversion of *SMN1* to *SMN2* – 94 (56 %) cases, which is characterized by a homozygous loss of *SMN1* and a reciprocal increase in *SMN2* copies. In addition, 21 (13 %) cases of the formation of hybrid genes were found.

Conclusion. Types of genetic aberrations in 5q-SMA have not been studied enough yet. A search of the literature revealed very few studies which results are comparable with ours. However, further research of genetic changes in *SMN1* and *SMN2* might bring more clarity on the causes and mechanisms of this disease, and get us closer to finding the most effective method of treatment.

Keywords: spinal muscular atrophy, SMN1, SMN2, molecular diagnostics, pathogenetic therapy, gene therapy

For citation: Dil A.V., Nazarov V.D., Sidorenko D.V. et al. Characteristics of genetic changes in the *SMN1* gene in spinal muscular atrophy 5q. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2022;12(3):36–44. DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-36-44

Введение

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-SMA) представляет собой одно из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных нервно-мышечных заболеваний, обусловленное поражением моторных нейронов передних рогов спинного мозга и характеризующееся клинической картиной периферического паралича [1]. В основе патогенеза 5q-SMA лежат генетические aberrации гена *SMN1* (OMIM: 601 627), кодирующего белок выживаемости моторных нейронов. Распространенность болезни составляет 1 случай на 10 тыс. новорожденных, а носительство aberrаций оценивается как 1 случай на 40–60 человек [2].

Ген, ответственный за развитие 5q-SMA, находится в так называемом локусе спинальной мышечной атрофии, который расположен на длинном плече 5-й хромосомы и представляет собой инвертированную дупликацию, содержащую 4 функциональных гена (*SMN1*, *SERF1A*, *NAIP* и *GTF2H2A*). Каждый из них имеет центромерную копию, которая либо идентична «предковому» гену (*SERF1B*), либо отличается от него единичными нуклеотидами и является псевдогеном (*SMN2*, *NAIP15* и *GTF2H2B*). Такие особенности строения данного локуса обуславливают широкий спектр возможных генетических изменений гена выживаемости моторных нейронов. Наличие большого количества повторяющихся последовательностей нарушает генетическую стабильность данного региона и делает его предрасположенным к неравным рекомбинациям

между гомологичными участками, что приводит к таким явлениям, как делеции, дупликации и конверсии, а также обуславливает вариативное число копий расположенных в данном локусе генов [3, 4].

Гомологом активного гена *SMN1* является псевдоген *SMN2* (OMIM: 600354). Оба гена *SMN* имеют схожую структуру, кодируют белок выживаемости моторных нейронов и состоят из 9 экзонов: 1, 2a, 2b, 3–5, 6, 7–8. Стоит отметить, что в работе J. Seo и соавт. описан альтернативный транскрипт, содержащий экзон 6b, кодирующий более стабильную изоформу и, вероятно, перспективный в аспекте поиска точек приложения патогенетической терапии 5q-SMA [5]. Различие генов *SMN* обусловлено единственной значимой заменой цитозина на тимин в 7-м экзоне гена *SMN2* (с.850C>T), приводящей к разрыву сайта связывания с экзонным энхансером сплайсинга и образованию сайта связывания с экзонным сайленсером. Такие изменения приводят к альтернативному паттерну сплайсинга и пропуску 7-го экзона у 90 % транскриптов *SMN2*. В результате экспрессируемый белок SMNΔ7 является функционально неполноценным и быстро подвергается деградации убиквитин-протеасомной системой. Однако главным источником белка выживаемости моторных нейронов в норме является ген *SMN1*, в связи с чем мутации именно этого гена ответственны за развитие 5q-SMA, в то время как число копий гена *SMN2* служит модификатором течения заболевания. Несмотря на то, что в большинстве исследований говорят о «делеции» гена

SMN1 как о самой распространенной причине развития данного заболевания, потеря региона с геном *SMN1* связана как с классическими делециями, так и с конверсией генов *SMN1* и *SMN2*, а также с образованием химерных *SMN1/SMN2* структур. Для каждого из этих изменений существует свой механизм появления.

Классические гомозиготные делеции гена *SMN1* характеризуются потерей участка данного гена без реципрокного увеличения количества копий *SMN2*. При этом в большинстве случаев (около 80–90 %) делеции подвергается участок размером 6,3 т.п.н., включающий 7-й и 8-й экзоны *SMN1*. Однако при тяжелых формах 5q-СМА делеция может выходить за пределы *SMN1* и затрагивать соседствующие с ним гены *NAIP*, *GTF2H2A* и *SERF1A* [6, 7]. Также распространены частичные потери участка данного гена. Среди них встречаются изолированные делеции 7-го экзона размером 1,9 т.п.н., ограниченные фланкирующими его интронами (около 11 % случаев). Наиболее редки случаи 5q-СМА, обусловленные изолированной делецией 8-го экзона *SMN1* [8].

Причины, по которым данные участки являются наиболее частыми точками разрыва при делециях, до конца не ясны. Одной из них может служить наличие *Alu*-обусловленных перестановок в данном регионе. *Alu*-последовательности представляют собой короткие повторы размером около 300 нуклеотидов, состоящие из 2 схожих мономеров, разделенных полиадениловой последовательностью. Предполагаемым механизмом *Alu*-опосредованной делеции является негомологичное соединение концов при репарации двунитевых разрывов в ДНК. *Alu*-повторы формируют структуры по типу петли, включающие интронные и/или экзонные последовательности, подвергающиеся выпадению вследствие сближения 5'- и 3'-сайтов сплайсинга. В работе E.W. Ottesen и соавт. отмечено, что около 41 % человеческого гена *SMN*, включая промотер, содержат более 60 *Alu*-повторов. Однако наиболее обогащенными *Alu*-повторами областями являются 6-й и 7-й интроны генов *SMN*, в связи с чем наиболее часто делеции подвергается ограниченный ими участок [9, 10].

Другой причиной изолированной потери 7-го экзона гена *SMN1*, вероятно, может выступать антагонизм гетерогенного ядерного рибонуклеопротеида A1/A2 (гяРНП A1/A2) в отношении SF2/ASF-зависимой активности экзонного энхансера сплайсинга. Функция гяРНП A1/A2 заключается во взаимодействии с сайленсером сплайсинга и предотвращении встраивания 7-го экзона в мРНК. Протеин SF2/ASF, в свою очередь, привлекается экзонным энхансером сплайсинга, распознает 5'-сайт сплайсинга и способствует включению 7-го экзона в транскрипт. В результате антагонизма названных выше протеинов происходит исключение 7-го экзона из мРНК. Данный механизм потери 7-го экзона был впервые описан у гена *SMN2*. Однако сейчас известно, что он может лежать в основе делеции

данного экзона у обоих генов выживаемости моторных нейронов [11].

Чаще всего потеря гена *SMN1* обусловлена не истинной делецией, а конверсией *SMN1* в *SMN2*, которая осуществляется путем переноса последовательности гена *SMN1* в высокогомологичный участок псевдогена *SMN2* и сопровождается увеличением числа копий последнего. В большинстве работ конверсия описана как наиболее частая причина 5q-СМА наряду с делецией. Однако отдельно частота ее встречаемости не оценена и, вероятно, незаслуженно обделена вниманием в связи с тем, что любая потеря гена *SMN1* трактуется как его делеция. Тем не менее у большинства пациентов с 5q-СМА наблюдается реципрокное увеличение копийности *SMN2*, что свидетельствует об имеющей место конверсии и заниженной оценке ее частоты по сравнению с истинными делециями. В результате конверсии происходит потеря гена *SMN1*, а полученный ген *SMN2* занимает его позицию и оказывается примыкающим к функциональному гену *NAIP* вместо его типичной локализации, соседствующей с псевдогеном *NAIPΔ5*. Таким образом, на одной хромосоме в *cis*-позиции становятся расположенными 2 копии *SMN2*. Предполагаемым механизмом конверсии служит неравный кроссинговер в локусе *SMN* во время мейоза, в результате которого происходит образование сестринских кроссоверных хроматид, различающихся количеством заключенного в них генетического материала. В основе данного механизма лежит неправильное спаривание дуплицированных сегментов рекомбинирующих хроматид, приводящее к делеции сегмента на одной из хроматид и появлению его дубликации на другой [12].

Еще одной генетической абберацией, приводящей к 5q-СМА, является формирование химерных *SMN1/SMN2* структур, в которых имеются участки, принадлежащие как гену *SMN1*, так и псевдогену *SMN2*. Гибридные гены характеризуются гомозиготной делецией 7-го экзона гена *SMN1* и гетерозиготной делецией 8-го экзона, а также реципрокным увеличением числа копий данных экзонов в гене *SMN2*. Механизмом формирования гибридных генов *SMN1/SMN2*, вероятно, являются *Alu*-обусловленные неаллельные гомологичные рекомбинации в локусе *SMN*, внутривхромосомная делеция с последующим слиянием 5'-конца гена *SMN2* и 3'-конца *SMN1*, а также частичная конверсия *SMN1* в *SMN2*, при которой происходит слияние фланкирующих регионов 8-го экзона гена *SMN1* и 7-го экзона гена *SMN2*. В большинстве случаев частичная конверсия происходит благодаря каноничной замене с.840C>T в 7-м экзоне, создающей различия между генами *SMN1* и *SMN2* и приводящей к включению в транскрипт 7-го экзона. Конверсии в других участках происходят реже, однако в литературе описаны и конверсии в 8-м экзоне (с.1155G>A), а также в 6-м (с.835-44G>A) и 7-м интронах (с.888+100A>G и с.888+215A>G) [13]. Варианты комбинаций экзонов в гибридных генах крайне

разнообразны, что, вероятно, связано с конверсией, происходящей более 2 раз в одном регионе [14]. По данным литературы, гибридные гены встречаются также среди носителей и здоровых индивидов. Эти данные позволяют предположить, что возможна и «обратная» конверсия *SMN2* в *SMN1* [15].

Несмотря на разнообразие aberrаций, приводящих к 5q-СМА, на сегодняшний день недостаточно данных о распространенности того или иного типа потери гена *SMN1*. Однако разные виды мутаций данного гена, судя по всему, могут оказывать различное влияние на клиническую картину заболевания. К настоящему моменту в Российской Федерации зарегистрированы все доступные препараты патогенетической терапии 5q-СМА, что повышает возможность получения своевременного лечения. Тем не менее даже среди больных 5q-СМА, вовремя начавших лечение, имеются пациенты, не отвечающие на терапию. Не исключено, что именно тип генетических aberrаций может также влиять и на эффективность получаемой терапии. В связи с этим возникает необходимость определения не только факта потери гена *SMN1*, но и типа лежащей в его основе aberrации. К сожалению, недостаточно внимания уделяется описанию особенностей мутаций и строения генов при 5q-СМА, однако их более глубокое изучение, вероятно, позволит определить предикторы ответа на получаемую терапию, а также приблизиться к пониманию причин нестабильности региона SMN.

Целью данной работы является изучение особенностей генетических aberrаций, а также количества копий генов *SMN1* и *SMN2* при 5q-СМА.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 703 пациента, для которых был проведен анализ количества копий генов *SMN1* и *SMN2* в Научно-методическом центре Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России за 2018–2021 гг. От каждого пациента было получено информированное добровольное согласие. Критериями включения пациентов в исследуемую группу являлись:

- возраст от 0 до 65 лет;
- подозрение на 5q-СМА;
- дифференциальная диагностика болезни двигательных нейронов;
- семейный анамнез 5q-СМА;
- планирование семьи.

Анализ числа копий генов *SMN1* и *SMN2* проводился методом мультиплексной амплификации лигированных проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) с использованием набора SALSА MLPA P021 SMA (MRC Holland) в соответствии с инструкцией производителя.

В ходе работы была оценена распространенность 5q-СМА, а также носительство патогенных aberrаций среди группы обследованных участников. У положительных пациентов был проведен анализ типа aberrаций; описаны как делеции, так и конверсии, а также гибридные *SMN1/SMN2* структуры. Используемый набор SALSА MLPA P021 SMA (MRC Holland) позволяет установить различие в *SMN1* и *SMN2* только по 7-му и 8-му экзонам данных генов. По этой причине истинная делеция подтверждалась в случае потери 7–8-го экзона на обоих аллелях гена *SMN1*, которая не сопровождалась увеличением копийности данных экзона в гене *SMN2*. Частичная делеция подтверждалась в случае гомозиготной потери 7-го и сохранения 8-го экзона на одном из аллелей гена *SMN1*, также при наличии лишь 2 копий данных экзона в гене *SMN2*. Конверсией расценивалась утрата 7–8-го экзона на обоих аллелях гена *SMN1*, при которой наблюдалось реципрокное увеличение как минимум на 1 копию гена *SMN2*. Несмотря на то, что наличие 3 копий гена *SMN2* позволяет предположить оба механизма образования: делецию по одной аллели гена и конверсию по второй, структуры с данным паттерном были отнесены в группу конверсий (рис. 1).

Гибридная структура *SMN1/SMN2* была заподозрена в случае делеции 7-го экзона на обоих аллелях и сохранения 8-го экзона на одном из аллелей гена *SMN1*, а также при неравном соотношении данных экзона в гене *SMN2*. Носительство патологической aberrации выявлялось при делеции 7–8-го экзона только на одном аллеле гена *SMN1*.

Ограничением используемого количественного метода MLPA служит отсутствие определения нуклеотидной последовательности генов *SMN1* и *SMN2* для верификации принадлежности 7–8-го экзона тому или другому гену при формировании химерных *SMN1/SMN2* структур. Еще одним недостатком данного метода является невозможность выявления носительства делеции «2 + 0», при которой обе копии гена *SMN1* находятся в cis-позиции на одной хромосоме.

Результаты

Проведен анализ общей распространенности 5q-СМА, а также носительства гетерозиготных делеций среди 703 исследуемых участников: делеция 7-го экзона на обоих аллелях гена *SMN1* обнаружена у 167 (24 %) пациентов, носительство делеции по 1 аллелю – у 76 (11 %), у оставшихся 460 (65 %) пациентов патологических aberrаций не выявлено (рис. 2).

Среди 167 пациентов с гомозиготной потерей 7-го экзона выявлен 41 (24 %) случай истинной делеции 7–8-го экзона на обоих аллелях гена *SMN1* при наличии 2 копий гена *SMN2*. Также выявлены 11 (7 %) случаев частичной делеции, при которых имела место гомозиготная утрата 7-го экзона и делеция 8-го экзона только на 1 аллеле гена *SMN1*. Наиболее распространенным

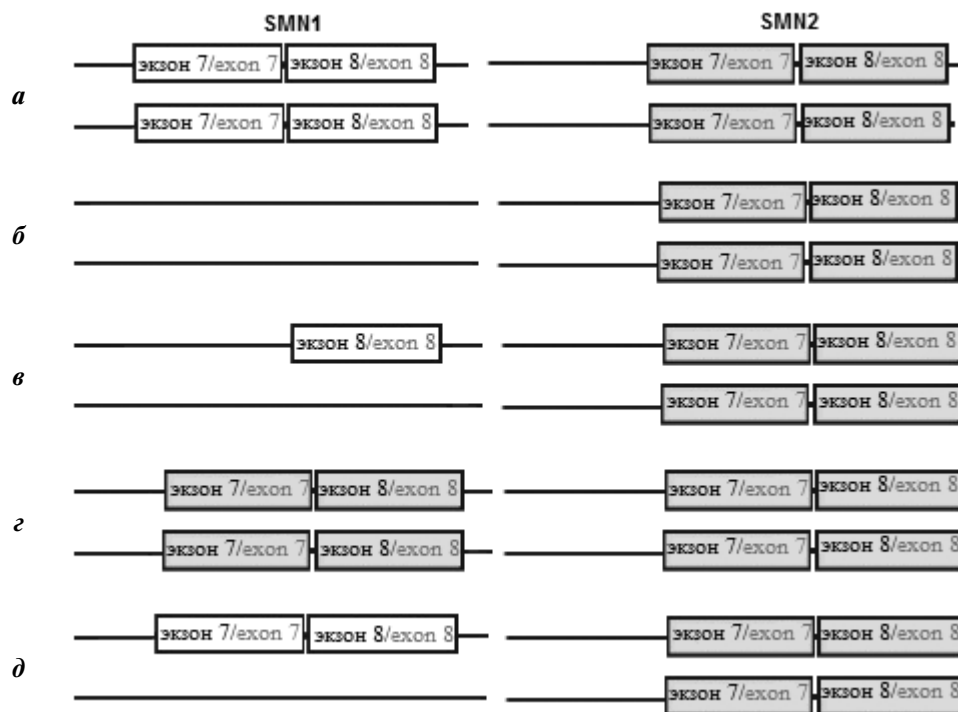


Рис. 1. Типы выявленных aberrаций: а – вариант нормы (SMN1: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии; SMN2: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии); б – истинная делеция SMN1 (SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 0 копий; SMN2: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии); в – частичная делеция SMN1 (SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии); г – вариант конверсии гена SMN1 в SMN2 (SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 0 копий; SMN2: 7-й экзон – 4 копии, 8-й экзон – 4 копии); д – носительство патологической aberrации (SMN1: 7-й экзон – 1 копия, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии)

Fig. 1. Types of identified aberrations: а – normal structure (SMN1: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies; SMN2: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies); б – true SMN1 deletion (SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 0 copies; SMN2: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies); в – partial SMN1 deletion (SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies); г – conversion of SMN1 to SMN2 (SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 0 copies; SMN2: exon 7 – 4 copies, exon 8 – 4 copies); д – carriers of the deletion (SMN1: exon 7 – 1 copy, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies)

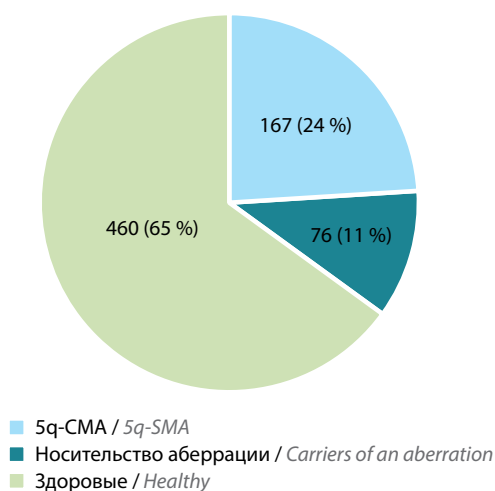


Рис. 2. Распространенность спинальной мышечной атрофии 5q (5q-SMA)

Fig. 2. Prevalence of 5q spinal muscular atrophy (5q-SMA)

типом aberrаций в исследованной группе пациентов являлась конверсия гена SMN1 в SMN2, на которую пришлось 94 (56 %) случая и которая характеризуется

потерей 7–8-го экзонов на 2 аллелях гена SMN1, а также сопровождается реципрокным увеличением числа копий гена SMN2 до 3 и более. При этом максимальное число выявленных копий гена SMN2 составило 4 копии. Кроме того, в 21 (13 %) случае заподозрено формирование гибридных структур SMN1/SMN2.

Среди предполагаемых гибридных SMN1/SMN2 структур выявлено 4 варианта комбинаций экзонов в генах SMN1 и SMN2 (рис. 3, 4).

Структуры с различным соотношением 7–8-го экзонов в генах SMN были обнаружены не только у пациентов с подтвержденной 5q-CMA, но и среди носителей патологической aberrации (8 человек), а также среди здоровых лиц (2 человека). У последних 2 человек имела место дупликация SMN1, а количественное соотношение экзонов было следующим: SMN1: 7-й – 3, 8-й – 2; SMN2: 7-й – 1, 8-й – 2. Вероятно, полученная MLPA-картина также может быть расценена как гибридная SMN1/SMN2 структура. Кроме того, интерес представляют выявленные дупликации гена SMN1, которые в целом обнаружены в 12 (2 %) случаях среди 460 здоровых лиц.

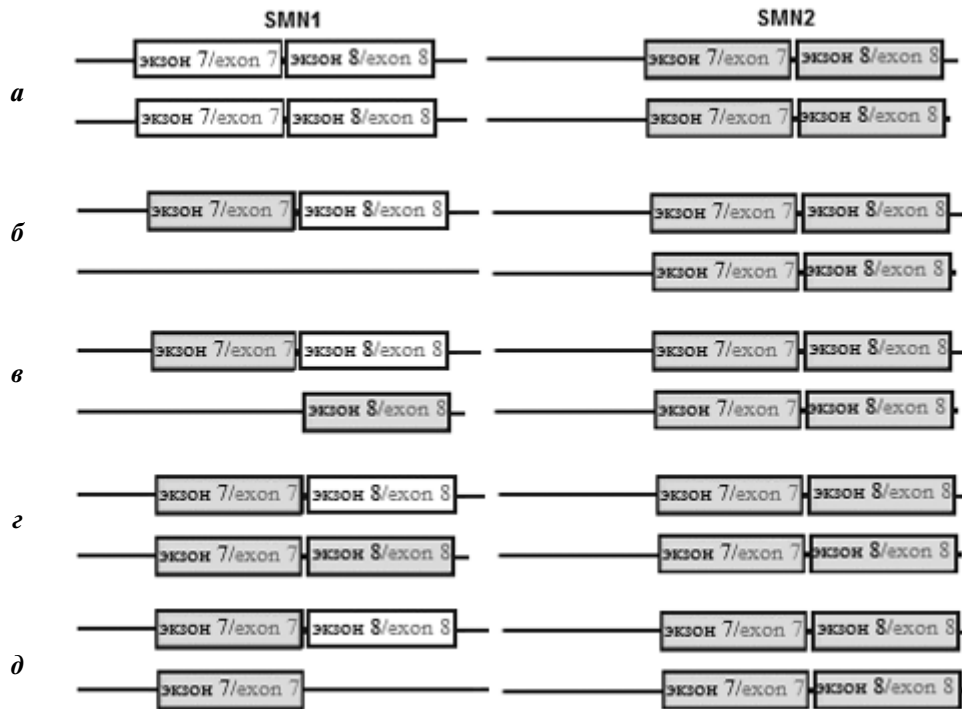


Рис. 3. Варианты гибридных SMN1/SMN2 структур: а – вариант нормы (SMN1: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии; SMN2: 7-й экзон – 2 копии, 8-й экзон – 2 копии); б – SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 3 копии, 8-й экзон – 2 копии (n = 16); в – SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 3 копии, 8-й экзон – 3 копии (n = 2); г – SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 4 копии, 8-й экзон – 3 копии (n = 1); д – SMN1: 7-й экзон – 0 копий, 8-й экзон – 1 копия; SMN2: 7-й экзон – 4 копии, 8-й экзон – 2 копии (n = 2)

Fig. 3. Types of hybrid SMN1/SMN2 structures: а – normal structure (SMN1: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies; SMN2: exon 7 – 2 copies, exon 8 – 2 copies); б – SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 3 copies, exon 8 – 2 copies (n = 16); в – SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 3 copies, exon 8 – 3 copies (n = 2); г – SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 4 copies, exon 8 – 3 copies (n = 1); д – SMN1: exon 7 – 0 copies, exon 8 – 1 copy; SMN2: exon 7 – 4 copies, exon 8 – 2 copies (n = 2)

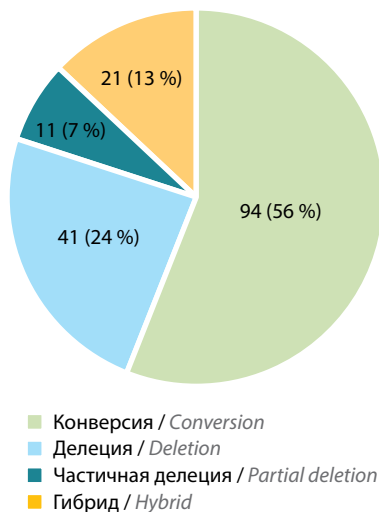


Рис. 4. Типы аберраций при спинальной мышечной атрофии 5q (5q-SMA)
Fig. 4. Types of aberrations in 5q spinal muscular atrophy (5q-SMA)

Обсуждение

Несмотря на то, что общепризнанной причиной развития 5q-SMA является «делеция» гена *SMN1*, потеря

региона с данным геном может быть обусловлена как классическими делециями, так и конверсией гена *SMN1* в *SMN2*, а также образованием гибридных *SMN1/SMN2* структур. Однако на сегодняшний день еще не накоплено достаточно данных о распространенности того или иного типа потери гена *SMN1*, а также о его влиянии на клиническую картину заболевания и возможный ответ на терапию. В связи с регистрацией в Российской Федерации всех имеющихся в настоящее время вариантов патогенетической терапии необходимость развития персонализированного подхода в лечении 5q-SMA становится неоспоримой. Более глубокое изучение особенностей мутаций и строения генов при 5q-SMA, вероятно, позволит определить предикторы ответа на лечение и увеличить выживаемость больных.

Среди 703 обследованных нами пациентов 5q-SMA обнаружена у 167 (24 %). При этом истинная гомозиготная делеция 7-го и 8-го экзонов *SMN1* выявлена у 41 пациента с 5q-SMA, что составляет 24 % случаев. Несмотря на то, что количество исследований, в которых отдельно оценена распространенность делеций и конверсий при данном заболевании, весьма ограничено, все же имеются данные, сопоставимые с полученными нами

результатами, согласно которым распространенность истинных гомозиготных делеций 7-го и 8-го экзонов также составляет порядка лишь 20 % случаев [16]. Наиболее частой причиной потери гена *SMN1* у обследованных нами пациентов являлась конверсия гена *SMN1* в *SMN2* (выявлена в 56 % случаев 5q-СМА), которая характеризуется гомозиготной делецией 7-го и 8-го экзона *SMN1*, а также реципрокным увеличением количества копий гена *SMN2* при проведении исследования методом MLPA. Полученные данные сопоставимы с результатами других исследователей, согласно которым на долю конверсии приходится 62 % случаев 5q-СМА. В этих исследованиях конверсия подтверждалась путем секвенирования генов *SMN1* и *SMN2*. Целью нашей работы не ставилось определение нуклеотидной последовательности генов выживаемости моторных нейронов, однако вероятность того, что обнаруженное реципрокное увеличение копийности *SMN2* является следствием конверсии гена *SMN1*, представляется крайне высокой.

Нередко в основе заболевания в исследуемой группе лежало образование гибридных генов *SMN1/SMN2* (обнаружено у 13 % пациентов), в которых имеются участки, принадлежащие как гену *SMN1*, так и псевдогену *SMN2*. Распространенность гибридных генов при 5q-СМА, по данным литературы, варьирует от 5 до 30 % в разных этнических группах. При этом среди химерных *SMN1/SMN2* структур описано несколько генотипов в пределах одной популяции. В исследовании Y. Kubo и соавт. выделены 3 группы гибридных генов на основе обнаруженных ими точечных мутаций при секвенировании. Также в упомянутой выше работе гибридные гены были исследованы методом MLPA. При этом наиболее распространенным гибридом являлся ген со следующей MLPA-картиной: *SMN1* – 0 копий 7-го экзона, 1 копия 8-го; *SMN2* – 3 копии 7-го экзона, 2 копии 8-го [17]. Идентичное соотношение 7–8-го экзонов в генах *SMN* при исследовании методом MLPA обнаружено среди исследуемых нами пациентов и также составило наиболее распространенную группу (16 из 21 пациента). Несмотря на то, что в ходе нашего исследования не проводилось определение нуклеотидной последовательности генов *SMN*, без которого невозможно достоверно установить факт формирования гибридных генов, исследование методом MLPA позволяет, по крайней мере, заподозрить гибридные структуры. Более того, имеются работы, в которых первоначально обнаруженное неравное соотношение экзонов при исследовании методом MLPA в последующем было верифицировано как гибридная структура с помощью секвенирования по Сэнгеру [18]. Схожим образом, обнаруженные нами среди обследованных пациентов и не описанные ранее в литературе структуры (варианты, обозначенные как В и D) с высокой степенью вероятности являются гибридными.

Влияние гибридных структур на клиническую картину заболевания до конца не ясно, однако имеются

работы, согласно которым 5q-СМА, обусловленная формированием гибридных генов *SMN1/SMN2*, характеризуется более легким фенотипом по сравнению со случаями, в основе которых лежала истинная делеция. Имеются предположения, что данный феномен связан с тем, что гибридные гены продуцируют одинаковое с нормальным геном *SMN2* количество белка и являются функционально равнозначными ему. Влияние химерных генов на эффективность препаратов патогенетической терапии также остается неизвестным, что создает необходимость проведения дальнейших исследований с целью накопления клинических данных. Предположительно гибридные структуры в исследуемой нами группе встречались и среди здоровых лиц, а также среди носителей гетерозиготных делеций, что находит отражение в данных мировой литературы [15, 19] и позволяет заподозрить в данных случаях наличие «обратной» конверсии *SMN2* в *SMN1*, что только подтверждает сложность строения региона SMN и выявляет необходимость его дальнейшего исследования.

Самой редкой причиной 5q-СМА в обследованной группе пациентов являлась частичная делеция с изолированной потерей 7-го экзона гена *SMN1* и сохранением 8-го экзона на одном из аллелей (7 % случаев). Полученные результаты сопоставимы с данными других исследователей, согласно которым частичные делеции являются наиболее редкой причиной 5q-СМА и характеризуются распространенностью до 11 % [20]. Данных о влиянии частичных делеций на фенотип заболевания на сегодняшний день крайне мало.

Кроме того, интерес представляют выявленные 3 копии гена *SMN1* у 12 (2 %) здоровых лиц из обследованной нами группы. Известно, что дубликации данного гена не могут быть непосредственной причиной 5q-СМА, однако стоит отметить, что, согласно результатам метаанализа, увеличение копийности гена *SMN1* считается ассоциированным со случаями спорадического бокового амиотрофического склероза [21, 22]. Механизмы развития заболевания в данном случае до конца не ясны: считается, что сами дубликации *SMN1* являются функциональным полиморфизмом, не приводящим к развитию какой-либо патологии, а избыточная продукция белка SMN не обладает токсичностью. Однако имеются предположения, что повышенная экспрессия белка выживаемости мотонейронов в совокупности с другими генетическими мутациями и воздействием факторов окружающей среды может увеличивать риск развития данной формы болезни двигательного нейрона. Также объяснением могут служить не ассоциированные с белком SMN абберации, такие как дубликации других генов локуса. В частности, дубликации гена *NAIP* могут являться одной из причин развития заболевания. Однако результаты молекулярно-генетического исследования в таких случаях необходимо интерпретировать только в совокупности с клинической картиной и принимать

во внимание лишь при имеющихся признаках поражения двигательного нейрона.

Выводы

Генетические aberrации при 5q-СМА крайне разнообразны и на сегодняшний день изучены недостаточно,

однако дальнейшее исследование особенностей изменений генов *SMN1* и *SMN2*, а также других предполагаемых модификаторов 5q-СМА, вероятно, позволит пролить свет на причины и механизмы развития данного заболевания и приблизиться к поиску наиболее эффективных точек приложения терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tisdale S., Pellizzoni L. Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *J Neurosci* 2015;35(23):8691–700. DOI: 10.1523/jneurosci.0417-15.2015
2. Lally C., Jones C., Farwell W. et al. Indirect estimation of the prevalence of spinal muscular atrophy type I, II, and III in the United States. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12(1). DOI: 10.1186/s13023-017-0724-z
3. Butchbach M.E.R. Genomic variability in the survival motor neuron genes (*SMN1* and *SMN2*): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *Int J Mol Sci* 2021;22(15):7896–917. DOI: 10.3390/ijms22157896
4. Ruhno C., McGovern V.L., Avenarius M.R. et al. Complete sequencing of the *SMN2* gene in SMA patients detects *SMN* gene deletion junctions and variants in *SMN2* that modify the SMA phenotype. *Hum Genet* 2019;138(3):241–56. DOI: 10.1007/s00439-019-01983-0
5. Seo J., Singh N.N., Ottesen E.W. et al. A novel human-specific splice isoform alters the critical C-terminus of Survival Motor Neuron protein. *Sci Rep* 2016;6(1). DOI: 10.1038/srep30778
6. Lefebvre S., Bürglen L., Reboullet S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80(1):155–65. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90460-3
7. Wirth B., Karakaya M., Kye M.J. et al. Twenty-five years of spinal muscular atrophy research: from phenotype to genotype to therapy, and what comes next. *Ann Rev Genom Hum Genet* 2020;21(1). DOI: 10.1146/annurev-genom-102319-103602
8. Gambardella A., Mazzei R., Toscano A. et al. Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neurol* 1998;44(5):836–9. DOI: 10.1002/ana.410440522
9. Ottesen E.W., Seo J., Singh N.N. et al. A multilayered control of the human survival motor neuron gene expression by Alu elements. *Front Microbiol* 2017;8:2252. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02252
10. Jedličková I., Přistoupilová A., Nosková L. et al. Spinal muscular atrophy caused by a novel Alu-mediated deletion of exons 2a-5 in *SMN1* undetectable with routine genetic testing. *Mol Genet Genomic Med* 2020. DOI: 10.1002/mgg3.1238
11. Singh R.N., Singh N.N. Mechanism of splicing regulation of spinal muscular atrophy genes. *Adv Neurobiol* 2018;20:31–61. DOI: 10.1007/978-3-319-89689-2_2
12. Mercer J.M. Unequal crossing over. *Ref Mod Life Sci* 2017. DOI: 10.1016/b978-0-12-809633-8.07324-6
13. Stabley D.L., Holbrook J., Scavina M. et al. Detection of *SMN1* to *SMN2* gene conversion events and partial *SMN1* gene deletions using array digital PCR. *Neurogenetics* 2021;22(1):53–64. DOI: 10.1007/s10048-020-00630-5
14. Hahnen E., Schönling J., Rudnik-Schöneborn S. et al. Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 1996;59(5):1057–65.
15. Ogino S., Gao S., Leonard D.G. et al. Inverse correlation between *SMN1* and *SMN2* copy numbers: evidence for gene conversion from *SMN2* to *SMN1*. *Eur J Hum Genet* 2003;11(3):275–7. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200957
16. Qu Y., Bai J., Cao Y. et al. Mutation spectrum of the survival of motor neuron 1 and functional analysis of variants in Chinese spinal muscular atrophy. *J Molec Diagnostics* 2016;18(5):741–52. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.05.004
17. Kubo Y., Nishio H., Saito K. A new method for *SMN1* and hybrid *SMN* gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet* 2015;60:233–9. DOI: 10.1038/jhg.2015.16
18. Wadman R.I., Jansen M.D., Stam M. et al. Intragenic and structural variation in the *SMN* locus and clinical variability in spinal muscular atrophy. *Brain Communications* 2020;2(2):1–13. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa075
19. Niba E.T.E., Nishio H., Wijaya Y.O.S. et al. Clinical phenotypes of spinal muscular atrophy patients with hybrid *SMN* gene. *Brain Develop* 2020. DOI: 10.1016/j.braindev.2020.09.005
20. Fang P., Li L., Zeng J. et al. Molecular characterization and copy number of *SMN1*, *SMN2* and *NAIP* in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *BMC Musculoskel Disord* 2015;16(1). DOI: 10.1186/s12891-015-0457-x
21. Wang X.B., Cui N.H., Gao J.J. et al. *SMN1* duplications contribute to sporadic amyotrophic lateral sclerosis susceptibility: Evidence from a meta-analysis. *J Neurol Sci* 2014;340(1–2):63–8. DOI: 10.1016/j.jns.2014.02.026
22. Darras B.T. More can be less: *SMN1* gene duplications are associated with sporadic ALS. *Neurology* 2012;78(11):770, 771. DOI: 10.1212/wnl.0b013e318249f754

Вклад авторов

А.В. Диль: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
В.Д. Назаров, Д.В. Сидоренко: получение данных для анализа, анализ полученных данных, редактирование текста рукописи;
С.В. Лапин, В.Л. Эмануэль: научное руководство, окончательное утверждение версии статьи.

Authors' contributions

A.V. Dil: analysis and interpretation of data, literature review, writing the text of the article;
V.D. Nazarov, D.V. Sidorenko: collection, analysis and interpretation of data, editing the article;
S.V. Lapin, V.L. Emanuel: scientific guidance, final approval of the version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Диль / A.V. Dil: <https://orcid.org/0000-0002-3708-3378>

В.Д. Назаров / V.D. Nazarov: <https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

Д.В. Сидоренко / D.V. Sidorenko: <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>

С.В. Лапин / S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

В.Л. Эмануэль / V.L. Emanuel: <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed an informed consent to participate in the study.