

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/372131008>

# Detection of SMN1 loss with PCR-based screening test

Article · June 2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.025

CITATIONS

0

READS

32

9 authors, including:



V. D. Nazarov

First Pavlov State Medical University Of St Petersburg

71 PUBLICATIONS 351 CITATIONS

SEE PROFILE



Sergey V Lapin

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

245 PUBLICATIONS 1,108 CITATIONS

SEE PROFILE



Darya Sidorenko

First Pavlov State Medical University Of St Petersburg

9 PUBLICATIONS 6 CITATIONS

SEE PROFILE

ДЕТЕКЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ПОТЕРИ ГЕНА *SMN1* С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПЦР-РВ

В. Д. Назаров<sup>1</sup>, К. К. Черebilло<sup>1</sup>✉, С. В. Лапин<sup>1</sup>, Д. В. Сидоренко<sup>1</sup>, Е. А. Девяткина<sup>1</sup>, А. К. Мусонова<sup>1</sup>, Т. В. Петрова<sup>2</sup>, А. И. Никифорова<sup>2</sup>, А. В. Иванова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-CMA) — аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся потерей двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга. С 2023 г. CMA включена в обязательный неонатальный скрининг на территории Российской Федерации. Неонатальный скрининговый тест на 5q-CMA должен выявлять все типы гомозиготной потери гена *SMN1*. Целью исследования была сравнительная оценка возможности определения гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1* с помощью теста на основе ПЦР-РВ с методом MLPA у пациентов с 5q-CMA, а также с различными изменениями числа копий гена *SMN1*. С помощью набора было проанализировано 206 образцов ДНК (группа 1), выделенных и очищенных из цельной крови, и 135 образцов ДНК (группа 2), выделенных и очищенных из сухих пятен крови, с известным количеством копий генов *SMN1* и *SMN2*. Количество копий генов *SMN1* и *SMN2* определяли методом MLPA, который был выбран в качестве референсного метода. Показано, что набор обнаруживает гомозиготную потерю гена *SMN1* во всех образцах, у которых подтверждена гомозиготная потеря гена *SMN1* с помощью MLPA (группа 1:  $n = 67$ ; 33%; группа 2:  $n = 19$ ; 14%). В то же время во всех образцах с 1–3 копиями гена *SMN1* результаты набора были отрицательными (группа 1:  $n = 139$ ; 67%; группа 2:  $n = 116$ ; 86%). Набор демонстрирует высокую эффективность и позволяет обнаруживать все возможные молекулярные формы гомозиготной потери гена *SMN1* как в образцах ДНК, выделенных из цельной крови, так и из сухих пятен крови.

**Ключевые слова:** спинальная мышечная атрофия, ген *SMN1*, неонатальный скрининг, ПЦР-РВ

**Финансирование:** все наборы ПЦР-детекции в режиме реального времени были предоставлены компанией ООО «ДНК-технология».

**Вклад авторов:** В. Д. Назаров, С. В. Лапин — концепция; Д. В. Сидоренко, Е. А. Девяткина, А. К. Мусонова — исследование; Т. В. Петрова, А. И. Никифорова, А. В. Иванова — методология; В. Д. Назаров, К. К. Черebilло — написание и подготовка оригинального проекта; К. К. Черebilло, С. В. Лапин, Т. В. Петрова, А. И. Никифорова, А. В. Иванова — написание, рецензирование и редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (протокол № 274 от 26 июня 2023 г.); проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации 1975 г. Письменное информированное согласие было получено от всех участников или их родителей.

✉ **Для корреспонденции:** Карина Константиновна Черebilло  
ул. Льва Толстого, 6-8, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; k.cherebillo@mail.ru

**Статья получена:** 30.05.2023 **Статья принята к печати:** 22.06.2023 **Опубликована онлайн:** 30.06.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.025

DETECTION OF *SMN1* LOSS WITH PCR-BASED SCREENING TEST

Nazarov VD<sup>1</sup>, Cherebillo CC<sup>1</sup>✉, Lapin SV, Sidorenko DV<sup>1</sup>, Devyatkina YA<sup>1</sup>, Musonova AC<sup>1</sup>, Petrova TV<sup>2</sup>, Nikiforova AI<sup>2</sup>, Ivanova AV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

Spinal muscular atrophy (SMA) is an inherited neuromuscular disease characterized by progressive skeletal muscular weakness and atrophy. The newborn screening for spinal muscular atrophy should define all molecular forms of SMA. The aim of this study is to compare a PCR-based test for detection of homozygous *SMN1* loss with multiple ligation probe amplification (MLPA) in patients with spinal muscular atrophy and other numerical changes of the *SMN1* gene. PCR-based test was used to detect exon 7 of *SMN1* gene homozygous loss. The study included 341 samples of patients with clinical suspicion of SMA from Biobank of Centre of Molecular Medicine of Pavlov State Medical University (Saint-Petersburg, Russia). Group 1 included 206 whole blood samples and Group 2 included 135 dried blood spot (DBS) samples. Copy number of the *SMN1* and *SMN2* genes had been evaluated with MLPA as a reference method. The results showed that kit was able to detect homozygous *SMN1* loss in all samples from group 1 and 2 (Group 1:  $n = 67$ ; 33%; Group 2:  $n = 19$ ; 14%). At the same time in all samples with 1–3 copies of the *SMN1* gene, the results of the kit were negative for homozygous loss of *SMN1* gene (Group 1:  $n = 139$ ; 67%; Group 2:  $n = 116$ ; 86%). Kit showed high effectiveness in the detection of homozygous loss *SMN1* gene. The kit detects all possible molecular forms of homozygous *SMN1* gene loss in both DNA samples extracted from the whole blood and DBS.

**Keywords:** Spinal muscular atrophy, *SMN1* gene, newborn screening, real-time PCR

**Funding:** All tests was provided by DNA-Technology LLC.

**Author contribution:** Nazarov VD, Lapin SV — concept; Sidorenko DV, Devyatkina YA, Musonova AC — investigation; Petrova TV, Nikiforova AI, Ivanova AV — methodology; Nazarov VD, Cherebillo CC — wrining, original draft preparation; Cherebillo CC, Lapin SV, Petrova TV, Nikiforova AI, Ivanova AV — writing, review & editing.

**Compliance with ethical standards:** this study was approved by the local Ethics Committee of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (№ 274 from 26.06.2023). Written informed consent was obtained from all participants or their parents. The 1975 Declaration of Helsinki was rigorously adhered to secure the rights of the patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Carina C. Cherebillo  
6/8, Lva Tolstogo, Saint-Petersburg, 197022, Russia; k.cherebillo@mail.ru

**Received:** 30.05.2023 **Accepted:** 22.06.2023 **Published online:** 30.06.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.025

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-CMA) — одно из самых распространенных аутосомно-рецессивных нервно-мышечных заболеваний у детей, которое характеризуется утратой двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга, что приводит к прогрессирующему поражению проксимальных отделов скелетной мускулатуры. Этиология заболевания связана с абберациями гена выживаемости мотонейронов *SMN1* (от англ. *survival motor neuron 1 gene*), локализованного в 5q13-регионе 5-й хромосомы. Встречаемость заболевания составляет один случай на 6000–10 000 новорожденных [1]. Быстрая и необратимая потеря двигательных нейронов при тяжелых формах 5q-CMA начинается в течение первых 3 месяцев жизни [2]. Отложенная молекулярно-генетическая диагностика 5q-CMA приводит к несвоевременному лечению и повышенному риску тяжелой инвалидизации пациента.

В 95% случаев 5q-CMA возникает в результате гомозиготной потери гена *SMN1* и последующего снижения синтеза белка выживаемости мотонейронов. Оставшиеся случаи заболевания приходится на компаунд-гетерозиготы, когда потеря гена *SMN1* на одном аллеле сочетается с точечными мутациями гена *SMN1* другого аллеля [3]. К настоящему времени спинальная мышечная атрофия у компаунд-гетерозигот не диагностируется ни в одной неонатальной программе мира [4]. Распространенность носительства гетерозиготной потери гена *SMN1* в российской популяции составляет 1 : 36 [5]. Помимо вышеперечисленных аббераций, часто в общей популяции встречается дупликация гена *SMN1*, однако данный генотип не приводит к 5q-CMA [1]. Высокая частота встречаемости изменения копиности *SMN1* обусловлена генетической нестабильностью данного региона вследствие наличия инвертированной последовательности функциональных генов *SMN1*, *SERF1A*, *NAIP*, *GTF2H2A* и соответствующих им центромерных копий *SMN2*, *SERF1B*, *NAIPΔ5*, *GTF2H2B* [1]. Гомолог гена *SMN1*, ген *SMN2*, тоже состоит из девяти экзонов и кодирует белок выживаемости мотонейронов. Гены различаются между собой по пяти нуклеотидам в диапазоне с 6-го интрона до 8-го экзона. Однако ключевая замена цитозина на тимин в 7-м экзоне гена *SMN2* (с.840C > T) приводит к разрыву сайта связывания с экзонным энхансером сплайсинга и образованию сайта связывания с экзонным сайленсером. В результате вышеуказанных изменений происходит исключение 7-го экзона у 90% транскриптов *SMN2*, а синтезированный белок *SMNΔ7* становится функционально неполноценным и нестабильным, что и обуславливает его быструю деградацию убиквитин-протеасомной системой [1]. Стоит отметить, что основным источником белка выживаемости мотонейронов является ген *SMN1*, а ген *SMN2* служит модификатором течения заболевания 5q-CMA вследствие сохранения 10% неизмененных транскриптов *SMN2* и увеличения числа копий гена *SMN2* [6]. Различают несколько клинических форм 5q-CMA. CMA типа 0 характеризуют отсутствие гена *SMN1* и наличие одной копии гена *SMN2*. Как правило, данная форма приводит к дебюту заболевания во внутриутробном периоде. Болезнь Верднига–Гоффмана (CMA типа I) развивается у пациентов в возрасте до 6 месяцев, имеющих чаще всего 2–3 копии гена *SMN2*, и является наиболее частой разновидностью, на которую приходится приблизительно половина случаев заболевания 5q-CMA [3, 7]. У младенцев с данной формой 5q-CMA отсутствуют симптомы заболевания при рождении, но впоследствии у них наблюдается задержка

развития двигательных функций, и возникают трудности с кормлением в течение первого полугодия жизни. Пациенты со CMA I типа не способны сидеть самостоятельно. При CMA II типа (болезнь Дубовица), которая является менее тяжелой формой заболевания, чаще всего можно наблюдать от 2 до 4 копий гена *SMN2*. Такие дети в возрасте от 6 до 18 месяцев могут самостоятельно сидеть, однако никогда не ходят, но большинство этих пациентов доживают до зрелого возраста. При CMA III типа (болезнь Кугельберга–Веландер) число копий гена *SMN2* чаще всего варьирует от 3 до 5. При данной форме дебют CMA происходит у пациентов в возрасте с 18 месяцев, и такие пациенты способны самостоятельно сидеть и стоять и в какой-то момент жизни достигают возможности самостоятельно ходить. CMA IV типа считают самой легкой и наименее распространенной формой 5q-CMA с дебютом во взрослом возрасте [3, 7].

Как уже было сказано, в патогенезе заболевания основную роль играет утрата гена *SMN1*, однако различают несколько форм его потери в виде истинной делеции, конверсии гена, формировании гибридных (химерных) *SMN1/SMN2*-структур, а также потери только нескольких экзонов гена *SMN1* (частичная делеция). Под классической делецией понимают делецию, включающую 7-й и 8-й экзоны гена *SMN1* без реципрокного увеличения числа копий гена *SMN2*. Частичная делеция характеризуется изолированной потерей 7-го или 8-го экзона на одном из аллелей гена *SMN1* при сохранении числа копий данных экзонов в гене *SMN2* [8]. При конверсии осуществляется реципрокное увеличение количества копий гена *SMN2* [9]. Образование химерных генов *SMN1/SMN2*, в которых имеются участки, принадлежащие как гену *SMN1*, так и псевдогену *SMN2*, и для которых характерно неравное соотношение 7-го и 8-го экзонов, тоже является одним из механизмов потери гена *SMN1* [10]. Следует отметить, что у пациентов с 5q-CMA можно наблюдать как отдельные формы гомозиготной потери гена *SMN1*, так и комбинированные случаи.

С точки зрения молекулярного патогенеза заболевания восстановление уровня белка SMN у пациентов с 5q-CMA является наиболее обоснованным подходом лечения. На экспериментальных моделях было показано, что выключение синтеза белка выживаемости мотонейронов по-разному влияет на их продолжительность жизни: чем раньше происходит выключение, тем хуже выживаемость [11]. Более того, раннее восполнение белка SMN приводит к значительному увеличению выживаемости в исследованиях на экспериментальных мышечных моделях [12]. Упомянутые исследования позволили предположить возможную высокую клиническую эффективность пресимптоматической терапии у новорожденных, у которых обнаружена патологическая абберация в гене *SMN1*. У новорожденных с двумя или тремя копиями гена *SMN2*, у которых начало лечения нусинерсеном во II фазе исследования NURTURE было начато на доклиническом этапе, были продемонстрированы более высокие показатели двигательных функций по сравнению с пациентами, у которых лечение было инициировано на симптоматической стадии 5q-CMA [13]. Другое многоцентровое клиническое исследование III фазы SPR1NT (онасемногеном абепаровеком) было посвящено изучению эффективности и безопасности применения препарата также до появления клинических симптомов у детей с биаллельной потерей гена *SMN1* и тремя копиями гена *SMN2*. Результаты исследования были однозначны:

все участники исследования достигли этапов моторного развития, характерных для здоровых детей, не имеющих патологической аберрации *SMN1* [14]. Имеющаяся терапия и возможность применения пресимптоматического лечения в настоящее время оправдывают проведение скрининга новорожденных на 5q-CMA. Такие страны, как Австралия, Бельгия, Канада, Германия, Италия, Япония, Норвегия, Нидерланды, Польша и Тайвань, а также 46 штатов в США ввели обязательный скрининг новорожденных на 5q-CMA. В Российской Федерации обязательный скрининг на 5q-CMA для всех новорожденных был запущен в 2023 г. [15].

«Золотым стандартом» диагностики 5q-CMA является мультиплексная лигазная цепная реакция (MLPA), однако данный метод неприменим в качестве скринингового в связи с трудоемкостью и высокой стоимостью [16, 17]. Наиболее приемлемы для скрининга различные модификации метода полимеразной цепной реакции с детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ), выявляющие гомозиготную потерю 7-го экзона гена *SMN1*. Это подтверждено в ряде больших работ и метаанализов [18–20]. В связи с высокой клинической актуальностью ранней диагностики 5q-CMA, а также началом с 2023 г. обязательного неонатального скрининга в РФ на данное заболевание существует потребность в диагностических молекулярно-генетических тестах, которые позволяли бы с высокой точностью выявлять все возможные формы гомозиготной потери гена *SMN1*. Следует также отметить, что одним из наиболее важных требований к неонатальному скрининговому тесту на CMA является возможность выявления гомозиготной потери гена *SMN1* в образцах сухих пятен крови (DBS, от англ. *dried blood spot*).

Российская компания «ДНК-технология» выпустила новый набор, основанный на методе ПЦР-РВ, для молекулярного скрининга на CMA у новорожденных. Однако крайне необходима его расширенная апробация для определения возможности выявления всех форм потери гена *SMN1*, которые ранее определяли с помощью метода MLPA.

Целью работы была сравнительная оценка возможности определения гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1* с помощью теста на основе ПЦР-РВ с методом MLPA у пациентов с 5q-CMA, а также с различными изменениями числа копий гена *SMN1*.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Сбор образцов, методика и выделение ДНК

#### *Образцы ДНК, выделенные из цельной крови (группа 1)*

Для оценки возможности детекции различных типов гомозиготной потери гена *SMN1* была собрана когорта, которая состояла из 206 образцов из Биобанка НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Пациенты с клиническим подозрением на 5q-CMA были направлены в лабораторию ПСПбГМУ им. И. П. Павлова с 2019 по 2021 г. Геномную ДНК выделяли из периферической крови с помощью набора ExtractDNA Blood & Cells (Evrogen; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию полученной ДНК доводили до конечной концентрации 50 нг/мкл. Количество копий генов *SMN1* и *SMN2* оценивали с помощью набора MLPA (P060,

MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя.

Все образцы были разделены на семь подгрупп в соответствии с количеством копий генов *SMN1* и *SMN2*. Подгруппа 1 «Норма» (54 образца): две копии генов *SMN1* и *SMN2* — так называемый «эталонный генотип». Подгруппа 2 «Делеция» (девять образцов): отсутствие гена *SMN1* без увеличения числа копий *SMN2*. Подгруппа 3 «Конверсия» (47 образцов): отсутствие гена *SMN1* при увеличении числа копий *SMN2*. Подгруппа 4 «Гибрид» (девять образцов): гомозиготная делеция экзона 7 и гетерозиготная делеция экзона 8 гена *SMN1* с увеличением числа копий экзона 7 *SMN2*. Подгруппа 5 «Носитель» (51 образец): одна копия гена *SMN1*. Подгруппа 6 «Дупликация» (23 образца): 3 копии гена *SMN1*. Подгруппа 7 «Другое» (13 образцов) содержала различные комбинации количества копий генов *SMN1* и *SMN2*, которые не соответствовали критериям других подгрупп (см. рисунок).

#### *Образцы ДНК, выделенные из DBS (группа 2)*

Для подтверждения возможности обнаружения гомозиготной потери гена *SMN1* в ДНК, выделенной из образцов сухих пятен крови, группа из 135 пациентов, кровь которых транспортировалась в высушенном состоянии на мембране, была взята из Биобанка НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Пациенты с клиническим подозрением на 5q-CMA были направлены в лабораторию ПСПбГМУ им. И. П. Павлова с 2019 по 2021 г. Геномная ДНК была выделена из сухих пятен крови с использованием PREP-CITO DBS (ДНК-Технология; Россия) в соответствии с инструкциями производителя. У всех пациентов количество копий генов *SMN1* и *SMN2* оценивали с помощью метода MLPA (P060, MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с протоколом для сухих пятен крови.

Все образцы были разделены на шесть подгрупп: «Норма», «Делеция», «Конверсия», «Гибрид», «Носитель», «Другое» (табл. 1).

### Анализ мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA)

Исследование MLPA проводили с использованием набора P060 (MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя для ДНК, выделенной и очищенной из цельной крови (группа 1) и из сухих пятен крови (группа 2). Набор содержит 17 эталонных зондов и четыре специфических зонда, связывающихся с последовательностями в экзонах 7 и 8 генов *SMN1* и *SMN2*. Полученные продукты реакции MLPA анализировали с помощью генетического анализатора ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Относительную высоту пика каждого образца рассчитывали и сравнивали с нормальным контролем с помощью приложения для анализа MLPA GeneMarker (SoftGenetics; США). Наличие изменения количества копий генов *SMN1/SMN2* оценивали в соответствии с инструкцией к набору MLPA.

### НеоСкрин SMA/TREC/KREC

Тест НеоСкрин SMA/TREC/KREC был проведен для всех образцов из групп 1 и 2. Набор НеоСкрин SMA/TREC/KREC

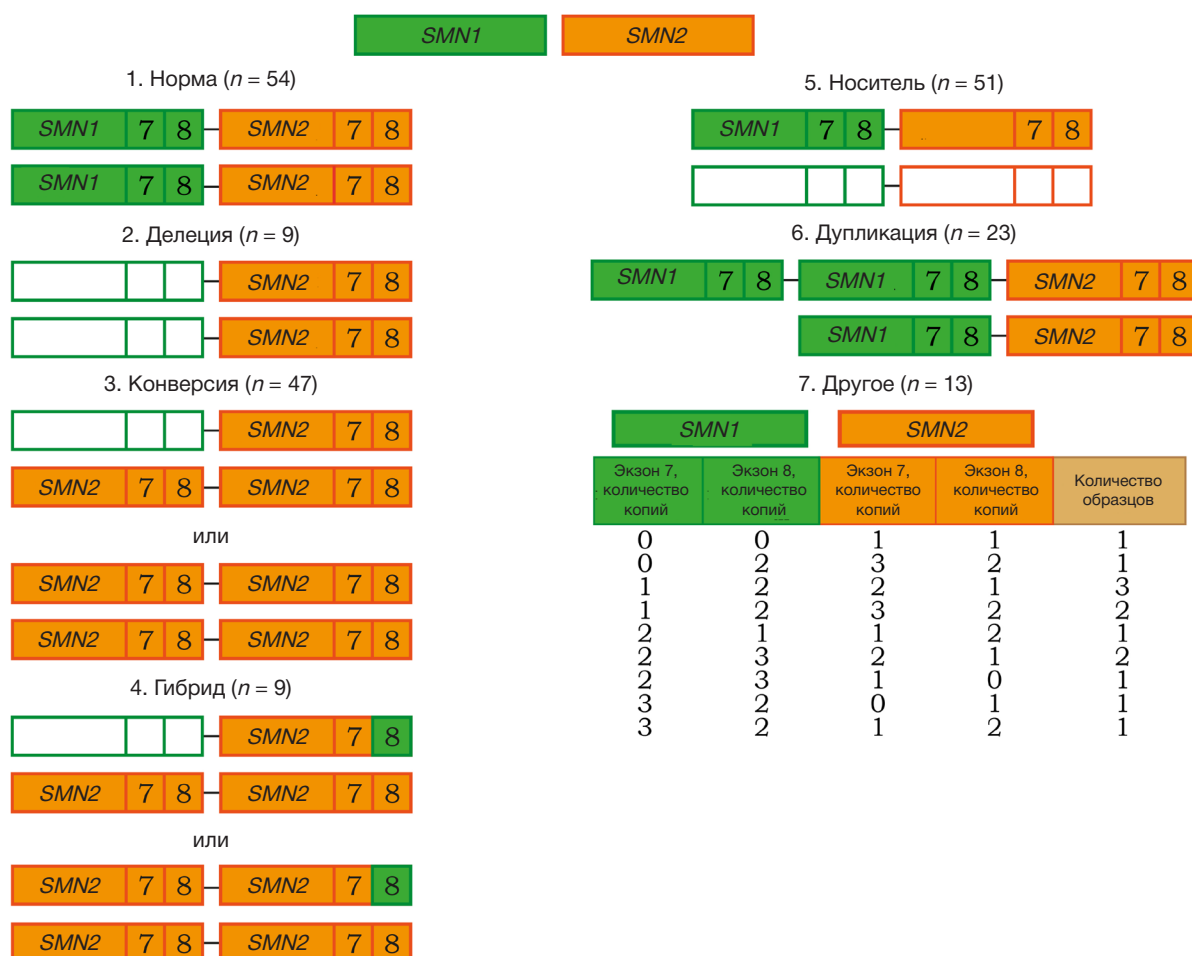


Рис. Типы количественного изменения генов SMN1 и SMN2 в каждой подгруппе

(ДНК-Технология; Россия) предназначен для выявления гомозиготной потери экзона 7 гена SMN1 и оценки уровней Т-рецепторных эксцизионных колец рецепторов (TREC) и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (KREC) в сухих пятнах крови и цельной крови. Метод основан на амплификации TREC, KREC, экзона 7 гена SMN1 и фрагмента нормализующего гена LTC4S (или эндогенного внутреннего контроля (IC), однокопийного геномного локуса гена лейкотриенсинтазы C4) методом мультиплексной ПЦР. Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет одновременно

регистрировать результаты различных реакций амплификации, протекающих в одной и той же пробирке. В табл. 2 показаны каналы обнаружения продуктов ПЦР-реакции.

Анализ результатов теста НеоСкрин SMA/TREC/KREC проводили с использованием термоциклера для детекции в реальном времени DTprime (ДНК-Технология; Россия) в соответствии с инструкциями производителя (табл. 3). Для оценки эффективности анализа в каждый цикл ПЦР включали положительный контроль (входит в набор для определения ПЦР) и отрицательный контроль.

Таблица 1. Количество копий генов SMN1 и SMN2 по данным анализа MLPA в группе 2

Подгруппа	Результаты MLPA				Количество образцов
	SMN1 ген		SMN2 ген		
	Экзон 7	Экзон 8	Экзон 7	Экзон 8	
Норма	2	2	4	4	10
	2	2	3	3	35
	2	2	2	2	54
Делеция	0	0	2	2	3
Конверсия	0	0	4	4	2
	0	0	3	3	11
Гибрид	0	1	3	2	2
Носитель	1	1	2	2	9
Другое	0	1	2	1	1
	1	2	1	1	4
	1	2	3	2	4

Таблица 2. Каналы обнаружения ПЦР-продуктов

Fam	Hex	Rox	Cy5
TREC	SMN1 (экзон 7 гена SMN1)	KREC	IC (Внутренний контроль)

Таблица 3. Условия проведения ПЦР

Этап	Температура, °C	Минуты	Секунды	Количество циклов	Оптические измерения	Тип этапа
1	80	2	00	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5	√	Цикл
	64	0	15			
3	94	0	10	45	√	Цикл
	64	0	15			
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	...	...	Хранение		Хранение

Положительный контроль С+ № 1, содержащий ДНК-плазмиды с указанными мишенями — TREC, KREC, SMN1, IC в равной концентрации, предназначен для оценки эффективности ПЦР. Положительный контроль С+ № 2 с плазмидным эквивалентом экзона 7 гена SMN2 позволяет оценить блокирование амплификации SMN2 (контроль специфичности амплификации SMN1).

Анализ потери экзона 7 гена SMN1 основан на оценке разности циклов ( $\Delta C_p$ ) между  $C_p$  SMN1 (канал Hex) и IC (канал Cy5) ( $\Delta S_r = S_r(\text{Hex}) - C_p(\text{Cy5})$ ).

Оценку гомозиготной потери экзона 7 гена SMN1 проводили в соответствии с инструкцией набора для ПЦР-детекции (выполняется автоматически программным обеспечением ПЦР-амплификатора).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основанный на ПЦР скрининговый тест был использован для оценки наличия у 341 образца гомозиготной потери гена SMN1. Во всех образцах количество копий генов SMN1 и SMN2 было определено с использованием эталонного метода MLPA. Результаты теста считали истинно положительными, если гомозиготную потерю экзона 7 гена SMN1 обнаруживали в образцах с 0 копиями экзона 7 гена SMN1. Наличие по меньшей мере одного экзона 7 гена SMN1, идентифицированного методом

MLPA, и обнаружение сигнала SMN1 экзона 7 с помощью теста НеоСкрин SMA/TREC/KREC считали истинно отрицательными.

Результаты в группе 1 были следующими. В подгруппе 1 «Норма» 54 участника (26%) имели 2 копии экзона 7 гена SMN1, и все образцы были истинно отрицательными при скрининге набором на основе ПЦР-ПВ. В подгруппе 2 «Делеция», подгруппе 3 «Конверсия», подгруппе 4 «Гибрид» все образцы были истинно положительными ( $n = 65$ ; 32%). В подгруппе 5 «Носитель», состоящей из 51 участника (25%), у всех имелась единственная копия экзона 7 гена SMN1, и все участники были истинно отрицательными. В подгруппе 6 «Дупликация» все 23 образца (11%), содержащие 3 копии экзона 7 гена SMN1, были истинно отрицательными. Подгруппа 7 «Другое» состояла из 13 образцов с различным количеством экзонов генов SMN1 и SMN2. Истинно отрицательными были шесть образцов (3%), содержащие более одной копии экзона 7 гена SMN1. Одну копию гена SMN1 в подгруппе 7 содержали пять образцов, которые тоже были истинно отрицательными (2%). И два участника не имели ни одного из экзонов 7 гена SMN1 и были, соответственно, истинно положительными (1%). Результаты представлены в табл. 4.

В группе 2 результаты теста были следующими. В подгруппе «Норма» 99 образцов (73%) имели две копии экзона 7 гена SMN1, и все образцы были истинно

Таблица 4. Сравнительный анализ результатов, полученных с помощью метода MLPA и теста на основе ПЦР-ПВ в группе 1

Подгруппа	Количество образцов в каждой подгруппе	Результаты MLPA (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена SMN1)			Результаты теста (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена SMN1)		ИП	ЛП	ИО	ЛО
		>1	1	0	Норма ( $\geq 1$ )	Делеция (0)				
1. Норма	54	54	0	0	54	0	0	0	54	0
2. Делеция	9	0	0	9	0	9	9	0	0	0
3. Конверсия	47	0	0	47	0	47	47	0	0	0
4. Гибрид	9	0	0	9	0	9	9	0	0	0
5. Носитель	51	0	51	0	51	0	0	0	51	0
6. Дупликация	23	23	0	0	23	0	0	0	23	0
7. Другое	13	6	5	2	11	2	2	0	11	0
Всего	206	83	56	67	139	67	67	0	139	0

Примечание: ИП — истинно положительные; ЛП — ложноположительные; ИО — истинно отрицательные; ЛО — ложноотрицательные.

Таблица 5. Сравнительный анализ результатов, полученных с помощью метода MLPA и теста на основе ПЦР-РВ в группе 2

Подгруппа	Количество образцов в каждой подгруппе	Результаты MLPA (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена <i>SMN1</i> )			Результаты теста (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена <i>SMN1</i> )		ИП	ЛП	ИО	ЛО
		>1	1	0	Норма ( $\geq 1$ )	Делеция (0)				
1. Норма	99	99	0	0	99	0	0	0	99	0
2. Делеция	3	0	0	3	0	3	3	0	0	0
3. Конверсия	13	0	0	13	0	13	13	0	0	0
4. Гибрид	2	0	0	2	0	2	2	0	0	0
5. Носитель	9	0	9	0	9	0	0	0	9	0
6. Дупликация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7. Другое	9	0	8	1	8	1	1	0	8	0
Всего	135	99	17	19	116	19	19	0	116	0

Примечание: ИП — истинно положительные; ЛП — ложноположительные; ИО — истинно отрицательные; ЛО — ложноотрицательные.

отрицательными. В подгруппе «Делеция», подгруппе «Конверсия», подгруппе «Гибрид» все образцы были истинно положительными при скрининге с помощью ПЦР-РВ ( $n = 18; 13,3\%$ ). Группа 2 не содержала образцов с дупликацией гена *SMN1* согласно результатам анализа MLPA. В подгруппе «Носитель» все девять проб (7%) были истинно отрицательными. В подгруппе «Другие» один образец (0,7%) был истинно положительным на наличие гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1*. И восемь образцов (6%) содержали одну копию гена *SMN1*, и все участники были истинно отрицательными при скрининге с помощью ПЦР-РВ. Все результаты представлены в табл. 5.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спинальная мышечная атрофия — аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, основным клиническим проявлением которого является прогрессирующее тяжелое поражение проксимальной скелетной мускулатуры. Основная характеристика теста для выявления 5q-CMA при неонатальном скрининге — возможность детектирования всех форм потери гена *SMN1* как в образцах ДНК, выделенных из цельной крови, так и образцах ДНК, полученных из сухих пятен крови.

Существуют различные методологические подходы к детекции гомозиготной потери гена *SMN1*, однако для неонатального скрининга на CMA лучше всего зарекомендовали себя различные модификации метода ПЦР в реальном времени [16, 21]. Это связано с их высокой эффективностью, характеризующейся крайне низким количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов, относительно низкой трудоемкостью и себестоимостью, а также возможностью проведения исследований по ДНК из сухих пятен крови [2, 22]. Тест основан на технологии ПЦР и детектирует гомозиготную потерю экзона 7 гена *SMN1* [6].

Ген *SMN1* расположен в очень нестабильном регионе генома, насыщенном повторяющимися инвертированными генами и богатым Alu-последовательностями, что обуславливает появление широкого спектра генетических изменений гена *SMN1*. Для подтверждения специфичности выявления гомозиготной потери гена *SMN1* с помощью ПЦР-РВ в группе 1, состоящей из образцов ДНК, выделенных и очищенных из цельной крови, была отобрана гетерогенная подгруппа из 139 образцов с количеством копий гена *SMN1*, равным 1–3 копии (подгруппы «Норма», «Носитель», «Дупликация», 11 участников из подгруппы «Другое»). По

итогах молекулярно-генетического тестирования во всех 139 образцах были получены отрицательные результаты на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Это подчеркивает, что доброкачественное изменение копийности гена *SMN1* не влияет на эффективность выявления гомозиготной потери гена *SMN1* при скрининге.

Главной задачей неонатального скрининга на 5q-CMA является детекция случаев гомозиготной потери гена *SMN1*. В группе 1 все участники исследования с делецией гена *SMN1*, конверсией, гибридными генами, а также иными формами генотипа в количестве двух пациентов (общее количество 67) дали положительный результат в ходе скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Набор продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность выявления гомозиготной потери гена *SMN1*. Это согласуется с рядом исследований, посвященных методологической проблеме скрининга 5q-CMA [2, 23].

Для подтверждения эффективности теста для выявления гомозиготной потери гена *SMN1* в образцах ДНК, выделенных из сухих пятен крови, были отобраны образцы в группу 2. Во всех образцах из данной группы с 1–3 копиями гена *SMN1* ( $n = 116$ ) результаты применения теста были отрицательными на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Это подчеркивает, что изменение числа копий генов *SMN1* не влияет на специфичность обнаружения гомозиготной потери гена *SMN1* в ДНК, выделенной из образцов сухих пятен крови. Результаты скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1* набором, основанным на ПЦР-РВ, были положительными у всех пациентов в образцах сухих пятен крови, у которых была обнаружена гомозиготная потеря гена *SMN1* с помощью метода MLPA.

Ограничением данного набора является отсутствие возможности выявления редких форм 5q-CMA, ассоциированных с гетерозиготной потерей гена *SMN1* и точечными патогенными вариантами на сохранившейся копии гена (сложные или компаунд гетерозиготы). По результатам исследований, распространенность данной формы 5q-CMA составляет до 5% от всех случаев [3]. Однако нужно отметить, что на данный момент ни в одной стране мира не проводится скрининг на данный подтип заболевания [4]. При выявлении клинических признаков 5q-CMA и отрицательном результате скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1* требуется расширенное исследование на обнаружение потери гена *SMN1* на одном аллеле в сочетании с точечными мутациями гена *SMN1* другого аллеля.

## ВЫВОДЫ

Пилотное исследование показало, что набор на основе ПЦР-РВ способен обнаруживать гомозиготную потерю гена

*SMN1* в образцах ДНК, выделенных как из цельной крови, так и из сухих пятен крови. Согласно результатам настоящего исследования, набор обнаруживает также все возможные молекулярные формы гомозиготной потери гена *SMN1*.

## Литература

- Butchbach MER. 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. DOI: 10.3390/ijms22157896.
- Chien YH, Chiang SC, Weng WC, Lee NC, Lin CJ, Hsieh WS, et al. Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *J Pediatr.* 2017; 190: 124–129. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.06.042.
- Nicolau S, Waldrop MA, Connolly AM, Mendell JR. Spinal Muscular Atrophy. *Semin Pediatr Neurol.* 2021; 37: 100878. DOI: 10.1016/j.spen.2021.100878.
- Clermont O, Bulet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat.* 2004; 24 (5): 417–27. DOI: 10.1002/humu.20092.
- Zabnenkova VV, Dadali EL, Spiridonova MG, Zinchenko RA, Polyakov AV. Spinal muscular atrophy carrier frequency in Russian Federation. *ASHG.* 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.16245.60642.
- Arnold ES, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy. *Handb Clin Neurol.* 2018; 148: 591–601. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7.
- Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q». М., 2023.
- Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, 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): 836–39. DOI: 10.1002/ana.410440522.
- Stabley DL, Holbrook J, Scavina M, Crawford TO, Swoboda KJ, Robbins KM, 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.
- Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Lai PS, Tozawa T, Chiyonobu T, et al. Clinical phenotypes of spinal muscular atrophy patients with hybrid SMN gene. *Brain Dev.* 2021; 43 (2): 294–302. DOI: 10.1016/j.braindev.2020.09.005.
- Lutz CM, Kary S, Patrini S, Osborne MA, Liu D, Henderson CE, et al. Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 2011; 121 (8): 3029–41. DOI: 10.1172/JCI57291.
- Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, et al. Motor unit recovery following Smn restoration in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2022; 31 (18): 3107–19. DOI: 10.1093/hmg/ddac097.
- De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord.* 2019; 29 (11): 842–56. DOI: 10.1016/j.nmd.2019.09.007.
- Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med.* 2022; 28 (7): 1390–7. DOI: 10.1038/s41591-022-01867-3.
- Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 274n dated 21.04.2022 "On approval of the Procedure for providing medical care to patients with congenital and (or) hereditary diseases".
- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 3245–76. DOI: 10.3390/ijms13033245.
- Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16: 830–38.
- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
- Gómez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W. Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics.* 2007; 8 (4): 271–8. DOI: 10.1007/s10048-007-0093-1.
- Gutierrez-Mateo C, Timonen A, Vaahtera K, Jaakkola M, Hougaard DM, Bybjerg-Grauholm J. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA. *Int J Neonatal Screen.* 2019; 5 (4): 39. DOI: 10.3390/ijns5040039.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulet P, Viollet L, 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.
- Kraszewski JN, Kay DM, Stevens CF, Koval C, Haser B, Ortiz V, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state. *Genet Med.* 2018; 20 (6): 608–13. DOI: 10.1038/gim.2017.152.
- Kariyawasam DST, Russell JS, Wiley V, Alexander IE, Farrar MA. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genet Med.* 2020; 22 (3): 557–65. DOI: 10.1038/s41436-019-0673-0.

## References

- Butchbach MER. 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. DOI: 10.3390/ijms22157896.
- Chien YH, Chiang SC, Weng WC, Lee NC, Lin CJ, Hsieh WS, et al. Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *J Pediatr.* 2017; 190: 124–129. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.06.042.
- Nicolau S, Waldrop MA, Connolly AM, Mendell JR. Spinal Muscular Atrophy. *Semin Pediatr Neurol.* 2021; 37: 100878. DOI: 10.1016/j.spen.2021.100878.
- Clermont O, Bulet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat.* 2004; 24 (5): 417–27. DOI: 10.1002/humu.20092.
- Zabnenkova VV, Dadali EL, Spiridonova MG, Zinchenko RA, Polyakov AV. Spinal muscular atrophy carrier frequency in Russian Federation. *ASHG.* 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.16245.60642.
- Arnold ES, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy. *Handb Clin Neurol.* 2018; 148: 591–601. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7.



7. Ministerstvo zdravooxraneniya Rossijskoj Federacii. Klinicheskie rekomendacii «Proksimal'naya spinal'naya myshechnaya atrofiya 5q». M., 2023. Russian.
8. Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, 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): 836–39. DOI: 10.1002/ana.410440522.
9. Stabley DL, Holbrook J, Scavina M, Crawford TO, Swoboda KJ, Robbins KM, 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.
10. Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Lai PS, Tozawa T, Chiyonobu T, et al. Clinical phenotypes of spinal muscular atrophy patients with hybrid SMN gene. *Brain Dev*. 2021; 43 (2): 294–302. DOI: 10.1016/j.braindev.2020.09.005.
11. Lutz CM, Kariy S, Patruni S, Osborne MA, Liu D, Henderson CE, et al. Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*. 2011; 121 (8): 3029–41. DOI: 10.1172/JCI57291.
12. Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, et al. Motor unit recovery following Smn restoration in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2022; 31 (18): 3107–19. DOI: 10.1093/hmg/ddac097.
13. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord*. 2019; 29 (11): 842–56. DOI: 10.1016/j.nmd.2019.09.007.
14. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022; 28 (7): 1390–7. DOI: 10.1038/s41591-022-01867-3.
15. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 274n dated 21.04.2022 "On approval of the Procedure for providing medical care to patients with congenital and (or) hereditary diseases".
16. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 3245–76. DOI: 10.3390/ijms13033245.
17. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2006; 16: 830–38.
18. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
19. Gómez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W. Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics*. 2007; 8 (4): 271–8. DOI: 10.1007/s10048-007-0093-1.
20. Gutierrez-Mateo C, Timonen A, Vaahtera K, Jaakkola M, Hougaard DM, Bybjerg-Grauholm J. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA. *Int J Neonatal Screen*. 2019; 5 (4): 39. DOI: 10.3390/ijns5040039.
21. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, 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.
22. Kraszewski JN, Kay DM, Stevens CF, Koval C, Haser B, Ortiz V, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state. *Genet Med*. 2018; 20 (6): 608–13. DOI: 10.1038/gim.2017.152.
23. Kariyawasam DST, Russell JS, Wiley V, Alexander IE, Farrar MA. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genet Med*. 2020; 22 (3): 557–65. DOI: 10.1038/s41436-019-0673-0.