



SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ'DE MOLEKÜLER TANI: EGE BÖLGERİNDE BİR REFERANS MERKEZİNDEKİ UYGULAMALAR

MOLECULAR DIAGNOSIS IN SPINAL MUSCULAR ATROPHY: APPLICATIONS AT A REFERENCE CENTER IN AEGEAN REGION

Sacide PEHLİVAN¹ Ferda ÖZKINAY² Savaş İZZETOĞLU¹ Özgür ÇOĞULU² Arife KUNT¹
Tufan ÇANKAYA² Eren DEMİRTAŞ³ Sarenur TÜTÜNCÜOĞLU²

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, izmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bornova, izmir

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bornova, izmir

Anahtar Sözcükler; spinal müsküleratrofi, SMN geni, NAİP geni, DNA, delesyon.

Key Words: spinal muscular atrophy, SMN gene, NAİP gene, DNA, deletion

ÖZET

Spinal Müsküler Atrofi (SMA) dünyada sık görülen, otozomal resesif geçişli nörodejeneratif bir hastalıktır.

Bu çalışmada, çocuk nörologları tarafından SMA tanısı konan 18 hastada telomerik-Survival Motor Nöron (tSMN) ve Nöral Apoptosi inhibitör Proteini (NAİP) gen delesyon analizleri yapılmıştır. Onsekiz hastanın Sinde hem tSMN geni ekzon 7 ve 8 hem de NAİP geni ekzon 6 delesyonu saptanmıştır. Altı hastada tSMN geni ekzon 7 ve 8 delesyonları gözlenirken, kardeş olan 2 hastada yalnız tSMN geni ekzon 7 delesyonu bulunmuş fakat ekzon 8 delesyonu görülmemiştir, iki hastada her 2 gende analizi yapılan ekzonlarda delesyon saptanmamıştır.

SUMMARY

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is one of the most common autosomal recessive neurodegenerative disorders.

In this study, 18 patients diagnosed to have SMA by pediatric neurologist were investigated for telomeric-Survival Motor Neuron (tSMN) and Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAİP) gene deletions. Among 18 patients, 8 had both exon 7 and 8 deletions of SMN gene and exon 6 deletion of NAİP gene. Six patients had exon 7 and 8 deletions of tSMN. Two patients who were sibling had only exon 7 deletions of tSMN gene. In two patients out of 18 patients no deletion could be detected in the genes investigated.

GİRİŞ

Spinal müsküler atrofi (SMA)'ler; her yaşta görülebilen, paralize neden olan hastalıkların en büyük, önemli ve heterojen grubunu oluşturur. SMA'lar kalıtım şekillerine göre üç grupta sınıflandırılırlar.

Yazışma adresi: Sacide Pehlivan, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Makalenin geliş tarihi: 17.09.01; kabul tarihi: 22. 01. 2002

1) Otozomal resesif geçiş gösteren SMA;

Otozomal resesif kalıtım gösteren SMA, en sık rastlanan form olup, batı toplumlarında, çocuklarda kistik fibrozisten sonra 2. sıklıkta görülen ölümcül bir hastalıktır. Bu toplumlarda 1/6000-1/10000 oranında görülebilen hastalığın taşıyıcı sıklığı 1/40-1/80 arasında değişmektedir (1). Bu nöromüsküler hastalık omurilikte yer alan alfa-motor nöronların dejenerasyonuna ve simetrik kas zayıflığına ne-

den olur. Tüm SMA'ların yaklaşık %95'inin bulunduğu bu grupta tanı SMA konsorsiyumu tarafından belirlenmiş olan kriterlere göre konmaktadır (2,3). Çocukluk çağı proksimal SMA hastalığı başlangıç yaşı ve klinik şiddetine göre 3 tipe ayrılmaktadır. Tip I (Werdnig-Hoffmann hastalığı) en şiddetli formu olup hastalar yardımsız oturamaz ve 2 yaşından önce kaybedilirler. Ara form olan tip II (Intermediate form-subakut form)'de hastalar oturabilir fakat yürüyemezler, tip III (Kugelberg-Welander hastalığı) ise en hafif formudur (4,5).

SMA'ya neden olan genlere bakıldığında;

SMN GENİ; Genomik uzunluğu 20 Kb olan 9 ekzona sahip SMN geni; 294 amino asitten oluşan 32 kD'luk bir proteini kodlar. 1995 yılı Ocak ayında Lefebvre S. et al tarafından SMA'ya neden olan aday gen olarak bildirilen bu genin telomerik (SMN1 - SMNt) ve sentromerik (SMN2 ⇔ SMNc ⇔ cBCD541) olmak üzere 2 kopyası bulunduğu ortaya konmuştur (6). SMN geninin sentromerik ve telomerik dizileri benzer olup sadece ekzon 7 ve 8'de yer alan 5 nükleotide farklılık olduğu saptanmıştır.

SMA'ii hastaların %95'inde SMN geni telomerik kopyada homozigot delesyon vardır. Genin 7. ve 8. ekzonlarında görülen bu delesyonlar hastalığa neden olur. Ekzon 7 ve 8 delesyon analizi SSCP yöntemi (Single Strand Conformation Polymorphism) veya restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile yapılabilmektedir (6,7).

NAİP GENİ; 70 Kb'lık genomik uzunluğa sahip 16 ekzonu olan NAİP geni; 1232 amino asit uzunluğunda 140 kD'luk bir proteini kodlar. 1995 yılında Roy N et al tarafından 5q13 bölgesinde yer aldığı ve SMA hastalarında delesyona uğradığı yayınlanmıştır (8). NAİP geni delesyonu olan hastalarda motor nöron aktivite kaybı saptanmış ve NAİP gen ürününün motor nöron apoptozisinin negatif regülatörü olabileceği fikri öne sürülmüştür. SMN'ye benzemeyen bir özelliği NAİP ekspresyonunun doku özgüllüğü göstermesidir.

2) Otozomal Dominant Geçiş Gösteren SMA'lar

Otozomal dominant geçiş gösteren SMA'da başlangıç yaşı 10-40 arasında değişmektedir. Hastalığa neden olan genin otozomal resesif geçişli SMA'dan sorumlu olan 5q13 bölgesine lokalize olmadığı saptanmıştır. Juvenil ya da erişkin tipte hastalığa neden olan gen bölgesi 7p'de, scapuloperoneal tipte hastalığa neden olan gen ise 12q24.1-q24.3 bölgesinde bulunmaktadır (9,10).

3) X'e Bağlı Geçiş Gösteren SMA'lar

X'e bağlı geçiş gösteren SMA androjen reseptör geni 1. ekzonunda trinükleotit bir tekrar olan CAG sayısının art-

masıyla ortaya çıkan ileri yaş motor nöropatisidir. CAG sayısındaki artış ile semptomların şiddetinin arttığı saptanmıştır. Çok nadir rastlansa da X'e bağlı infantil leta! formu vardır ve semptomları otozomal resesif geçiş gösteren çocukluk çağı SMA ile karıştırılabilmektedir. Arthyrogryposis adı da verilen X'e bağlı geçiş gösteren form Xp11.3-p11.2'de haritalanmıştır (11,12).

GEREÇ VE YÖNTEM

Mayıs-1999 - Nisan 2001 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk - Genetik Bilim Dalı'na başvuran 18 SMA hasta kanından DNA izolasyonu tuzla çöktürme yöntemine göre yapıldı (13). Hastalardaki akrabalık oranı %37.5'di. İzole edilen DNA'lar spektrofotometrede okunarak (260 nm) DNA konsantrasyonları hesaplandı ve amplifikasyon başına 200 μ g kullanıldı (15). Çalışmada kullanılan amplifikasyonlardaki primer konsantrasyonu 110 ng / 50 μ L, dNTP konsantrasyonu 0.2 m M, Taq polimeraz 1.5U / 50 μ L olarak hazırlanmıştır (Crocodile III.Appligene). Aday genlerden SMN geni ekzon 7 ve ekzon 8 van der Steege S ve ark. protokolüne göre amplifiye edildikten sonra ekzon 7 PCR ürünü Dar I restriksiyon endonükleaz ile ekzon 8 PCR ürünü Dde I restriksiyon enzimiyle kesime konmuştur (7). Hem SMN geni 7.ekzonu hem de 8. ekzonu kesim sonrası %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek (100 V, 2 saat) değerlendirilmiştir (15). NAİP geni Roy N ve ark. protokolüne göre multipleks PCR ile çoğaltıldıktan sonra %2.5'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek (100 V, 1.5 saat) değerlendirilmiştir (8, 15). Her amplifikasyonda bir pozitif kontrol bir negatif kontrol konarak kontaminasyon ve hatalı amplifikasyondan kaçınılmıştır.

BULGULAR

18 SMA hastasında telomerik SMN geni ekzon 7 ve 8, NAİP geni ekzon 6 delesyonları analiz edilmiştir. Bu analizlere ait örnek fotoğraflar şekil 1- 2'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda; 18 hastanın 16'sında delesyon saptanmıştır. Bunların 8'inde hem tSMN geni ekzon 7 ve 8 hem de NAİP geni ekzon 6 delesyonu saptanmıştır. Altı hastada tSMN geni ekzon 7 ve 8 delesyonları gözlenirken, kardeş olan 2 hastada yalnız tSMN geni ekzon 7 delesyonu bulunmuş fakat ekzon 8 delesyonu görülmemiştir. İki hastada her 2 gende analizi yapılan ekzonlarda delesyon saptanmamıştır.

TARTIŞMA

SMA'ya da neden olan gen bölgesinin 1990 yılında 5q11.2-13.3'te 35 cm uzunluğunda bir bölge olduğu bildirilmiş, Wirth ve grubu aday bölgeyi 1 cm'a kadar daralt-

tıktan sonra 1995 yılı başında SMN ve NAİP aday genler olarak yayımlanmışlardır (6,7).

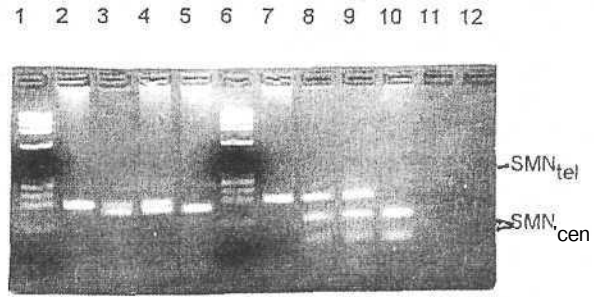
Çalışmalarımızda SMN geni ekzon 7 ve 8, NAİP geni ekzon 6 delesyonları analiz edilmiştir. 18 kişiden oluşan hasta grubumuzda SMN geni delesyon oranı %89 olarak saptanmış ve bu oranın diğer gruplarla benzer olduğu görülmüştür. Örneğin Türk populasyonunda %93, Almanya'da %90, Fransa'da %99, oranında delesyonlar yayınlanmıştır (6,9,14,16). İki kardeş hastada SMN geninde ekzon 7 delesyonu bulunduğu halde, ekzon 8 delesyonunun olmadığı saptanmıştır. Ekzon 8'de yer alan ve rekombinasyona olanak sağlayan bazı diziler sayesinde oluşan bu hibrit formun ender olarak görüldüğü literatürde de bildirilmektedir. Hibrit bölge telomerik ekzon 8 hariç sentromerik kopya ile aynı özellikleri göstermektedir. Ekzon 7 delesyonu bildirilen hastaların genellikle tip II grubundan olması, sadece ekzon 7 delesyonu bulunmasının, hastalığın hafif formunu oluşturduğunu düşündürmüştür (9,17).

SMN geni delesyonu saptamadığımız 2 hastada; SMA'nın farklı tip ve taşıyıcılarının saptanmasında, 2001 yılında Scheffer H ve ark. tarafından yayımlanan yaklaşım aşamalarının kullanılabilceği düşünülmüş fakat küçük bir hasta grubundan oluşan çalışma grubumuz genişledikten sonra delesyonu olmayan hastalara ait DNA örneklerinin daha ayrıntılı analiz edilmesine karar verilmiştir (18).

Hastalarımızda NAİP geni ekzon 6 delesyonu %50 olarak saptanmıştır. Delesyon oranımız diğer gruplarla karşılaştırıldığında hiç NAİP delesyonu bulunmayan Çin toplumu dışında bir farklılığın olmadığı ve oranların birbirine yakın olduğu saptanmıştır (14,16). NAİP delesyonu olan hastalarımızda mutlaka SMN geninde de delesyon bulunması, SMA oluşumu için NAİP gen delesyonunun tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. Literatürde de sadece NAİP delesyonu olan SMA hastası bulunmamaktadır.

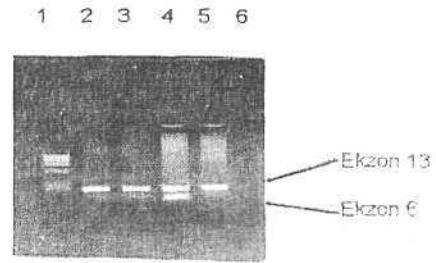
1999 yılında başlattığımız çalışmalar ile hastanemizde tanı konan SMA hastalarında aday genlerin delesyon

oranları saptanmış ve laboratuvarımızda tanı/doğum öncesi tanı hizmeti verilmesi mümkün olmuştur.



Şekil 1. SMN geni ekzon 7 (Dra I kesimi 3-6) ve ekzon 8 (Ddel 8-10) analizi

1,6	: λX174/Hae III marker
3	: Sağlıklı kontrol (SMN 7ekzonu)
4	: Telomerik ekzon 7 delesyonu olmayan hasta
5	: Telomerik ekzon 7 delesyonu olan hasta
8	: Sağlıklı kontrol (SMN 8 ekzonu)
9	: Telomerik ekzon 8 delesyonu olmayan hasta
10	: Telomerik ekzon 8 delesyonu olan hasta
2,7	: Kesimi öncesi ekzon 7 ve 8 amplifikasyonu
11,12	: Telomerik ekzon 7 ve ekzon 8 negatif kontrolü



Şekil 2. NAİP geni ekzon 6-13 analizi

1	: λX174/Hae III marker
2, 3, 5	: Ekzon 6 delesyonu
4	: Sağlıklı kontrol (Ekzon 13,6 amplifikasyonu)
6	: Negatif kontrol

KAYNAKLAR

1. Pearn JH. Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. J Med Genet 1978; 15: 409-413.
2. Munsat TL. Workshop report international SMA collaboration. Neuromusc Disord 1991; 1: 81.
3. Dubowitz V. Chaos in classification of the spinal muscular atrophies in childhood. Neuromusc Disord 1991; 1: 77-78.
4. Davies KE, Thomas NH, Danielz RJ, et al. Molecular studies of spinal muscular atrophy. Neuromusc Disord 1991; 1: 83-85.
5. Cunningham M, and Stocks J. Werdnig-Hoffmann disease. Arch Dis Child 1978; 53: 921-925.
6. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Celi 1995; 80: 155-165.
7. 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.
8. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Celi 1995; 80: 167-178.

9. 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.
10. Isozumi K, DeLong R, Kaplan J, et al. Linkage of scapuloperoneal spinal muscular atrophy to chromosome 12q24.1-q24.31. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1377-1382.
11. Mhatre AN, Trifiro MA Kaufmann M, et al. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature Genet* 1993; 5: 184-188.
12. Yapticakis C, Kapaki E, Boussiou M, et al. Prenatal diagnosis of X - linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Prenatal Diagnos* 1996; 16:262-265.
13. Miller SA, and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 28: 1215.
14. H.Erdem, S.Pehlivan, H.Topalođlu, M.Özgüç. Deletion analysis in Turkish spinal muscular atrophy patients. *Brain and Development*. 1999; 37 (2): 167-170.
15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook F, *Molecular Cloning a Laboratory Manuel*, Cold Spring Harbor Laboratory; USA, 1983.
16. Morrison KE. Advances in SMA research: Review of gene deletions. *Neuromusc Disord* 1996; 6: 397-408.
17. Hahnen E, Schöling J, Rudnic-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*, 1995; 59; 1057-1065.
18. Scheffer H, Cobben JM, Matthiss, Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 (7): 484-491.

*Bu çalışma Ege Çocuk Vakfı tarafından desteklenmiştir. Moleküler Genetik Analizler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ABD Laboratuvarında uygulanmıştır.