

Genetip- fenotip korelacija kod spinalne mišićne atrofije (SMA)

Marija Knežević¹, Jelena Mladenović², Gordana Kovačević³, Slavica Ostojić³, Jelena Milin Lazovića^{1,4}, Vedrana Milić Rašića,^{1,2}

¹Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

²Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd

³Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije

„Dr Vukan Čupić“, Beograd

⁴Institut za statistiku i informatiku, Medicinski fakultet u Beogradu

Genotype-phenotype correlation in spinal muscle atrophy (SMA)

Marija Knezevic¹, Jelena Mladenovic², Gordana Kovacevic³, Slavica Ostojic³, Jelena Milin Lazovic^{1,4}, Vedrana Milic Rasic^{1,2}

¹Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²Clinic for Neurology and Psychiatry for Children and Youth, Belgrade, Serbia

³Institute for Medical Care of Mother and Child of Serbia „Dr. Vukan Čupić“, Belgrade, Serbia

⁴Institute of Informatics and Statistics, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Apstrakt

Spinalna mišićna atrofija (SMA) je autozomno recesivna neuromišićna bolest koju odlikuje progresivna denervacija skeletnih mišića usled propadanja alfa-motoneurona i sledstvena pojava hipotonije, mišićne slabosti, atrofije. Cilj rada je da se pokaže potencijalni uticaj broja kopija SMN2 na razvoj jednog od tri tipa SMA. Ispitivanjem je obuhvaćeno 74 pacijenta oba pola sa kliničkom dijagnozom SMA i to 44 (59.4%) ženskog pola i 30 (40.5%) muškog pola. Pacijenti su klasifikovani u određenu kategoriju SMA (tip 1, 2 ili 3). Glavni kriterijum za klasifikaciju bio je mogućnost samostalnog sedenja/hodanja. Dijagnozu SMA tip 1 imalo je 8 (11.3%) pacijenata, SMA tip 2 27 (38%), dok je SMA tip 3 imalo 36 (50.7%). Homozigotna delecije gena SMN1 bila je zastupljena kod 72/74 (97.2%) pacijenta, dok je kod preostalih detektovana jedna kopija ezgona 7 i 8 SMN1 gena (heterozigotni status), u kombinaciji sa tačkastom mutacijom na drugom alelu. Broj kopija SMN2 gena je bio statistički značajno niži kod SMA tip 1 pacijenta nego kod SMA tip 2 i tip 3 pacijenata ($p < 0.001$). Broj kopija gena SMN2 je u korelaciji sa težinom kliničke slike SMA, što se može koristiti kao jedan od prognostičkih parametara kod ovog obolenja.

Ključne reči: SMA, SMN1, broj kopija SMN2 gena, homozigotna delecija.

Uvod

Spinalna mišićna atrofija (SMA) je autozomno recesivna neuromišićna bolest koju odlikuje progresivna denervacija skeletnih mišića usled propadanja alfa-motoneurona i sledstvena pojava hipotonije, mišićne slabosti, atrofije. SMA je najčešće neuromišićno obolenje dečje dobi, nakon Dišenove mišićne distrofije sa prosečnom incidencijom od 1:6000 živorođene dece.^{1,2,3}

Abstract

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disease characterized by progressive skeletal muscle denervation due to deterioration of the alpha-motoneurons and consequently by the occurrence of hypotonia, muscle weakness, atrophy. The aim of our research is to demonstrate the potential impact of SMN2 gene copies on the development of one of the three types of SMA patients in the period from 2001 to 2013 year. The study included 74 patients (44 females and 30 males) fulfilling clinical diagnostic criteria for SMA. The patients were classified in a particular category of SMA (type 1, 2 or 3). Ability to sit/walk unaided was taken as the main criterion in the patient classification. 8 patients were classified as type 1 (11.3%), 27 as type 2 (38%), while 36 (50.7%) as type 3 of SMA. Homozygous gene deletions SMN1 was represented in 72/74 (97.2%) of the patients. Remaining two patients are compound heterozygotes with an absence of one SMN1 allele and a small mutation in the other. The number of SMN2 gene copies was significantly lower in SMA type 1 patients than in SMA type 2 and type 3 patients, which showed a highly statistically significant difference ($p < 0.001$). In this study we found that the number of copies of SMN2 gene correlated with the phenotype of SMA patients by decreasing the severity, which can be used as one of the indispensable prognostic parameters of disease.

Key words: SMA, SMN1, SMN2 gene copy number, homozygous deletion.

SMA se navodi kao jedan od vodećih naslednih uzroka smrti odojčadi, i važi za drugo najčešće fatalno obolenje dece nakon cistične fibroze.^{2,4,5} Obolenje se može javiti na rođenju ili u odraslom dobu. Tradicionala klasifikacija SMA uzima u obzir godine nastanka bolesti, godine preživljavanja, mogućnost kretanja i razvoj ostalih motornih funkcija.^{6,7}

Ozbiljnost bolesti kao i kliničke manifestacije pokazuju kontinuirani raspon od blagih do veoma teških.⁸ Karakteriše se progresivnom simetričnom slabošću mišića koja počinje proksimalno i koja ima tendenciju da se generalizuje. Slabost mišića je udružena sa atrofijom, hipotonijom, odsutnim ili smanjenim refleksima, fascikulacijama, kao i tremorom ruku. Pacijenti su očuvanih intelektualnih funkcija, a kontrakture i spinalni deformiteti su zajednička obeležja svih tipova bolesti. Najozbiljnija komplikacija su plućne infekcije i respiratorna insuficijencija. U odnosu na vreme nastanka, kliničku prezentaciju kao i maksimalni nivo postignute funkcionalnosti, SMA se klasifikuje u sledeće tipove: SMA1, SMA2, SMA3. Na Internacionalnom konzorcijumu za spinalnu mišićnu atrofiju (ISMAL), koji je održan 1992. godine, postavljeni su kriterijumi na bazi kojih je izvršena klasifikacija SMA na tri osnovna tipa vezana za dečiji uzrast.⁸ Werdnig-Hoffmannova bolest, SMA1 ili akutna infantilna forma bolesti, je najteži tip SMA. Najčešće se javlja u prvih šest meseci života, a glavna karakteristika je nemogućnost deteta da uspostavi miljokaz sedenja. Odlikuju je generalizovana mišićna slabost, hipotonija, nenapredovanje, dok slabost interkostalnih mišića rezultuje oslabljenom disajnom funkcijom. Smrt je u prve dve do tri godine života, a sa respiratornom podrškom granice preživljavanja mogu biti pomerene. Kod SMA2, simptomi počinju između 6. i 18. meseca života. Pacijenti razvijaju sposobnost sedenja, ali nikada ne uspostave miljokaz hodanja. Asisitirana ventilacija je često neophodna u kasnijim fazama bolesti. Tip 3, hronična juvenilna ili Kugelberg Welanderova bolest, počinje nakon 18 meseci života. Pacijenti mogu samostalno da hodaju, ali progresija mišićnih slabosti može da dovede do gubitka samostalnog hodanja.⁹ Prikazanoj klasifikaciji vezanoj za dečji uzrast se kasnije dodaje i SMA tip 4 u koju spadaju pacijenti koji imaju početak pojave simptoma u odraslom dobu (posle 18. godine) i blag, hroničan tok bolesti sa slabom progresijom. Stoga je ovaj tip označen kao adultni oblik SMA. Oboleli su sposobni da hodaju u zreloom dobu i nemaju respiratorne i nutricionere problem.^{10,11,12,13}

Gen za SMA mapira na hromozomu 5q13 i naziva se SMN (eng. survivor motor neuron).^{14,15} U genomu čoveka postoje dva tipa SMN gena koje se nalaze u dupliciranom regionu na 5q13: SMN1 gen lokalizovan je telomerno, dok je SMN2 gen smešten centromerno.¹⁶ Kod SMA pacijenta samo SMN1 pokazuje mutaciju, dok je SMN2 gen neizmenjen. U 94% slučajeva radi se o homozigotnoj deleciji egzona 7 i 8 ili samo egzona 7 gena SMN1.¹⁷ U retkim slučajevima (~5%) tačkaste mutacije u jednom alelu SMN1 u kombinaciji sa delecijom na drugom odgovorne su za bolest. Takvi pacijenti su složeni heterozigoti.²⁵ U određenim slučajevima je neophodno koristiti kvantitativne analize za određivanje broja kopija SMN1 gena, radi razlikovanja pacijenata sa jednom ili više kopija. Ukoliko je kod pacijenta dijagnostikovana jedna kopija gena SMN1, indikovano je raditi analizu prisutne SMN1 kopije u cilju identifikacije tačkaste mutacije i konačne potvrde dijagnoze.

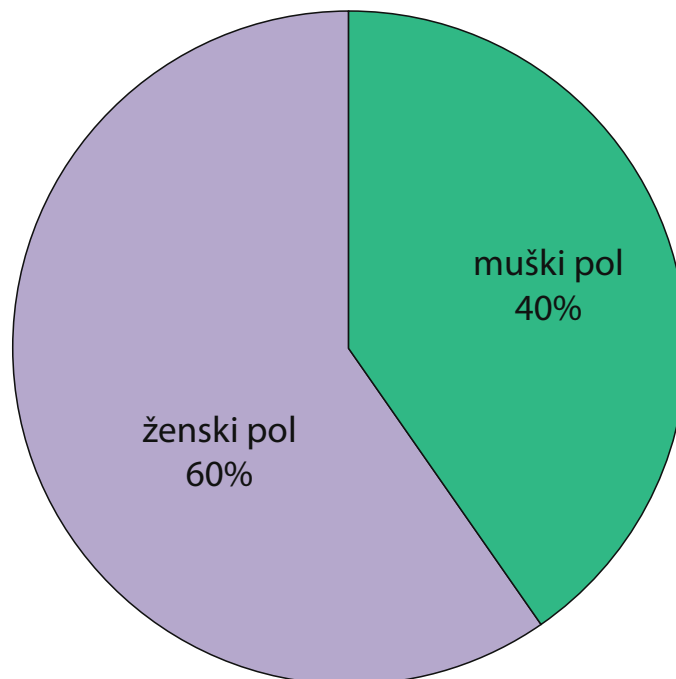
Ono što dodatno doprinosi genetičkoj kompleksnosti SMA je visoka stopa de novo nastalih mutacija u genu SMN1 (~2%) koja je uzrok visoke učestalosti heterozigotnih nosilaca u opštoj populaciji (1/35).¹⁸ Shodno tome, zaključuje se da je nedostatak SMN1 gena glavni krivac za nastanak svih tipova SMA. Saznanje da je broj kopija SMN2 obrnuto proporcionalan težini fenotipa¹⁹ objasnilo je kako mutacija u istom genu može da dovede do razvoja različitih fenotipova u okviru jedne bolesti.

Osim kliničke slike, mišićne biopsije i elektromiografije, genetsko testiranje je ključni korak za dijagnozu ovog neuromišićnog obolenja. Do danas je razvijeno nekoliko različitih metoda za direktno analiziranje broja kopija gena.^{20,21,22} Međutim, najširu primenu poslednjih godina ima multipleks amplifikacija ligiranih proba (MLPA) tehnika. Ona se danas smatra zlatnim standardom u molekularnoj dijagnostici SMA, pružajući lak i brz sistem za analizu SMA regiona kod obolelih, kao i za detekciju zdravih nosilaca.

Studije koje se bave analizom 5q13 regiona pokazuju da broj individualnih kopija gena SMN2 statistički značajno korelira sa fenotipom SMA pacijenata. Shodno ovom saznanju, cilj ovog rada je da ispitamo da li u grupi naših pacijenata broj kopija SMN2 gena bitno utiče na razvoj jednog od tri tipa SMA bolesti.

Materijal i metode

Istraživanje je obuhvatilo 74 pacijenta, 30 muškog pola i 44 ženskog pola (Grafikon 1). Na osnovu postojećih podataka i elemenata iz kliničke slike, nije bilo moguće jasno odrediti kom tipu SMA pripadaju 3 pacijenta. Ostali oboleli su ispunili uslove za klasifikaciju u tipove SMA.



Grafikon 1. Distribucija obolelih od SMA prema polu u ispitivanom uzorku

U studiji su uključeni pacijenti iz perioda od 2001 – 2013 godine sa Klinike za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu.

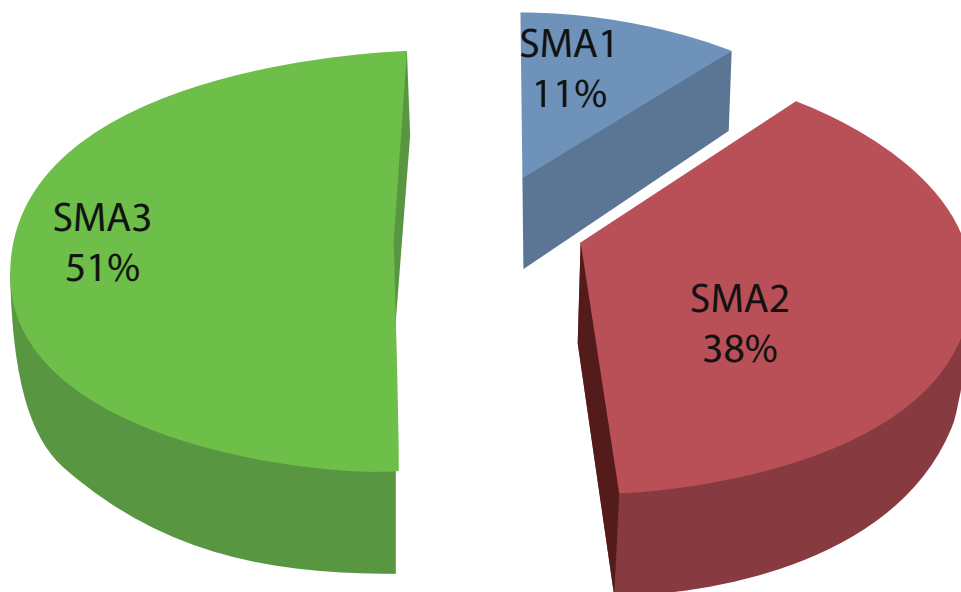
Pacijenti su klasifikovani u određenu kategoriju SMA (tip 1, 2 ili 3) prema kriterijumima definisanim na Internacionalnom konzorcijumu za spinalnu mišićnu atrofiju.[8] Glavni kriterijum na osnovu kog su pacijenti klasifikovani u tipove bolesti se odnosio na mogućnost samostalnog sedenja/hodanja.

MLPA je primenjena u cilju određivanja broja kopija SMN2 gena, kod pacijenata sa prethodno utvrđenom homozigotnom delecijom gena SMN1 korišćenjem SSCP ili MLPA analize.[16] S obzirom da je MLPA relativna kvantifikaciona tehnika, svi testirani uzorci su poređeni sa referentnim uzorcima koristeći Coffalyser softver (MRC- Holland, The Netherlands).

Za analizu podataka primenjene su metode deskriptivne statistike: aritmetička sredina, standardna devijacija, apsolutna i relativna učestalost. Za ispitivanje povezanosti među varijablama upotrebljen je Spirmanov koeficijent korelacije. Raspodela učestalosti homozigotnih delecija gena SMN1, kao i broja kopija gena SMN2 po različitim kliničkim tipovima ispitivanih SMA pacijenata su analizirani korišćenjem Hi-kvadrat (χ^2) testa i Fisherovog testa tačne verovatnoće. Analiza je urađena sa prihvatanjem greške od 5% ($\alpha=0,05$). U analizi je korišćen statistički IBM SPSS softver verzija 21.0.

Rezultati

Od ukupno 74 pacijenta obuhvaćenih istraživanjem, na osnovu postojećih podataka, nije bilo moguće jasno klasifikovati 3 pacijenta u određeni tip SMA. Dijagnozu SMA1 imalo je 8/71 (11.3%) pacijenata, SMA2 27/71 (38%), dok je od SMA tipa 3 obolelo 36/71 (50.7%) pacijenata (Grafikon 2). Medijana starosti iznosila je 15 godina (9-30 godina).



Grafikon 2. Zastupljenost tipova SMA u istraživanju

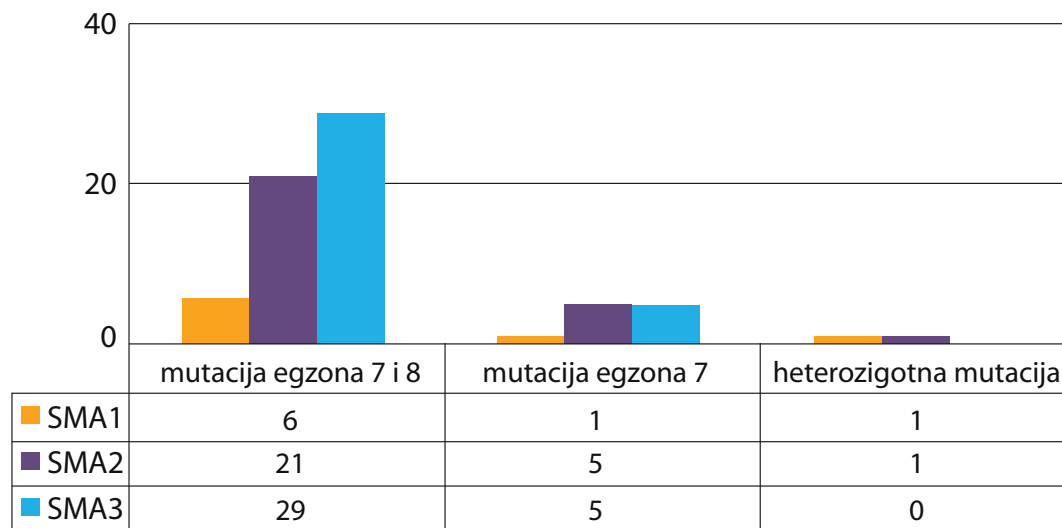
Molekularna analiza sprovedena na prikazanom uzorku SMA pacijenata pokazala je prisustvo homozigotne delecije SMN1 gena kod 72/74 (97.2%) pacijenata, dok su preostala dva pacijenta bila heterozigoti sa jednom kopijom SMN1 gena udruženom sa tačkastom mutacijom na drugom alelu.

U cilju ispitivanja učestalosti homozigotne delecije egzona 7 i delecije egzona 7 i 8 u različitim tipovima SMA, primenom Fisherovog testa tačne verovatnoće pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji delecija egzona 7 samostalno ili u kombinaciji sa egzonom 8 u odnosu na tip SMA ($p=0.834$).

Kod 2 od 74 analiziranih pacijenata nije uočeno prisustvo homozigotne delecije egzona 7 i 8 SMN1 gena. Kod njih je, detektovana jedna kopija egzona 7 i 8 SMN1 gena (heterozigotni status), u kombinaciji sa tačkastom mutacijom na drugom alelu. Procentualna zastupljenost ovih heterozigota je bila 2.8.

Tri pacijenta nisu klasifikovana u tip SMA, te tako njihov broj kopija nije analiziran. Osim kod njih, kod 1 obolelog, sa kliničkom slikom SMA2, broj kopija ovog gena nije određen. Kod preostalih 70 pacijenata, broj kopija SMN2 se kretao u intervalu od 1 do 4 sa sledećim učestalostima: jedna kopija je nađena kod 1/70 (1.42%), dve kopije gena su nađene kod 7/70 ili (10%), tri kopije kod 43/70 (61.4%), dok su četiri kopije bile prisutne kod 19 od ukupno 70 pacijenata (27.1%).

S obzirom na primarni cilj istraživanja, ispitivana je povezanost/korelacija broja prisutnih kopija gena iz 5q13 regiona na fenotipsku ekspresiju bolesti po tipovima SMA. Dve kopije SMN2 gena su nađene kod polovine analiziranih pacijenata sa akutnom formom - 4/8 (50 %) SMA tip 1 pacijenata u poređenju sa samo 1/25 (4%) analiziranih pacijenata sa SMA tip 2 i dva (5.5%) SMA tip 3 pacijenata. Tri kopije SMN2 su nađene kod 23/26 (92%) SMA tip 2 pacijenata i kod 16/36 (44.4 %) pacijenata sa SMA tip 3. Četiri kopije SMN2 su bile najčešće kod bolesti sa najlakšom kliničkom slikom — detektovane su kod 17/36 (47.2%) analiziranih SMA tip 3 pacijenata u poređenju sa 1/26 (4%) analiziranih SMA tip 2 pacijenata i nijednim pacijentom SMA tip 1. Primenom Hi-kvadrat testa dobijena je statistički visoko značajna razlika ($p<0.001$) distribucije SMN2 broja kopija u odnosu na tipove SMA. Broj kopija gena SMN2 je bio značajno niži kod SMA tip 1 pacijenata nego kod SMA tip 2 i tip 3 pacijenata. (Grafikon 3.)



Grafikon 3. Zastupljenost mutacija po tipovima SMA

Diskusija

U našoj studiji najviše pacijenata je bilo sa dijagnozom SMA tip 3 – 50.7%, a potom slede SMA tip 2 sa 38% zastupljenosti i SMA tip 1 sa 8% učestalosti. Rezultati pokazuju da je u analiziranoj grupi pacijenata najučestalija najblaža forma bolesti, za razliku od SMA tip 1, što je verovatno povezano sa znatno lakšom kliničkom prezentacijom, dužim životnim vekom i mogućnošću preživljavanja.

Dobijeni rezultati na ispitivanom uzorku SMA pacijenata iz Srbije, su pokazali prisustvo homozigotne delecije gena SMN1 kod ~ 97% obolelih (72/74) što je u skladu sa studijama u kojima se navodi zastupljenost delecije kod 95% do 98% pacijenata.^{23,24,25} Rezultati analize pokazuju visok procenat zastupljenosti homozigotne delecije gena SMN1 kod obolelih osoba i stoga nedvosmisleno potvrđuju da delecija ovog gena predstavlja glavni uzrok SMA.

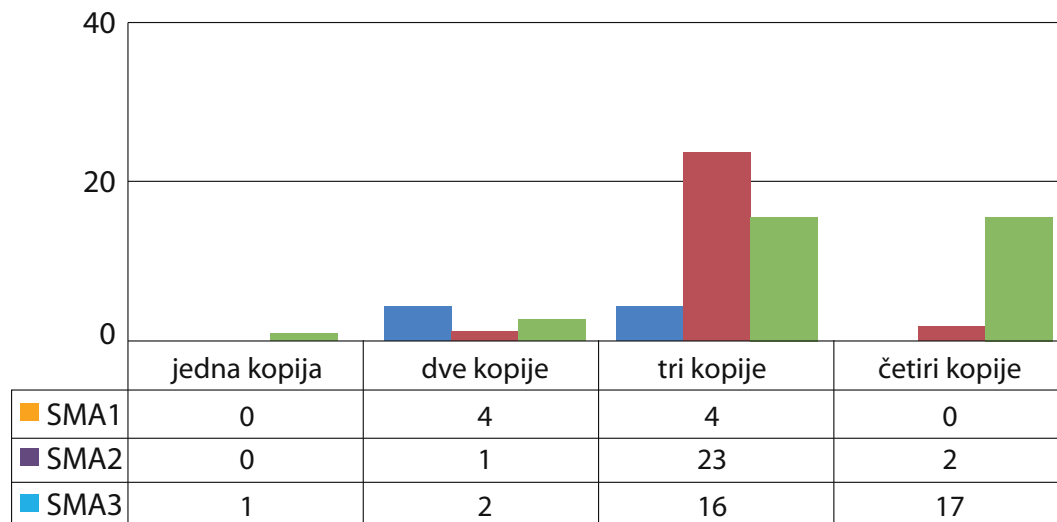
Prema literaturnim podacima, oko 5% pacijenata su nosioci heterozigotne mutacije, odnosno SMN1 delecije jednog alela i moguće tačkaste mutacije drugog.^{27,28} U našoj studiji, primenom MLPA metode, kod 2 (2.8%) pacijenta je utvrđeno prisustvo jedne kopije egzona 7 i 8 SMN1 gena, kao i prisustvo tačkaste mutacije u drugom SMN1 genu i na taj način potvrđena složena heterozigotnost, kao uzrok SMA.

Istraživanja ukazuju na češću pojavu složenih heterozigotnih mutacija kada je u pitanju konsangvinitet. [29] Ukoliko to nije slučaj, pacijenti koji nemaju homozigotnu deleciju bi trebalo da budu testirani na složeni heterozigotni status u SMN1 genu radi preciznog genetskog savetovanja.

U ispitivanoj grupi, delecija koja obuhvata egzone 7 i 8 je bila učestalija (77.9%) od delecije samo egzona 7 (15%). Procentualna zastupljenost delecije egzona 7 u našem istraživanju je nešto veća u odnosu na do sada objavljene studije u kojima se kreće od 7% do 10% SMA.^{30,31,32} Analiza distribucije delecije egzona 7 SMN1 pojedinačno i delecije oba egzona 7 i 8 kod pacijenata je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u tome koji tip delecije je prisutan u različitim SMA tipovima. Ovaj rezultat potvrđuje da je delecija samo egzona 7 dovoljna da dovede do razvoja SMA bilo kog tipa.

U analiziranoj grupi SMA pacijenata, broj kopija SMN2 gena u SMA regionu pokazuje bitne razlike među obolelima različitog fenotipa. Postoji veći broj kopija ovog gena u tipu 2 ili tipu 3 SMA, nego kod SMA tip 1, što je u saglasnostima sa aktuelnim studijama.^{33,23} Polovina pacijenata sa SMA tip 1 je imala dve kopije SMN2 gena, dok su oboleli od SMA 2 i SMA 3 posedovali tri ili četiri kopije (Grafikon 4). Tri kopije gena su dominirale kod pacijenata tipa 2 obolenja, dok su kod pacijenata sa najblažom formom bolesti najučestalije bile četiri kopije SMN2 gena. Lakša forma bolesti koja je praćena većim brojem SMN2

kopija se može objasniti činjenicom da broj kopija SMN2 delimično kompenzuje deleciju SMN1 gena, te tako ima uticaj na ozbiljnost oboljenja.



Grafikon 4. Distribucija broja kopija SMN2 gena po tipovima SMA

Ono što bismo izdvojili je zapažanje da se i tipu 2 SMA javljaju dva pacijenta sa 4 kopije gena. Objašnjenje koje može da sledi je da, iako je broj kopija SMN2 u korelaciji sa težinom bolesti, nije isključeno da same SMN2 kopije nisu funkcionalno ekvivalentne te tako produkuju različite količine funkcionalnog proteina SMN.³⁴ Razvojem novih metoda za kvantitativno određivanje broja kopija gena pokazano je da između težine kliničke slike i broja genskih kopija SMN2 postoji inverzna korelacija, što pokazuju i rezultati naše studije.^{19,23,35,36}

Zaključak

Ovim istraživanjem uspostavljena je značajna korelacija između broja kopija SMN2 gena i fenotipa SMA pacijenata. Zasigurno je da postoje i drugi faktori koji mogu da utiču na kliničku ekspresiju bolesti, te stoga, uzimajući u obzir njenu genetičku osnovu, sve veću zastupljenost asimptomatskih heterozigotnih nosilaca delecije SMN1 gena u populaciji, ali i činjenicu da još uvek ne postoji adekvatna kauzalna terapija, genetsko testiranje treba da bude ključni korak za dijagnozu ovog neuromišićnog oboljenja i za adekvatno genetsko savetovanje.

Literatura

1. Dian K. Nurputra, Poh San Lai et al. Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials. *Annals of Human Genetics*; 2013. p. 435–463.
2. Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 2002;111:477–500.
3. Thomas W. Prior, Pamela J. Snyder, Britton D. Rink et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *American Journal of Medical Genetics Part A*; 2010. p. 1608–1616.
4. Farah Ashrafzadeh, Ariane Sadr-Nabavi, Nazanin Asadian et al. *International Journal of Pediatrics*; 2014. p. 211-215.
5. Melki J, Abdelhak S, Sheth P. et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*. 1990; 344(6268):767–768.
6. Mesfin, Sponseller, A.I. Leet. Spinal muscular atrophy: manifestations and management. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*; 2012. p. 393–401.
7. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*. 1980; 1(8174):919–922.

8. Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord.* 1992; 2:423-428.
9. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E. et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci* 1997; 146:67-72.
10. Nigro MA. Spinal muscular atrophy. In (eds): Maria BL. *Current Management in Child Neurology*, Third Edition. BC Decker Inc, London, UK, 2005; Chapter 60.
11. Russman BS. Spinal Muscular Atrophy: Clinical Classification and Disease Heterogeneity. *J Child Neurol* 2007; 22:946-51.
12. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD. et al. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 2011; 6:71.
13. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy: A Timely Review. *Arch Neurol* 2011; 68:979-84.
14. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 1990; 344:540-41.
15. Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990; 345:823-25.
16. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80:155-65.
17. Wirth B. An Update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Hum Mutat* 2000; 15:228-37.
18. Ogino S, Wilson RB, Gold B. New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region: simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet* 2004b; 12:1015-23.
19. Mailman MD, Heinz JW, Papp AC et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med* 2002; 4:20-6.
20. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R. et al. 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: 358-68.
21. Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S. et al. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat* 2003; 22:74.
22. Su YN, Hung CC, Li H. et al. Quantitative Analysis of SMN1 and SMN2 Genes Based on DHPLC: A Highly Efficient and Reliable Carrier-Screening Test. *Hum Mutat* 2005; 25:460-67.
23. Campbell L, Potter A, Ignatius J. et al. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997; 61:40-50.
24. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1:19-29.
25. Wirth B, Herz M, Wetter A. et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:1340-1356.
26. Burghes AH. When Is a Deletion Not a Deletion? When It Is Converted. *Am J Hum Genet* 1997; 61:9-15.
27. Qu YJ, Song F, Yang YL. et al. Compound heterozygous mutation in two unrelated cases of Chinese spinal muscular atrophy patients. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(3):385-9.
28. Clermont O, Bulet P, Benit P. et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat* 2004; 24:417-27.
29. Susan M Kirwin, Kathy M B Vinette, Iris L Gonzalez et al. A homozygous double mutation in SMN1: a complicated genetic diagnosis of SMA. *Mol Genet Genomic Med.* 2013; 1(2):113-117.
30. Sabine Rudnik-Schöneborn, Thomas Eggermann, Wolfram Kress et al. Clinical utility gene card for: Proximal spinal muscular atrophy (SMA) – update 2015. *European Journal of Human Genetics* 2012; 20(6).
31. Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P. et al. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1995; 57:805-8.
32. Rodrigues NR, Owen N, Talbot K. et al. Gene deletion in spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1996; 33(2):93-6.
33. Yamashita M, Nishio H, Harada Y, Matsuo M, Yamamoto T. Significant increase in the number of the SMN2 gene copies in an adult-onset Type III spinal muscular atrophy patient with homozygous deletion of the NAIP gene. *Eur Neurol* 2004; 52:101-6.
34. Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T. et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 2002; 249:1211-9.

35. Thomas W. Prior, Adrian R. Krainer, Yimin Hua et al. A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(3): 408–413.
36. Brkusanin M, Kosac A, Jovanovic V, Pesovic J, Brajuskovic G, Dimitrijevic N et al. Joint effect of the SMN2 and SERF1A genes on childhood-onset types of spinal muscular atrophy in Serbia patients. *Journal of Human Genetics* 2015; doi:10.1038/jhg.2015.104

Autor za korespondenciju:

Vedrana Milić Rašić, profesor na Medicinskom fakultetu u Beogradu;

Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu,

Dr Subotića 6A, 11000 Beograd, Srbija;

Tel: +381 11 2658 355;

email adresa: vedrana.milic.npk@gmail.com.