

Spinalna mišićna atrofija – molekularna genetika u dijagnostici i terapiji

Nina Barišić, Vanja Ivanović, Ivan Lehman, Petra Grđan*

Spinalna mišićna atrofija je autosomno recesivna bolest karakterizirana degeneracijom donjeg alfa- motoneurona. Bolest uzrokuje mutacija gena SMN1 koji se nalazi na kromosomu 5q, čiji produkt je protein SMN (survival motor neuron). Gen SMN2 je kopija gena SMN1, ali njegovom transkripcijom i translacijom nastaje samo 10-15% funkcionalnog proteina SMN zbog „tihe“ mutacije unutar gena i isključenja egzona 7 iz translacijskog procesa. Mehanizam je poznat kao alternativni splicing. SMN2 je moćan modifikator bolesti. Broj SMN2 kopija je značajan za težinu bolesti. Terapijski cilj je povećanje ekspresije i funkcije proteina SMN. Protusmjerni oligonukleotidi (AON) usmjereni su na uključivanje egzona 7 u SMN2 mRNA, popravak defekta RNA, aktivaciju transkripcije SMN2 te sprečavanja degradacije SMN-a, što dovodi do stvaranja stabilnog i funkcionalnog proteina. Ekspresija proteina SMN1 povećava se i u perifernim tkivima i u središnjem živčanom sustavu nakon i.m. primjene gena SMN pomoću adenovirusnog vektora AAV9, značajno produljujući preživljavanje u eksperimentalnih životinja sa SMA-om. Ova jednostavna i praktična metoda prijenosa gena potencijalno je značajna za liječenje degenerativnih bolesti motoneurona u djece i odraslih.

Ključne riječi: muskularna atrofija, spinalna; motoneuron, gama; molekularna biologija; dijagnoza; terapija

UVOD

Spinalna mišićna atrofija (SMA) nasljedna je bolest. Ujedno je i najčešća autosomno recesivna bolest koja uzrokuje smrtni ishod u prvim godinama života. Riječ je o bolesti karakteriziranoj degeneracijom donjeg alfa-motoneurona. Njezina je incidencija oko 1:6000 do 1:11000 živorođenih, dok je prevalencija nositelja (heterozigota) oko 1:40-50, najčešće u bijelaca (1). S obzirom na patofiziološki proces degeneracije donjeg motoneurona, kliničku manifestaciju bolesti obilježavaju hipotonija, hipo- ili arefleksija i mišićna slabost. U djece su najčešće spinalne mišićne atrofije koje zahvaćaju proksimalne skupine mišića (2). Novija istraživanja upućuju na presinaptički poremećaj neuromuskularne transmisije, nedostatak proprioceptivnih senzornih neurona u kralježničkoj moždini, kao i na poremećaj u maturaciji motorne jedinice/mišićnog vlakna kao moguće patofiziološke procese u spinalnoj mišićnoj atrofiji te ulogu faktora rasta sličnog inzulinu kao i superoksid dismutaze (3, 4, 5, 6). Jedan od prvih događaja koji se može uočiti u eksperimentalnom modelu miša sa SMA-om je poremećaj na razini neuromuskularne spojnice. Unatoč činjenici da je broj NMS-a normalan, njihova struktura i funkcija su poremećene, a izostaje i maturacija primitivne sinapse. Nakon toga

slijedi gubitak neuromuskularne sinapse, denervacija mišića i razvoj SMA-a.

Lokalizacija proteina važna je i za razumijevanje funkcije. SMN se nalazi u granulama u Golgijevom aparatu. Elektronskim mikroskopom može se pokazati da se SMN granule transportiraju i migriraju strukturama unutar Golgijeva aparata (7). Granule se ponašaju kao sekretorne, a blokiranje sekrecije rezultira u smanjenoj razini SMN proteina u neuritima, onemogućujući rast te oponašajući nedostatak proteina u neuronima.

Monogenske bolesti su često modulirane različitim drugim genetičkim, epigenetičkim i ekstrinzičnim faktorima, što dovodi do ekstenzivne fenotipske varijabilnosti i potencijalne zaštite od tzv. nekompletne penetracije. Analiza cijelog transkriptoma, genoma, egzoma ili proteoma izrazito diskordantnih fenotipova mogu omogućiti identifikaciju genskih modifikatora (8).

* Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Zagreb, Hrvatska

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Nina Barišić, Klinika za pedijatriju, Zavod za dječju neurologiju, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, E-mail: barisic.nina@gmail.com

Primljeno/Received: 29. 10. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 19. 11. 2013.

Dijagnoza se potvrđuje molekularno genetičkom analizom, a dijagnostički postupak obuhvaća i elektromioneurografiju i analizu biopтата mišića, koji su sukladni u 98% slučajeva. Elektrofiziološki nalazi pokazuju znakove denervacije, koji se manifestiraju spontanom aktivnošću, fibrilacijama i fascikulacijama te visokom amplitudom akcijskih potencijala motornih jedinica. Histopatološki se nađu atrofična mišićna vlakna s prisutnim tipnim grupiranjem, a u prednjim rogovima kralježnične moždine značajno je smanjen broj neurona. Klinički se razlikuju nekoliko tipova proksimalne SMA-a; SMA 0, I., II., III. i tip IV., pri čemu je SMA 0 najteži oblik bolesti koji se očituje mišićnom slabošću već pri rođenju. Praktičnija podjela zasnovana je na dosegnutom stupnju motoričkog razvoja, odnosno ona razlikuje bolesnike koji ne mogu sjediti ni stajati (engl. *non sitter non walker*), koji mogu samostalno sjediti (engl. *sitters*) te one koji mogu hodati (engl. *walkers*). SMA I ili Werdnig-Hoffmanova bolest najčešći je oblik bolesti (50% SMA-a). Manifestira se u prvih 6 mjeseci života, međutim simptomi su prisutni već unutar maternično i očituju se oskudnim pokretima fetusa. Dob preživljavanja u prosjeku je do 2. godine života, no napretkom suportivne njege te formiranjem standarda liječenja ona se produljuje, i to u 32% do 2. godine života, u 18% do 4. godine te u 8% do 10. godine života (9). Rizik ranog smrtnog ishoda smanjuje se u rođenih poslije 1995. godine, čemu je posebno pridonijela primjena neinvazivne ventilacije. U bolesnika je izražena teška hipotonija, koja je simetrična, te tihi plač. Samostalno sjedenje nije moguće. Otežano (paradoksalno) disanje uzrokovano je paralizom interkostalnih mišića s pošteđenom dijafragmom. Fascikulacije jezika uzrokovane su bulbarnom denervacijom kao i otežano sisanje i gutanje, a zbog ugroženosti sigurnosti dišnih putova povećana je učestalost aspiracija te posljednjih pneumonija (2). U SMA bolesnika nalaze se katkada udruženi hipoplastično lijevo srce, atrijalni i ventrikularni septalni defekti, aritmije, srčani blok i dilatativna kardiomiopatija (10).

SMA II. intermedijarni je oblik bolesti koji se javlja kasnije, nakon trećeg mjeseca života. Djeca mogu samostalno sjediti, neki čak mogu i stajati, obično uz pomoć odgovarajućih ortoza, dok samostalni hod nije moguć. Razvija se kifoskolioza, fini tremor, mogu biti prisutni i bulbarni simptomi kao i razvoj respiratorne insuficijencije.

SMA III. ili Wohlfart-Kugelberg-Welanderova bolest klinički je heterogeniji oblik bolesti, očituje se kada dijete prohoda, obično nakon 18 mjeseci života. Moguće je doseći sve stupnjeve motoričkog razvoja s kasnijom progresijom i potrebom za invalidskim kolicima. Također je moguć razvoj skolioze i znakova artropatije zbog hipotonije i povećanog opterećenja zglobova.

SMA IV. ili adultni oblik manifestira se u drugom desetljeću, karakterizira ga blago progresivni tijek.

MOLEKULARNA GENETIKA

Povijest genetike SMA-a počinje 1990. godine kada je identificiran lokus 5q13 kao mogući genetički uzrok spinalne mišićne atrofije. Istraživanja sljedećih 5 godina konačno dovede do otkrića gena *SMN* (*survival motor neuron gene*). Humani genom sadrži više kopija gena *SMN*. Normalno, jedan kromosom sadrži jednu kopiju gena koji nazivamo *SMN1* i koji se nalazi na navedenom lokusu telomernije u odnosu na jednu ili više kopija gena *SMN2*. *SMN1* i *SMN2* razlikuju se u 5 parova baza u egzonu 7 koji ne mijenja aminokiselinu, ali mijenja modulator vezivanja (*splicing modulator*). Većina *SMN2* transkripata ne sadrži egzon 7 i stoga se *SMN* protein ne može efikasno oligomerizirati te je stoga degradiran. Zanimljivo je da je razlika između *SMN1* i *SMN2* u samo 5 parova baza. Kopije gena *SMN* na 5. kromosomu javljaju se samo u primata. Miš kao eksperimentalna životinja ima samo jednu kopiju koja se naziva *Smn* (11, 12). Gen *SMN2* postoji samo u ljudi. Kako *SMN1* tako i *SMN2* sastoje se od devet egzona i osam introna. Veličina gena je oko 20 kb, protein *SMN* sadrži 294 aminokiseline. Velika većina bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom, njih oko 98%, ima homozigotnu deleciju, reorganizacije ili točkaste mutacije gena *SMN1*. Značajno je da je u gotovo svih bolesnika zadržana barem jedna kopija gena *SMN2* (2, 13). *SMN2* prolazi drukčijim putem transkripcije, što nazivamo alternativni *splicing*. Posljedično tome, mRNA gena *SMN2* ne sadrži egzon 7 (najčešće) ili egzon 5, a moguće i oba egzona, koji su prisutni u mRNA gena *SMN1*. Alternativni *splicing* gena *SMN2* uzrokovan je jednim različitim parom baza (od pet postojećih) u egzonu 7. Postoje faktori koji se vežu na pre mRNA sekvencu i uzrokuju pojačano (*splicing enhancer*) ili smanjuju (*splicing silencer*) spajanje egzona ili introna. Dakle postoje pozitivni ili negativni regulatori *splicinga*. Unutar nekih od njih postoje inačice u pojedinačnim nukleotidima koje djeluju na aktivnost regulatora *splicinga*.

Protein koji nastaje translacijom alternativne mRNA nazivamo protein *SMN Δ 7*, s obzirom na izostanak egzona 7. *SMN Δ 7* nije funkcionalan i podliježe brzom razgradnji. Ipak, oko jedne desetine premRNA gena *SMN2* izrezuje se (*splicing*) u protein *SMN*. Štoviše, moguće je da se gen *SMN2* „ispravno“ translira u protein *SMN* (a ne u *SMN Δ 7*) i u većoj mjeri, čak do 50%. Poznati su mogući molekularni mehanizmi za alternativni *splicing* gena *SMN* (13, 14).

Protein *SMN* eksprimiran je u jezgri i citoplazmi svih somatskih stanica, ali u najvećoj količini nalazi se u alfa motoričkim neuronima. Njegova funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Sudjeluje u staničnim funkcijama obrade mRNA. Interakcija *SMN* s geminom 2 osnova je za formaciju velikih heteromernih kompleksa koji sudjeluju u biogenezi ribo-

nukleoproteina. SMN je značajan u transkripciji i rekombinaciji DNA, vezikularnom transportu i transdukciji signala.

Neke od tih funkcija karakteristične su za motoneurone, što je odgovorno za kliničku prezentaciju homozigotne disrupcije gena *SMN1*, odnosno SMA. SMN je značajan za aksonski transport i razvoj neurona i neurita. Razina SMN-a značajno je visoka za vrijeme embrionalnog i fetalnog razvoja i smanjuje se 2 tjedna postnatalno.

Točna funkcija *SMN2* je još i sad nepoznata, no vjerojatno ima ulogu u staničnom metabolizmu. Delecija *SMN2* udružena je s većom učestalošću ALS-a i bolešću donjeg motoneurona.

SMN se kreće poput sekretornih granula i vjerojatno je sastavni dio Golgijeva aparata, smanjenje sekrecije uzrok je smanjenja SMN proteina. Superoksid dismutaza SOD 1 koja uzrokuje obiteljski oblik ALS-a uzrokuje promjenu subcelularne lokalizacije SMN proteina i onemogućuje regrutaciju Cajalovih tjelešaca, onemogućujući formiranje nuklearnih gemova.

Spoznaja o genetičko kliničkom korelatu SMN – SMA odredila je dijagnostički algoritam za spinalnu mišićnu atrofiju. U bolesnika s kliničkim karakteristikama spinalne mišićne atrofije potrebno je provesti genetičku analizu za homozigotnu deleciju gena *SMN1*. Bolesnici s kliničkom slikom SMA-a, koji su heterozigoti za deleciju gena *SMN1* kandidati su za sekvenciranje postojeće kopije gena, odnosno tražanje za točkastim mutacijama. Ako se ne detektira delecija gena *SMN1*, ponajprije je potrebno isključiti druge bolesti sa sličnom kliničkom manifestacijom. One obuhvaćaju neuropatije (demijelinizirajuće i aksonalne), druge bolesti motoneurona (distalni SMA, spinalna mišićna atrofija s respiratornim distresom (engl. *spinal muscular atrophy with respiratory distress*) - SMARD), amiotrofička lateralna skleroza (ALS), bolesti središnjeg živčanog sustava. Tada je potrebno sekvencirati obje kopije gena *SMN1*, očekujući sa značajnom vjerojatnošću homozigotne točkaste mutacije kao uzrok bolesti. Ako se one ne potvrde, nije potvrđena ni dijagnoza bolesti (SMA) (15). Molekularni mehanizmi disrupcije gena *SMN1* ne mogu objasniti heterogenost kliničke slike SMA-a. Proučavanjem nestabilne regije na lokusu 5q13 humanog genoma utvrđena je mogućnost postojanja višestrukih preslika gena *SMN2*. Ubacivanje višestrukih kopija humanog gena *SMN2* (njih 8) u genom miša s homozigotnom delecijom mišjeg gena *Smn* sprječava ekspresiju bolesti. Proučavanjem genoma bolesnika sa SMA-om utvrđeno je da je težina bolesti obrnuto proporcionalna s brojem kopija gena *SMN2*, koji stoga služi kao biomarker težine bolesti. Bolesnici koji boluju od SMA-a tip 1 sadržavaju dvije kopije gena *SMN2*, SMA tip 2 sadrži dvije ili tri kopije, dok SMA tip 3 sadrži tipično tri ili više kopija gena *SMN2*. Bolesnici s pet ili više kopija gena *SMN2* su asimptomski, ali u njih postoji 50%

vjerojatnosti da su nositelji mutacije. Navedeni odnos nije uvijek linearan ni prognostički značajan, što pretpostavlja ulogu i drugih čimbenika u modifikaciji korelacije genotip - fenotip. Identificirane su inačice gena *SMN2* koje rezultiraju povećanom produkcijom SMN proteina pune duljine. Početno inačice 859G>C u egzonu 7 gena *SMN*, koja produljuje SMN proteinski transkript za 20% i nalazi se u bolesnika s blagim fenotipom, a očituje se u 2 kopije u tipu 3b, u 2 kopije u tipu 2 i ne pojavljuje se u tipu 1. Produljenje transkripta za 25% rezultira normalnim fenotipom. Postoje i modifikatori koji se nalaze izvan SMN lokusa, te tako uzrokuju da haploidni srodnici s istim brojem kopija imaju različitu težinu bolesti. Glasnički RNA plastina 3 značajno je povišen u blagim oblicima bolesti, no visoke vrijednosti plastina se nalaze u ženske djece s težim SMA fenotipom. Moguće je da je plastin 3 modifikator genske ekspresije s nepotpunom penetracijom ovisan o spolu.

Prenositelji imaju jedan mutirani alel gena *SMN1*, a u 2-4% riječ je o svježoj mutaciji. No postoje prenositelji 2+0, tj. imaju oba *SMN1* alela na jednom kromosomu, a mutirani na drugom. Skrining za prenositelje primjenjuje metodu osjetljivu na dozu kojom se određuje broj *SMN1* kopija. Učestalost prenositelja ovisna je o etničkom podrijetlu. Metodom se otkriva 71-94% prenositelja jer se ne mogu identificirati 2+0 prenositelji koji imaju 2 kopije gena *SMN1* na jednom kromosomu 5, a deleciju na drugom (16).

SMARD distalni je oblik spinalne mišićne distrofije udružene s paralizom ošita. Uzrokovana je mutacijom gena za imunoglobulin μ -binding protein 2 (IGHMBP2), smještenog na kromosomu 11q13.2. Gen se sastoji od 15 egzona, dok protein IGHMBP2 sadrži 993 aminokiseline čija se uloga očituje u procesiranju mRNA i regulaciji transkripcije DNA te sintezi imunoglobulina. Klinički je karakteriziran intrauterinim zaoštatakom u rastu, nedonošenošću, slabim plaćem, deformitetima stopala, progresivnom slabošću distalnih skupina mišića, disfunkcijom autonomnog živčanog sustava, respiratornom insuficijencijom (1. do 6. mjeseca života) uzrokovanom paralizom ošita te posljedično tome potrebom za ireverzibilnim strojnim disanjem. Prognoza je loša, međutim nakon progresije do 2. godine života, bolest ima relativno stacionaran tijek (17, 18, 19).

TERAPIJSKI PRISTUPI – EKSPERIMENTALNE I KLINIČKE STUDIJE

Terapijski pristupi brojnih multicentričnih kliničkih i eksperimentalnih studija baziraju se na nekoliko mehanizama: neuroprotekcija, povećanje mišićne snage i mase, povećanje transkripcije gena *SMN2* u SMN protein i ostali mehanizmi, uključujući terapiju matičnim stanicama, no zasada još nema učinkovite terapije (20).

Neuroprotekcija uključuje mehanizme uključivanja egzona 7 u SMN2 mRNA transkripte, aktivaciju promotora transkripcije SMN2 te sprječavanje degradacije proteina SMN.

Riluzol, inhibitor presinaptičkog oslobađanja glutamata, pokazao je umjeren neuroprotektivni učinak u sedmero SMA I. bolesnika te produljenje životnog vijeka u troje bolesnika do 64 mjeseci, no bez povoljnog učinka na kakvoću života (20, 21). Pozitivan učinak utvrđen je i primjenom gabapentina u SMA II. i III. bolesnika tijekom 12 mjeseci, također djelovanjem na smanjenje oslobađanja glutamata. Tireotropin-rilizing hormon (TRH), koji ima neurotrofički učinak na donji motoneuron doveo je do značajnog poboljšanja u šestoro SMA bolesnika kroz 5 tjedana njegove primjene. Olesoksim, molekula slična kolesterolu, koja blokira apoptozu modulacijom permeabilnosti mitohondrijskih tranzicijskih pora, trenutno je u fazi ispitivanja (20).

Albuterol, kao i drugi beta-agonisti, potiču uključivanje egzona 7 u SMN2 transkripte i djeluju kao stimulatori gena *SMN2*, dovode do povećanja mišićne snage i mase te poboljšanja plućne funkcije. Izvršene su otvorene studije s 13-ero, odnosno 23-je bolesnika (u dobi od 30 mjeseci do 6 godina) koji boluju od SMA-a II. ili III., tijekom 6 odnosno 12 mjeseci. Također se ispituje pozitivan učinak albuterola na povećanje mišićne snage u bolesnika oboljelih od DMD, LGMD-a i FSHD -a (20, 22, 23). Osnovni molekularni mehanizmi koji vode k povećanju transkripcije gena *SMN2* u protein SMN su: uključivanje egzona 7 u SMN2 mRNA transkripte, aktivacija promotora transkripcije gena *SMN2*, modulacija translacije proteina SMN kao i sprječavanje degradacije proteina SMN.

Aklarubicin je tetraciklinski citostatik za koji je utvrđeno da povećava uključivanje egzona 7 u mRNA gena *SMN2*, no zbog svoje toksičnosti nije prihvatljiv. Za natrij butirat je utvrđeno da utječe na acetilaciju histonskih proteina, čime povećava ekspresiju gena *SMN2* i uključivanje egzona 7, no zbog kratkog poluvijeka u ljudskoj plazmi ne može imati praktičnu primjenu. Epigenetički modifikatori povećavaju ekspresiju gena *SMN* *in vivo* i *in vitro*, što je povezano s povećanom acetilacijom histona i remodeliranjem kromatina koji okružuje promotor gena *SMN*. Ohrabrujući rezultati s modifikatorima acetilacije histona doveli su do otkrića spojeva koji bi mogli imati sličan učinak kao što je hidroksisureja koja djeluje kao inhibitor deacetilacije histona, inhibirajući RNA reduktazu, a djelotvorna je osobito u SMA I (20). Valproična kiselina koja je otprije poznata kao antiepileptik, osim što ima slično djelovanje kao i natrij butirat, djeluje na upregulaciju nekih antiapoptotičkih faktora kao što su Bcl-2 i Bcl-xl te smanjuje degeneraciju motornih neurona, atrofiju mišića i motoričku disfunkciju u SMA miševa. U kontroliranim prospektivnim studijama pri ispitivanju učinka na SMN 1, 2 i 3 u kombinaciji s L-karnitinom nije nađena razlika u

usporedbi s placebo (24). Načela terapije obuhvaćaju korekciju aberantnog spajanja i manipulaciju transkripcije te stabilizaciju mRNA i SMN.

Protusmjerni oligonukleotidi (AON) pobudili su veliku pozornost u liječenju SMA-a, ali i drugih neuromuskularnih bolesti zbog svojeg učinka na uključivanje egzona 7 u SMN2 mRNA, popravak defekta RNA, aktivacije promotora transkripcije SMN2, sprječavanja degradacije i povećanje količine proteina SMN, što posljedično dovodi do stvaranja stabilnog i funkcionalnog proteina, prelaze krvno-moždanu barijeru, a u tijeku su ispitivanja njihove primjene u perifernim tkivima (25). Detektirani su modifikatori spajanja odnosno terički blok koji povećava retenciju egzona i rezultiraju u mRNA sekvenci pune duljine. ASO-i kojima je cilj djelovanje na odgovarajuće motive omogućili su održanje/rescue normalizaciju fenotipa na eksperimentalnim modelima (26).

Intervencije kojima je cilj ispravljanje aberantnog spajanja sastoje se u promoviranju retencije egzona 7 i povećanju količine SMN2 pune duljine. Utišivači prekrajanja su osnovni cilj AON-a jedan od njih nalazi se na SMN2 intronu 7. Utišavanje navedenog motiva omogućuje retenciju egzona 7 i produkciju SMN proteina (27). Fosforodiamidat morfolino oligonukleotidi omogućili su spašavanje fenotipa u teškom obliku SMA-a u eksperimentalnoj životinji nakon intracerebroventrikularne primjene te značajno produljenje života.

Nuspojave terapije AON-a, koja se treba primjenjivati jedan put na mjesec, bile su uglavnom povezane s disfunkcijom autonomnog sustava (prijažam, retencija, opstrukcija crijeva i nekroza prstiju).

Liječenje hiperoksijom u miševa povećali su uključivanje egzona 7 gena *SMN2* u skeletne mišiće, što je rezultiralo povećanjem motoričke funkcije (28).

Rezultati istraživanja genske terapije, služeći se lentivirusom AAV9 SMN1 kao vektorom, kao i matičnim stanicama, gdje se iz pluripotentnih stanica generiraju motoneuroni kao i njihova primjena u ljudskoj populaciji tek se očekuju (29). Dosadašnji rezultati upućuju na to da se ekspresija SMN1 proteina značajno povećava i u perifernim tkivima i u središnjem živčanom sustavu nakon i.m. primjene gena pomoću AAV9, produljujući preživljavanje do 163 dana umjesto 12 bez terapije nakon i.m. primjene, a nakon i.v. do 400 dana. Nakon i.m. primjene dolazi do retrogradnog aksonalnog transporta virusa do motoneurona (30).

Virus posjeduje sposobnost prelaska krvno-moždane barijere i rezultira brzom ekspresijom i uspješnim prijenosom u motoneurone u različitim regijama kralježnične moždine. Preklinička istraživanja upućuju na sigurnost *self complementary* (sc) AAV9 SMN. Postoji mogućnost da će jednokratna doza biti dovoljna za dugotrajnu ekspresiju.

ZAKLJUČAK

Spinalna mišićna atrofija (SMA) nasljedna je bolest koja je ujedno i najčešća autosomno recesivna bolest što uzrokuje smrtni ishod u prvim godinama života. Gubitak ili mutacija gena *SMN1* uzrokuje SMA. Većina bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom ima homozigotnu mutaciju delecije, reorganizacije ili točkaste mutacije gena *SMN1*. Skrining za prenositelje primjenjuje metodu osjetljivu na dozu kojom se određuje broj *SMN1* kopija. Genska terapija SMA-a obuhvaća metode reparacije i nadoknade/zamjene mutiranog gena viralnim vektorom. Uključivanje egzona 7 u *SMN2* mRNA transkripte, aktivacija promotora transkripcije gena *SMN2*, modulacija translacije proteina SMN kao i sprječavanje degradacije proteina SMN molekularni su mehanizmi povećanja transkripcije gena *SMN2* u protein SMN. Klinička istraživanja genske terapije u bolesnika sa SMA-om, služeći se lentivirusom AAV9 *SMN1* kao vektorom, kao i matičnim stanicama, gdje se iz pluripotentnih stanica generiraju motoneuroni su u tijeku i njihovi se rezultati tek očekuju s nadom da će biti dugotrajno uspješni.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Barišić N. – strukturiranje i pisanje rada, analiza i tumačenje podataka/*structuring and writing paper, analysis and interpretation of data*
Ivanović V. – pisanje rada, pretraživanje literature/*writing paper, literature search*

Lehman I., Grđan P. – pretraživanje literature, obrada podataka/*literature search, data processing*

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./*All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *Lancet Neurol.* 2012;11:443-52. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70061-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70061-3)
- Barišić N. Spinalne mišićne atrofije. U: Barišić N i sur. *Pedijatrijska neurologija*. 1. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009:358-62.
- Cifuentes-Diaz C, Bitoun M, Goudou D, et al. Neuromuscular expression of the BTB/POZ and zinc finger protein myoneurin. *Muscle Nerve.* 2004;29:59-65. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.10526> PMID:14694499
- Ling KK, Lin MY, Zingg B, Feng Z, Ko CP. Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One.* 2010;11:e15457. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015457> PMID:21085654 PMCID:PMC2978709
- Kong L, Wang X, Choe DW, et al. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 2009;29:842-51. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4434-08.2009> PMID:19158308 PMCID:PMC2746673
- Kariya S, Re DB, Jacquier A, Nelson K, Przedborski S, Monani UR. Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Hum Mol Genet.* 2012;21:3421-34. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/dds174> PMID:22581780 PMCID:PMC3392116
- Chen-Hung Ting, Hsin-Lan Wen, Hui-Chun Liu, et al. The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Golgi network. *PLOS One.* 2012;7:e51826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051826> PMID:23284781 PMCID:PMC3524123
- Wirth B, Garbes L, Riessland M. How genetic modifiers influence the phenotype of spinal muscular atrophy and suggest future therapeutic approaches. *Curr Opin Genet Dev.* 2013;23:330-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2013.03.003> PMID:23602330
- Zerres K, Rudnik-Schöneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol.* 1995;52:518-23. <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1995.00540290108025> PMID:7733848
- Shababi M, Habibi J, Yang HT, Vale SM, Sewell WA, Lorson CL. Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet.* 2010;19:4059-71. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq329> PMID:20696672
- Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, et al. Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1063-75. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddm379>
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000;9:333-9. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>
- Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol.* 2011;68:979-84. <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.74> PMID:21482919
- Singh NN, Singh RN. Alternative splicing in spinal muscular atrophy underscores the role of an intron definition model. *RNA Biol.* 2011;8:600-6. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.8.4.16224> PMID:21654213 PMCID:PMC3225979
- D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:71. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-6-71>
- Luo M, Liu L, Peter I. An Ashkenazi Jewish *SMN1* haplotype specific to duplication alleles improves pan-ethnic carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2013.84>
- Kaindl AM, Guenther UP, Rudnik-Schöneborn S, et al. Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *J Child Neurol.*

- 2008;23:199-204.
<http://dx.doi.org/10.1177/0883073807310989>
 PMID:18263757
18. Eckart M, Guenther UP, Idkowiak J, et al. The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Pediatrics*. 2012;129:e148-56.
<http://dx.doi.org/10.1542/peds.2011-0544>
 19. Grohmann K, Varon R, Stolz P, et al. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Ann Neurol*. 2003;54:719-24.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.10755>
 PMID:14681881
 20. Douglas M, Kaufmann S, Kaufmann P. Therapeutic developments in spinal muscular atrophy. *Ther Adv Neurol Disord*. 2010;3:173-85.
<http://dx.doi.org/10.1177/1756285610369026>
 PMID:21179609 PMID:PMC3002649
 21. Wadman RI, Bosboom WM, van der Pol WL, et al. Drug treatment for spinal muscular atrophy type I. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;4:CD006282.
<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD006282.pub4>
 PMID:22513939
 22. Kinali M, Mercuri E, Main M, et al. Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2002;59:609-10.
<http://dx.doi.org/10.1212/WNL.59.4.609>
 PMID:12196659
 23. Pane M, Staccioli S, Messina S, et al. Daily salbutamol in young patients with SMA type II. *Neuromuscul Disord*. 2008;18:536-4021.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2008.05.004>
 PMID:18579379
 24. Kissel JT, Scott CB, Reyna SP. SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 2011;6:e21296.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021296>
 PMID:21754985 PMID:PMC3130730
 25. Rigo F, Hua Y, Krainer AR, et al. Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Cell Biol*. 2012;199:21-5.
<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201207087>
 PMID:23027901 PMID:PMC3461520
 26. Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*. 2013;24:489-98.
<http://dx.doi.org/10.1089/hum.2012.225>
 PMID:23544870
 27. Mitrprant C, Porensky P, Zhou H, et al. Improved antisense oligonucleotide design to suppress aberrant *SMN2* gene transcript processing: towards a treatment for spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 2013;8:e62114.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062114>
 PMID:23630626 PMID:PMC3632594
 28. Bebee TW, Dominguez CE, Samadzadeh-Tarighat S, Akehurst KL, Chandler DS. Hypoxia is a modifier of *SMN2* splicing and disease severity in a severe SMA mouse model. *Hum Mol Genet*. 2012;21:4301-13.
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/dds263>
 PMID:22763238 PMID:PMC3441125
 29. Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *Lancet Neurol*. 2012;11:443-52.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70061-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70061-3)
 30. Benkhelifa-Ziyat S, Besse A, Roda M, et al. Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Mol Ther*. 2013;21:282-90.
<http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.261>
 PMID:23295949

SUMMARY

Spinal muscular atrophy – molecular genetics in diagnosis and therapy

Nina Barišić, Vanja Ivanović, Ivan Lehman, Petra Grđan

Spinal muscular atrophy is an autosomal recessive disorder characterized by lower alpha motor neuron degeneration. In most cases, the disease results from homozygous deletions involving exon 7 of the “survival of motor neuron” (SMN) gene at locus 5q13. The SMN2 gene is a copy of the SMN1 gene, which generates approximately 10%-15% of the correctly spliced transcript because the gene contains a single silent nucleotide transition in exon 7, leading to frequent skipping of this exon during RNA splicing. The mechanism is known as alternative splicing. Increase in the SMN levels has a marked impact in experimental models. This simple and practical method of transferring genes may have a potential for use in the treatment of motoneuron disease in children and adults.

Keywords: muscular atrophy, spinal; motor neurons, gamma; molecular biology; diagnosis; therapy