

# Количественные и структурные особенности генов *SMN1* и *SMN2* у пациентов со спинальной мышечной атрофией 5q

А.И. Власенко<sup>1</sup>, В.Д. Назаров<sup>2</sup>, С.В. Лапин<sup>2</sup>, А.В. Мазинг<sup>2</sup>, Е.А. Суркова<sup>2</sup>, Т.В. Блинова<sup>2</sup>, Т.М. Алексеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России; Россия, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

**Контакты:** Владимир Дмитриевич Назаров [nazarov19932@mail.ru](mailto:nazarov19932@mail.ru)

**Введение.** Спинальная мышечная атрофия (СМА) представляет собой аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся потерей двигательных нейронов. Причиной нейродегенерации является преимущественно гомозиготная делеция гена *SMN1*, приводящая к снижению синтеза белка SMN. Клиническая картина заболевания гетерогенна и варьирует в зависимости от возраста начала и от способности выполнять двигательные функции. Было идентифицировано несколько генетических и молекулярных модификаторов, предположительно влияющих на тяжесть течения СМА. Одним из наиболее доказанных факторов является количество копий гена *SMN2*.

**Цель исследования** – описание количественных и структурных особенностей генов *SMN1* и *SMN2* у пациентов со СМА 5q.

**Материалы и методы.** В исследование были включены образцы ДНК пациентов, обследованных на количество копий генов *SMN1* и *SMN2* в Научно-методическом центре по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова за период с 2021 по 2022 г. Количество копий генов определялось с помощью метода мультиплексной амплификации лигированных зондов с использованием набора SALSA MLPA P021 SMA (MRC Holland). Для оценки тяжести клинических проявлений СМА оценивался не прямой параметр агрессивности – возраст обращения пациента в лабораторию. Статистический анализ проводился с использованием программы для статистической обработки данных GraphPad Prism9.

**Результаты.** При исследовании связи между количеством копий гена *SMN2* и возрастом установления молекулярного диагноза была обнаружена статистически значимая прямая корреляция ( $r = 0,3960$ ,  $p < 0,0001$ ). Оценка достоверности различий между отдельными группами пациентов дала статистически значимый результат:  $< 0,0001$  при сравнении групп пациентов с 2 и 3 копиями гена;  $< 0,0001$  – с 2 и 4 копиями;  $0,0370$  – с 3 и 4 копиями. В исследованной группе образцов у 9 % была обнаружена гибридная структура *SMN1/SMN2*. Поэтому проводилась оценка достоверности различий между возрастом установления молекулярного диагноза у пациентов с гомозиготной делецией *SMN1* и возрастом установления молекулярного диагноза у пациентов с гибридным геном *SMN1/SMN2* между группами с одинаковым количеством копий гена *SMN2*. Был выявлен статистически значимый результат ( $p = 0,0070$ ) между пациентами с делецией *SMN1* + 2 копии *SMN2* и пациентами с гибридным геном *SMN1/SMN2* + 2 копии *SMN2*.

**Выводы.** Число копий гена *SMN2* коррелирует с возрастом установления молекулярного диагноза и косвенно является предиктором возраста дебюта СМА. Эффект гибридного гена *SMN1/SMN2* на возраст установления молекулярного диагноза СМА был сравним с воздействием обычного гена *SMN2*.

**Ключевые слова:** спинальная мышечная атрофия 5q, *SMN1*, *SMN2*, белок выживаемости мотонейронов, модификатор

**Для цитирования:** Власенко А.И., Назаров В.Д., Лапин С.В. и др. Количественные и структурные особенности генов *SMN1* и *SMN2* у пациентов со спинальной мышечной атрофией 5q. Нервно-мышечные болезни 2024;14(4):21–8.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2024-14-4-21-28>

## Quantitative and structural features of the *SMN1* and *SMN2* genes in patients with spinal muscular atrophy 5q

A.I. Vlasenko<sup>1</sup>, V.D. Nazarov<sup>2</sup>, S.V. Lapin<sup>2</sup>, A.V. Mazing<sup>2</sup>, E.A. Surkova<sup>2</sup>, T.V. Blinova<sup>2</sup>, T.M. Alekseeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.A. Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of Russia; 2 Akkuratova St., Saint Petersburg 197341, Russia;

<sup>2</sup>I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 Lva Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia

**Contacts:** Vladimir Dmitrievich Nazarov [nazarov19932@mail.ru](mailto:nazarov19932@mail.ru)

**Background.** Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by loss of motor neurons. The cause of neurodegeneration is predominantly a homozygous deletion of the *SMN1* gene, leading to a decrease in the synthesis of the SMN protein. The clinical picture of the disease is heterogeneous and varies depending on the age of onset and the ability to perform motor functions. Several genetic and molecular modifiers have been identified that are thought to influence the severity of SMA. One of the most proven factors is the number of copies of the *SMN2* gene.

**Aim.** Description of quantitative and structural features of the *SMN1* and *SMN2* genes in patients with SMA 5q.

**Materials and methods.** The study included DNA samples from patients examined for the number of copies of the *SMN1* and *SMN2* genes at the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, for the period from 2021 to 2022. Gene copy numbers were determined by multiplex ligation-dependent probe amplification using the SALSA MLPA P021 SMA kit (MRC Holland). We assessed an indirect parameter of aggressiveness (the age of the patient's visit to the laboratory) to assess the severity of clinical manifestations of SMA. Statistical analysis was carried out using the statistical data processing program GraphPad Prism9.

**Results.** A statistically significant direct correlation was found when studying the relationship between the number of copies of the *SMN2* gene and the age of molecular diagnosis ( $r = 0.3960$ ,  $p < 0.0001$ ). An assessment of the significance of differences between individual groups of patients gave a statistically significant result:  $< 0.0001$  when comparing groups of patients with 2 and 3 copies;  $< 0.0001$  – with 2 and 4 copies;  $0.0370$  – with 3 and 4 copies. 9 % of patients had a hybrid *SMN1/SMN2* structure. Therefore, the significance of differences between the age of molecular diagnosis of patients with homozygous deletion of *SMN1* and the age of molecular diagnosis of patients with the hybrid *SMN1/SMN2* gene between groups with the same number of copies of the *SMN2* gene was assessed. A statistically significant result ( $p = 0.0070$ ) was found between patients with *SMN1* deletion + 2 copies of *SMN2* and patients with the hybrid gene *SMN1/SMN2* + 2 copies of *SMN2*.

**Conclusion.** The number of *SMN2* gene copies correlates with the age of molecular diagnosis and indirectly predicts the age of SMA onset. The effect of the *SMN1/SMN2* hybrid gene on the age of molecular diagnosis of SMA was comparable to the effect of the regular *SMN2* gene.

**Keywords:** spinal muscular atrophy 5q, *SMN1*, *SMN2*, survival motor neuron protein, modifier

**For citation:** Vlasenko A.I., Nazarov V.D., Lapin S.V. et al. Quantitative and structural features of the *SMN1* and *SMN2* genes in patients with spinal muscular atrophy 5q. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2024;14(4):21–8. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2024-14-4-21-28>

### Введение

Спинальная мышечная атрофия (СМА) 5q – прогрессирующее наследственное аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, возникающее в результате дефицита белка выживаемости мотонейронов (SMN) и приводящее к дегенерации двигательных ядер передних рогов спинного мозга и ствола головного мозга. Потеря белка SMN обусловлена абберациями в одноименном гене *SMN1*: в 95 % случаев регистрируется гомозиготная потеря 7 экзона, в оставшихся 5 % – гетерозиготная потеря 7-го экзона с точковым патогенным вариантом на другом аллеле [1].

Клиническая картина СМА характеризуется прогрессирующим периферическим парезом проксимальных мышц и бульбарными расстройствами [1].

Согласно современной классификации, существует 4 основных типа СМА, различающихся в зависимости от возраста дебюта заболевания, выраженности симптомов и продолжительности жизни больных [2]. Такое разнообразие форм СМА 5q при одинаковом этиопатогенезе состояния объясняется наличием различных молекулярных и генетических модифицирующих факторов.

Модификаторы степени тяжести заболевания делят на 2 основные группы: факторы, не оказывающие влияния на количество белка SMN, и факторы, непосредственно влияющие на уровень белка SMN. К 1-й группе модифицирующих факторов относят белки, восстанавливающие эндоцитоз в синапсах: пластин 3 (PLS3), коронин (CORO1C), кальцийневриноподоб-

ный белок (CHP1) и нейрокальцин дельта (NCALD) [3–5]. Ко 2-й группе – эпигенетическую регуляцию, другие гены, локализованные в хромосоме 5q13, и число копий гена *SMN2* [6–14].

Несмотря на перечисленное многообразие существующих модификаторов, основным модифицирующим фактором является количество копий гена *SMN2*. Число копий *SMN2* в геноме может варьировать от 1 до 8 [15]. Вариабельность числа копий *SMN2* обусловлена нестабильностью локуса 5q13, где картированы гены *SMN*, а также наличием большого количества повторяющихся *Alu*-последовательностей [15].

Использование количества копий гена *SMN2* в качестве прогностического маркера обосновано с точки зрения патогенеза заболевания. Гены *SMN1* и *SMN2* состоят из 10 экзонов (1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 6b, 7 и 8) и 8 интронов. Старт-кодон (AUG) и стоп-кодон (UAA) для полноразмерной мРНК расположены в экзонах 1 и 7 соответственно. Экзон 8 служит 3'-нетранслируемой областью. Размеры экзонов и интронов между 2 генами *SMN* идентичны. Несоответствие между ними заключается в наличии нуклеотидных замен в интроне 6, экзоне 7, интроне 7 и экзоне 8. В результате формируются 2 специфических гаплотипа: G-C-A-A-G (*SMN1*) и A-T-G-G-A (*SMN2*). Единственной функционально значимой заменой является нуклеотидная замена цитозина на тимин в 7-м экзоне [16, 17]. Переход цитозина в тимин приводит к различным паттернам альтернативного сплайсинга, пропуску экзона 7 в последовательности мРНК *SMN2* и синтезу нестабильного, укороченного с C-конца белка *SMN* [16, 17].

По мнению большинства исследователей, одной из причин пропуска 7-го экзона является aberrантное действие негативных белковых регуляторов сплайсинга экзона 7 [16–19]. Предполагаемый список факторов, влияющих на пропуск экзона 7, значителен и продолжает расти. Среди существующих регуляторных элементов особое внимание уделяется изучению действия белков SAM68 и гяРПП-R [18–20].

Кроме белковых регуляторов, к факторам, способным оказывать негативное влияние на формирование дальнейшей структуры РНК, относят интронный сайленсер сплайсинга (ISS-N1). ISS-N1 представляет собой последовательность, охватывающую с 10-й по 24-ю позиции интрона 7. Участие ISS-N1 в пропуске экзона 7 подтверждено ASO-опосредованной коррекцией сплайсинга, что стало основой в создании первого препарата для лечения СМА [21].

Несмотря на существование большого количества негативных регуляторов, с гена *SMN2* синтезируется примерно 10 % нормально функционирующего белка *SMN*, хотя его количество может быть значительно выше [1]. Это происходит благодаря наличию положительных регуляторов, способствующих сохранению смыслового участка в структуре РНК. Нуклеотидная замена с.859G>C в экзоне 7 образует новый элемент

экзонного энхансера сплайсинга, увеличивает количество полноразмерных транскриптов и приводит к развитию менее тяжелых типов СМА [22]. Генетический вариант A44G интрона 6 заметно снижает аффинность связывания HuR (предполагаемого репрессора сплайсинга), что способствует включению экзона 7 и формированию более легкой симптоматики [23].

В ряде когортных исследований продемонстрирована корреляция между количеством копий гена *SMN2* и типами СМА. У пациентов со СМА I типа чаще всего обнаруживается 1–2 копии гена *SMN2*, у пациентов со СМА II типа – 3 копии гена *SMN2*, у пациентов со СМА III типа – 3–4 копии гена *SMN2*. У пациентов со СМА IV типа в большинстве случаев наблюдалось 4 копии гена *SMN2* [24]. При наличии 5 копий гена *SMN2* заболевание протекает бессимптомно [1, 25].

Рассматривая вопрос о количестве копий гена *SMN2*, необходимо помнить о существовании так называемых гибридных генов. Как правило, у пациентов со СМА наблюдается гомозиготная делеция *SMN1* с участием экзона 7 и экзона 8. Но в ряде случаев (от 5 до 30 % в зависимости от этнической группы) экзон 8 остается сохранным и происходит рекомбинация генов с участием экзона 8 *SMN1* и экзона 7 *SMN2* [26–31]. Вклад гибридного гена *SMN1/SMN2* в клинический фенотип СМА до конца не ясен. В существующих исследованиях у пациентов с гибридным геном *SMN1/SMN2* описывается более легкая симптоматика заболевания [26–28]. Считается, что гибридный ген *SMN1/SMN2* и нативный ген *SMN2* продуцируют белок *SMN* одинаковой аминокислотной последовательности, так как нуклеотидное различие в экзоне 8 (G в *SMN1* и A в *SMN2*) лежит в пределах 3'-нетранслируемой области [27, 28]. Из этого следует, что гибридный ген *SMN1/SMN2* способен продуцировать такой же уровень полноразмерного белка *SMN*, как и нативный ген *SMN2*.

**Цель исследования** – описание количественных и структурных особенностей генов *SMN1* и *SMN2* у пациентов со СМА 5q.

### Материалы и методы

В исследование были включены образцы ДНК пациентов, обследованных на количество копий генов *SMN1* и *SMN2* в Научно-методическом центре по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова за период с 2021 по 2022 г. Данные за 2023 г. не были включены в работу по причине введения расширенного неонатального скрининга на территории Российской Федерации. Общее число обследованных составило 178 пациентов. Количество копий генов *SMN1*, *SMN2* определялось с помощью метода множественной амплификации лигированных зондов (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) с использованием набора SALSA MLPA P021 SMA (MRC Holland) в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица 1. Эпидемиологические данные

Table 1. Epidemiological data

Показатель Parameter	Значение Value
Гендерная ассоциация, %: Gender association, %:	
женщины female	53
мужчины male	47
Средний возраст обращения в лабораторию, лет Average age of contacting the laboratory, years	22

Интерпретация типа потери гена *SMN1*, в том числе MLPA-паттерн гибридных *SMN1/SMN2* структур, описаны в ранее опубликованной работе [32]. Эпидемиологические данные отобранной группы представлены в табл. 1.

Для оценки тяжести клинических проявлений СМА оценивался не прямой параметр агрессивности данного заболевания – возраст обращения пациента в лабораторию. Такой подход был выбран из-за ограничений доступа к точной информации о возрасте клинической манифестации болезни ввиду отсутствия непосредственного контакта с пациентами.

Статистический анализ проводился в 2 этапа с использованием программы для статистической обработки данных GraphPad Prism9 (Graph Pad Software Inc.). На 1-м этапе по методу расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена оценивалась взаимосвязь между количеством копий гена *SMN2* и возрастом манифестации заболевания. На 2-м этапе по методу критерия Манна–Уитни оценивалась достоверность различий между группами пациентов с определенным числом копий гена *SMN2*, а также достоверность различий в возрасте манифестации заболевания у пациентов с гомозиготной делецией *SMN1* и у пациентов с гибридным геном *SMN1/SMN2*.

### Результаты

В исследованной группе образцов у 9 % была обнаружена гибридная структура *SMN1/SMN2* (табл. 2).

Количество копий гена *SMN2* у 178 образцов с гомозиготной потерей гена *SMN1* представлено в табл. 3.

При исследовании связи между количеством копий гена *SMN2* и возрастом установления молекулярного диагноза была обнаружена статистически значимая прямая корреляция ( $r = 0,3960$ ,  $p < 0,0001$ ) (рис. 1).

Оценка достоверности различий между отдельными группами пациентов дала статистически значимый результат:  $< 0,0001$  при сравнении групп пациентов с 2 и 3 копиями;  $< 0,0001$  – с 2 и 4 копиями;  $0,0370$  – с 3 и 4 копиями (рис. 2).

Таблица 2. Встречаемость гомозиготной делеции *SMN1* и гибридного гена *SMN1/SMN2* в выборкеTable 2. Occurrence of homozygous deletion of *SMN1* and the hybrid gene *SMN1/SMN2* in the sample

Мутация Mutation	Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	Доля, % Proportion, %
delSMN1	162	91
SMN1/SMN2	16	9

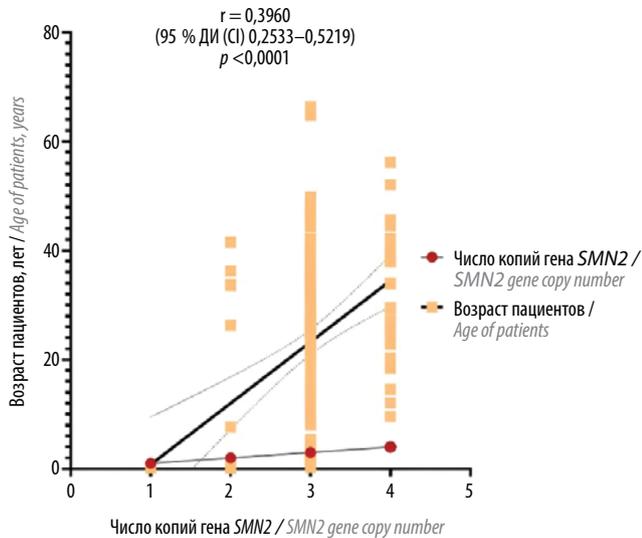
Таблица 3. Распределение пациентов в зависимости от количества копий гена *SMN2*Table 3. Distribution of patients depending on the number of copies of the *SMN2* gene

Количество копий гена <i>SMN2</i> <i>SMN2</i> gene copy number	Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	Доля, % Proportion, %
1	1	0,6
2	21	12,96
2 + 1 <i>SMN1/SMN2</i>	8	4,94
3	115	71,0
3 + 1 <i>SMN1/SMN2</i>	8	4,94
4	25	15,43
Всего Total	178	100

Оценка достоверности различий между возрастом установления молекулярного диагноза пациентов с гомозиготной делецией *SMN1* и возрастом установления молекулярного диагноза пациентов с гибридным геном *SMN1/SMN2* проводилась между группами с одинаковым количеством копий гена *SMN2* (табл. 4). Был выявлен статистически значимый результат ( $p = 0,0070$ ) между пациентами с делецией *SMN1* + 2 копии *SMN2* и пациентами с гибридным геном *SMN1/SMN2* + 2 копии *SMN2*.

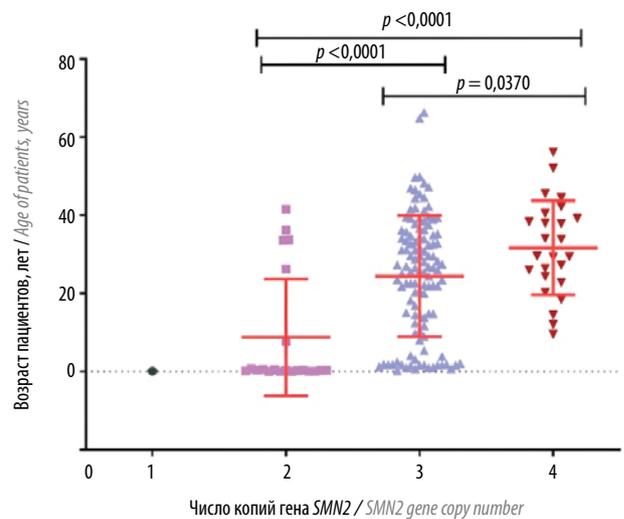
### Обсуждение

Спинальная мышечная атрофия – аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, обусловленное патогенными вариантами гена *SMN1*, кодирующего одноименный белок SMN. Снижение экспрессии белка SMN приводит к потере  $\alpha$ -мотонейронов и формированию клиники периферического пареза. Клинический фенотип СМА неоднороден. Высокая вариабельность клинического течения объясняется зависимостью проявлений заболевания от дополни-



**Рис. 1.** Оценка связи между количеством копий гена *SMN2* и возрастом установления молекулярного диагноза по методу расчета корреляции Спирмена. *r* – коэффициент корреляции; ДИ – доверительный интервал

**Fig. 1.** Estimation of the association between the number of *SMN2* gene copies and the age of molecular diagnosis using the Spearman correlation method. *r* – correlation coefficient; CI – confidence interval



**Рис. 2.** Оценка достоверности различий между отдельными группами пациентов с использованием критерия Манна–Уитни

**Fig. 2.** Evaluation of the significance of differences between individual groups of patients using the Mann–Whitney test

**Таблица 4.** Оценка достоверности различий между возрастом установления молекулярного диагноза пациентов с гомозиготной делецией *SMN1* и возрастом установления молекулярного диагноза пациентов с гибридным геном *SMN1/SMN2* с использованием критерия Манна–Уитни

**Table 4.** Evaluation of the significance of differences between the age of molecular diagnosis of patients with homozygous *SMN1* deletion and the age of molecular diagnosis of patients with the *SMN1/SMN2* hybrid gene using the Mann–Whitney test

Показатель Parameter	Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>	<i>p</i>
2 копии <i>SMN2</i> 2 copies of <i>SMN2</i>	21	0,0070
<i>SMN1/SMN2</i> + 2 копии <i>SMN2</i> <i>SMN1/SMN2</i> + 2 copies of <i>SMN2</i>	8	
3 копии <i>SMN2</i> 3 copies of <i>SMN2</i>	115	0,3130
<i>SMN1/SMN2</i> + 3 копии <i>SMN2</i> <i>SMN1/SMN2</i> + 3 copies of <i>SMN2</i>	8	

тельных модифицирующих факторов. Число и структурные особенности копий гена *SMN2*, высокоомологичной копии *SMN1* считаются наиболее важными фенотипическими модификаторами СМА.

В данном исследовании было оценено распределение числа копий гена *SMN2* в выборке пациентов со СМА Научно-методического центра по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (см. табл. 3). Наиболее часто встречались носители 3 копий гена *SMN2* (71 %), в меньшей степени – носители 4 копий (15,43 %), 2 (12,96 %) и 1 (0,6 %).

В исследовании И.П. Витковской и соавт. (2022) частота встречаемости 3 копий гена *SMN2* аналогична результатам данного исследования, тогда как 4 копии гена *SMN2* регистрировались реже 2 копий гена *SMN2* [33].

В зарубежных исследованиях наблюдается иное распределение. В немецкой выборке 39,5 % пациентов имели 2 копии гена *SMN2*, 23 % – 3 копии гена *SMN2* и 32,5 % – 4 копии гена *SMN2* [34]. Турецкие исследователи также сообщают о превалировании 2 копий гена *SMN2* в выборке: 2 копии – 28 (82,3 %) случаев, 3 копии – 6 (17,6 %) случаев [35]. В испанской когорте встречаемость равна 45,76 % для 3 копий гена *SMN2*,

42,56 % — для 2 копий гена *SMN2*, 8,16 % — для 4 копий гена *SMN2* и 3,2 % — для 1 копии гена *SMN2* [24].

Различия в частоте встречаемости копий гена *SMN2* между российскими и зарубежными выборками больных СМА могут быть объяснены включением в анализ пациентов с различной тяжестью заболевания. Высокую частоту встречаемости пациентов с 3 копиями гена *SMN2* в нашем исследовании также можно объяснить большим числом амбулаторных возрастных пациентов.

В данном исследовании было продемонстрировано наличие прямой корреляции между числом копий гена *SMN2* и возрастом установления молекулярного диагноза (см. рис. 1).

В перечне других исследований была отражена неоднородность распределения копий в зависимости от фенотипа.

В ходе исследования R.I. Wadman и соавт. (2020) было выявлено, что для пациентов с 1 копией гена *SMN2* характерно начало заболевания в период от 0 до 1,5 года. Среди пациентов с 2 копиями гена *SMN2* наблюдался аналогичный возраст начала заболевания. В группе больных с 3 копиями гена *SMN2* у 66 % пациентов клиническое начало произошло в возрасте от 0,3 до 8,8 года, у 17,5 % — от 0 до 1,5 года и у 16 % — от 1 до 17,5 года. Для пациентов с 4 копиями гена *SMN2* в 76 % случаев заболевание началось в возрасте от 1 до 17,5 года, в 11 % случаев — от 0,3 до 8,8 года, в еще 11 % — от 21 до 43 лет, и лишь у 1 пациента произошел дебют до 1,5 года [31].

Одной из крупнейших зарубежных работ является исследование испанской научной группы М. Calucho и соавт. (2018), в котором проводился анализ клинической и молекулярно-генетической информации о 2834 пациентах. В 69 % случаев пациенты со СМА I типа являлись носителями 2 копий гена *SMN2*, в 23 % случаев — 3 копий гена *SMN2*, в 7 % случаев — 1 копии гена *SMN2* и в 1 % случаев — более 4 копий гена *SMN2*. Пациенты со СМА II типа в 81 % случаев были носителями 3 копий гена *SMN2*, в 17 % случаев — 2 копий гена *SMN2* и в 2 % случаев — 1 или 4 копий гена *SMN2*. Пациенты со СМА III типа в 47 % случаев были носителями 3 копий гена *SMN2*, в 46 % случаев — 4 копий гена *SMN2*, в 5 % случаев — 2 копий гена *SMN2* и в 2 % случаев — 5 копий гена *SMN2* [24].

В работе российских исследователей зарегистрирована аналогичная статистика: 77,27 % пациентов с I типом заболевания имели 2 копии гена *SMN2*, 79,22 % пациентов со II типом СМА — 3 копии гена *SMN2*, а среди пациентов с III типом заболевания в 53,3 % случаев обнаруживалось 4 копии и в 43,33 % — 3 копии гена *SMN2* [36].

Результат проведенного исследования демонстрирует наличие прямой корреляции между числом копий гена *SMN2* и возрастом установления молекулярного диагноза. Однако выявляется неоднородность распределения копий гена *SMN2*, что предположительно сви-

детельствует о существовании задержки между манифестацией заболевания и генетическим подтверждением диагноза. Данное наблюдение отчетливо видно при оценке достоверности между группами пациентов. Для лиц, обладающих 2 копиями гена *SMN2*, возраст обращения в лабораторию возможен в 26, 33, 36, 41 год, а для пациентов с 3 копиями гена *SMN2* возраст установления молекулярного диагноза может достигать 66 лет (см. рис. 2). Вместе с тем у пациентов с 1 и 2 копиями гена в большинстве случаев возраст молекулярного диагноза соответствует возрасту начала заболевания, установленному классификатором типов СМА.

Гибридная структура *SMN1/SMN2* является одной из форм потери гена *SMN1*, вызывающей СМА. В отобранной когорте у 9 % (16/178) образцов было подтверждено наличие гибридного гена *SMN1/SMN2*. Существует значительная вариативность распространенности гибридного гена при СМА [27–29, 31]. По данным E. Nahnen и соавт. (1996), частота встречаемости гибридного гена *SMN1/SMN2* в немецкой выборке пациентов со СМА составляет ~12 %, тогда как у пациентов со СМА чешского или польского происхождения — ~30 % [30]. Испанская и китайская исследовательские группы сообщили о частоте встречаемости гибридных генов *SMN1/SMN2* 5,3 и 5,5 % случаев в выборках Испании и Китая соответственно [26, 29].

Важность определения гибридных генов подчеркивается их возможным влиянием на тяжесть СМА. При сравнении влияния на возраст установления молекулярного диагноза СМА генотипа с гибридной структурой гена *SMN1/SMN2* и 2 копиями гена *SMN2* с влиянием генотипа с аналогичным количеством копий гена *SMN2* в данном исследовании была выявлена статистически значимая разница ( $p = 0,0070$ ), указывающая на более поздний возраст установления молекулярного диагноза у пациентов с гибридной структурой.

Следует обратить внимание на то, что в нашем исследовании при сравнении групп пациентов с 3 копиями гена *SMN2* (с гибридной структурой и без нее) получить аналогичный результат не удалось.

Отсутствие статистически значимой разницы может быть обусловлено недостаточным размером выборки группы пациентов с гибридным геном и 3 копиями гена *SMN2* в соотношении с группой без гибридной структуры, а также примерно одинаковой задержкой у данных групп пациентов от возраста манифестации заболевания до возраста установления молекулярного диагноза. Для достоверной оценки наличия или отсутствия различий между этими группами требуется проведение дальнейших исследований.

Полученные данные соотносятся с ранее проведенными исследованиями других авторов. В 1997 г. С. J. DiDonato и соавт. одними из первых обратили внимание на связь между благоприятными формами СМА и частичной конверсией генов [37]. Исследование D.L. Stabley и соавт. (2021) также указало на возможное

влияние гибридных генов на развитие более легкого фенотипа СМА у пациентов с небольшим количеством копий гена *SMN2* [38]. R. Wadman и соавт. (2020), в свою очередь, впервые смогли продемонстрировать более благоприятное течение СМА у пациентов с гибридным геном в сравнении с клиническим исходом пациентов с тем же количеством копий гена *SMN2* [31]. Исследование, проведенное E. Niba и соавт. (2021), является ключевым в контексте изучения вклада гибридной структуры гена *SMN1/SMN2* в фенотип пациентов со СМА. Данная исследовательская группа оценила влияние гибридной структуры генов на фенотип пациентов со СМА и сравнила с влиянием на фенотип количества копий гена *SMN2*. Было обнаружено, что частота встречаемости СМА I типа

у пациентов с гибридной структурой генов *SMN1/SMN2* значительно ниже, чем у пациентов с гомозиготной делецией *SMN1* без формирования гибрида (12,5 % против 45,5 %). Такое наблюдение является доказательством равного уровня трансляции белка SMN у гибридного гена *SMN1/SMN2* и нативного гена *SMN2*.

### Выводы

Таким образом, число копий гена *SMN2* коррелирует с возрастом установления молекулярного диагноза и косвенно является предиктором возраста дебюта СМА. Эффект гибридного гена *SMN1/SMN2* на возраст установления молекулярного диагноза СМА был сравним с воздействием обычного гена *SMN2*.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Butchbach M. 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.
- СМА семьи. Доступно по: <https://f-sma.ru>. SMA Families. Available at: <https://f-sma.ru>. (In Russ.).
- Hosseiniarkoobe S., Schneider S., Wirth B. Advances in understanding the role of disease-associated proteins in spinal muscular atrophy. *Expert Rev Proteomics* 2017;14(7):581–92. DOI: 10.1080/14789450.2017.1345631
- Hosseiniarkoobe S., Peters M., Torres-Benito L. et al. The power of human protective modifiers: PLS3 and CORO1C unravel impaired endocytosis in spinal muscular atrophy and rescue SMA phenotype. *Am J Hum Genet* 2016;99(3):647–65. DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.07.014
- Janzen E., Mendoza-Ferreira N., Hosseiniarkoobe S. et al. CHP1 reduction ameliorates spinal muscular atrophy pathology by restoring calcineurin activity and endocytosis. *Brain* 2018;141(8):2343–61. DOI: 10.1093/brain/awyl67
- Hauke J., Riessland M., Lunke S. et al. Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition. *Hum Mol Genet* 2009;18(2):304–17. DOI: 10.1093/hmg/ddn357
- Cao Y., Qu Y., He S. et al. Association between *SMN2* methylation and disease severity in Chinese children with spinal muscular atrophy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016;17(1):76–82. DOI: 10.1631/jzus.B1500072
- Zheleznyakova G., Voisin S., Kiselev A. et al. Genome-wide analysis shows association of epigenetic changes in regulators of Rab and Rho GTPases with spinal muscular atrophy severity. *Eur J Hum Genet* 2013;21(9):988–93. DOI: 10.1038/ejhg.2012.293
- Maretina M., Egorova A., Baranov V., Kiselev A. *DYNC1H1* gene methylation correlates with severity of spinal muscular atrophy. *Ann Hum Genet* 2019;83(2):73–81. DOI: 10.1111/ahg.12288
- Blatnik A., McGovern V., Burghes A. What genetics has told us and how it can inform future experiments for spinal muscular atrophy, a perspective. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8494. DOI: 10.3390/ijms22168494
- Russman B.S. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Academic Press, 2003. Pp. 368–372. DOI: 10.1016/B0-12-226870-9/00948-5
- Savad S., Ashrafi M., Samadaian N. et al. A comprehensive overview of SMN and NAIP copy numbers in Iranian SMA patients. *Sci Rep* 2023;13(1):3202. DOI: 10.1038/s41598-023-30449-7
- Ahn E., Yum M., Kim E. et al. Genotype-phenotype correlation of *SMN1* and NAIP deletions in Korean patients with spinal muscular atrophy. *J Clin Neurol* 2017;13(1):27–31. DOI: 10.3988/jcn.2017.13.1.27
- Zhang Y., He J., Zhang Y. et al. The analysis of the association between the copy numbers of survival motor neuron gene 2 and neuronal apoptosis inhibitory protein genes and the clinical phenotypes in 40 patients with spinal muscular atrophy: Observational study. *Medicine (Baltimore)* 2020;99(3):e18809. DOI: 10.1097/MD.00000000000018809
- Powis Z., Nashawaty M., Paal A., Liaquat K. P271: Beyond *SMN1*: Review of genotype-phenotype correlation in individuals with ≥4 *SMN2* copy numbers. *Genet Med Open* 2023;1(1). DOI: 10.1016/j.gimo.2023.100299
- Singh R., Singh N.N. Mechanism of splicing regulation of spinal muscular atrophy genes. *Adv Neurobiol* 2018;20:31–61. DOI: 10.1007/978-3-319-89689-2\_2
- Singh N., Ottesen E., Singh R. A survey of transcripts generated by spinal muscular atrophy genes. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2020;1863(8):194562. DOI: 10.1016/j.bbagr.2020.194562
- Pagliarini V., Pelosi L., Bustamante M. et al. SAM68 is a physiological regulator of *SMN2* splicing in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 2015;211(1):77–90. DOI: 10.1083/jcb.201502059
- Chen Y., Yuo C., Yang W. et al. Extracellular pH change modulates the exon 7 splicing in *SMN2* mRNA. *Mol Cell Neurosci* 2008;39(2):268–72. DOI: 10.1016/j.mcn.2008.07.002
- Jiang T., Qu R., Liu X. et al. HnRNPR strongly represses splicing of a critical exon associated with spinal muscular atrophy through binding to an exonic AU-rich element. *J Med Genet* 2023;60(11):1105–15. DOI: 10.1136/jmg-2023-109186
- Singh N., Singh R., Androphy E. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *Nucleic Acids Res* 2007;35(2):371–89. DOI: 10.1093/nar/gkl1050
- Prior T., Krainer A., Hua Y. et al. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the *SMN2* gene. *Am J Hum Genet* 2009;85(3):408–13. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.08.002
- Wu X., Wang S., Sun J. et al. A-44G transition in *SMN2* intron 6 protects patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2017;26(14):2768–80. DOI: 10.1093/hmg/ddx166
- Calucho M., Bernal S., Alias L. et al. Correlation between SMA type and *SMN2* copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord* 2018;28(3):208–15. DOI: 10.1016/j.nmd.2018.01.003

25. Забненкова В.В., Дадали Е.Л., Поляков А.В. Проксимальная спинальная мышечная атрофия типов I–IV: особенности молекулярно-генетической диагностики. *Нервно-мышечные болезни* 2013;(3):27–31.  
Zabnenkova V.V., Dadali E.L., Polyakov A.V. Proximal spinal muscular atrophy types I–IV: features of molecular genetic diagnostics. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2013;(3):27–31. (In Russ.).
26. Cuscó I., Barceló M., del Rio E. et al. Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: *De novo*, homozygous and compound heterozygous cases. *Hum Genet* 2001;108(3):222–9. DOI: 10.1007/s004390000452
27. Kubo Y., Nishio H., Saito K. A new method for *SMN1* and hybrid SMN gene analysis in spinal muscular atrophy using long-range PCR followed by sequencing. *J Hum Genet* 2015;60(5):233–9. DOI: 10.1038/jhg.2015.16
28. Niba E., Nishio H., Wijaya Y. 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
29. Qu Y., Bai J., Cao Y. et al. Mutation spectrum of the survival of motor neuron 1 and functional analysis of variants in Chinese spinal muscular atrophy. *J Mol Diagn* 2016;18(5):741–52. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.05.004.
30. Hahnen E., Schönling J., Rudnik-Schöneborn S. et al. Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: New insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 1996;59(5):1057–65.
31. Wadman R., Jansen M., Stam M. et al. Intragenic and structural variation in the SMN locus and clinical variability in spinal muscular atrophy. *Brain Commun* 2020;2(2):fcaa075. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa075
32. Диль А.В., Назаров В.Д., Сидоренко Д.В. и др. Исследование особенностей генетических изменений гена *SMN1* при спинальной мышечной атрофии 5q. *Нервно-мышечные болезни* 2022;12(3):36–44. DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-36-44
- Dil A.V., Nazarov V.D., Sidorenko D.V. et al. Study of the features of genetic changes in the *SMN1* gene in spinal muscular atrophy 5q. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2022;12(3):36–44. (In Russ.). DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-36-44
33. Витковская И.П., Зеленова О.В., Стерликов С.А. и др. Первое проспективное многоцентровое не интервенционное исследование распространенности спинальной мышечной атрофии в Российской Федерации. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики* 2022;(3):393–409. DOI: 10.24412/2312-2935-2022-3-393-409
- Vitkovskaya I.P., Zelenova O.V., Sterlikov S.A. et al. The first prospective multicenter non-interventional study of the prevalence of spinal muscular atrophy in the Russian Federation. *Sovremennye problemy zdavookhraneniya i meditsinskoy statistiki = Modern Problems of Health Care and Medical Statistics* 2022;(3):393–409. (In Russ.). DOI: 10.24412/2312-2935-2022-3-393-409
34. Vill K., Schwartz O., Blaschek A et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy in Germany: Clinical results after 2 years. *Orphanet J Rare Dis* 2021;16(1):153. DOI: 10.1186/s13023-021-01783-8
35. Yalcintepe S., Karal Y., Demir S et al. The frequency of *SMN1*, *SMN2* copy numbers in 246 Turkish cases analyzed with MLPA method. *Glob Med Genet* 2023;10(2):117–22. DOI: 10.1055/s-0043-1770055
36. Zheleznyakova G., Kiselev A., Vakhharlovsky V. et al. Genetic and expression studies of *SMN2* gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. *BMC Med Genet* 2011;12:96. DOI: 10.1186/1471-2350-12-96
37. DiDonato C.J., Morgan K., Carpten J.D. et al. Association between Ag1-CA alleles and severity of autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994;55(6):1218–29.
38. Stabley D.L., Holbrook J., Scavina M. et al. Detection of *SMN1* to *SMN2* gene conversion events and partial *SMN1* gene deletions using array digital PCR. *Neurogenetics* 2021;22(1):53–64. DOI: 10.1007/s10048-020-00630-5

#### Вклад авторов

А.И. Власенко: анализ полученных данных, написание статьи;

В.Д. Назаров: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

С.В. Лапин, А.В. Мазинг, Е.А. Суркова, Т.В. Блинова, Т.М. Алексеева: редактирование статьи.

#### Authors' contributions

A.I. Vlasenko: analysis of the obtained data, writing the article;

V.D. Nazarov: development of research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

S.V. Lapin, A.V. Mazing, E.A. Surkova, T.V. Blinova, T.M. Alekseeva: editing the article.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

А.И. Власенко / A.I. Vlasenko: <https://orcid.org/0000-0003-3727-8017>

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

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

А.В. Мазинг / A.V. Mazing: <https://orcid.org/0000-0002-3055-6507>

Е.А. Суркова / E.A. Surkova: <https://orcid.org/0000-0001-8503-0759>

Т.В. Блинова / T.V. Blinova: <https://orcid.org/0000-0003-4896-3319>

Т.М. Алексеева / T.M. Alekseeva: <https://orcid.org/0000-0002-4441-1165>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Funding.** The work was performed without external funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** The study protocol was approved by the local ethical committee of the I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia.

**Статья поступила:** 15.10.2024. **Принята к публикации:** 17.11.2024. **Опубликована онлайн:** 30.12.2024.

**Article submitted:** 15.10.2024. **Accepted for publication:** 17.11.2024. **Published online:** 30.12.2024.