مجـلهی علمی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکـی زنجـان
دورهی ۱۶، شمارهی ۶۲ بهار ۱۳۸۷، صفـحات ۲۷ تا ۳۶

بررسی ارتباط فنوتیپ و ژنوتیپ در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی ـ نخاعی در منطقهی آذربایجان شرقی

امید عمرانی[۱]، دکتر مرتضی جبارپور بنیادی[۲]، دکتر محمد برزگر[۳]

نویسندهی مسئول: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکدهی علوم طبیعی، آزمایشگاه ژنتیک o_omrani@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۸۶/۱۲/۱۴ پذیرش: ۸۷/۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی، یکی از بیماریهای کشندهی شایع در دوران کودکی میباشد. در این بیماری شدت و طول عمر مبتلایان متفاوت و متغیر میباشد. ژن SMN1 از جمله ژنهایی است که در بروز این بیماری دخیل است، به طوری که حذفشدگی اگزونهای هفت و هشت این ژن معمولا در بین اکثر مبتلایان به این بیماری دیده میشود. همچنین در مطالعات مختلفی، حذف اگزون ۵ ژن NAIP را به عنوان عاملی که شدت بیماری را تحتتأثیر قرار میدهد گزارش شده است. در این مطالعه ارتباط حذفشدگی ژنهای SMN1 و NAIP با شدت علایم بالینی بیماری همچون سن بروز علایم و سن فوت بیمار مورد بررسی قرارگرفته است.*

روش بررسی: *در این بررسی، ۷۷ بیمار مبتلا از منطقهی شمالغرب کشور که علایم بالینی تیپیک برای بیماری SMA را نشان داده بودند مورد بررسی مولکولی برای ژنهای SMN1 و NAIP قرارگرفتند. یافتههای مولکولی با علایم کلینیکی مانند طول عمر و شدت بیماری مقایسه شد.*

یافتهها: *در این مطالعه حذف هموزیگوت SMN1 در ۹۰ درصد (۶۹/۷۷) بیماران، حذف همزمان هر دو اگزون ۷ و ۸ از ژن SMN1 در ۸۶ درصد و حذف اگزون ۷ به تنهایی در ۴ درصد مشاهده شد. حذف اگزون ۵ ژن NAIP به همراه حذفشدگی در ژن SMN1 در ۵۴/۵ درصد از بیماران مشاهده شد. فراوانی حذف NAIP به طور معنیداری در بیماران نوع I نسبت به انواع II و III بالاتر است.*

نتیجهگیری: *در این بیماری میتوان از ژن SMN1 برای تأیید علایم بالینی بیماری و از ژن NAIP برای تعیین میزان شدت بیماری استفاده نمود.*

واژگان کلیدی: آتروفی عضلانی- نخاعی، ژن SMN1، ژن NAIP، ارتباط ژنوتیپ - فنوتیپ

مقدمه

بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی Spinal Muscular Atrophy(SMA) از جمله بیماریهای ماهیچهای- عصبی میباشد. این بیماری بعد از بیماری فیبروزکیستیک (Cystic Fibrosis) شایعترین اختلال اتوزومیمغلوب در دنیا گزارش شده است (۱). در این بیماری نورونهای حرکتی شاخ قدامی نخاع و پایهی مغز تحلیل رفته و فرد مبتلا در انجام بعضی حرکات ارادی دچار مشکل میشود (۲). احتمال ناقل بودن افراد ۱/۴۰ و میزان شیوع این بیماری یک در شش هزار تا ده هزار تولد زنده است (۳). این بیماری از لحاظ بالینی دارای سه نوع مختلف میباشد. در نوع

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، مربی دانشگاه تبریز
۲- دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی مولکولی، دانشیار دانشگاه تبریز
۳- فوقتخصص مغز و اعصاب، استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز

Archive of SID
www.SID.ir

یک (Werdnig-Hoffmann) که شدیدترین تیپ بیماری SMA محسوب می‌شود، سن بروز علایم از تولد تا شش ماهگی است. در دوران جنینی، جنین‌های مبتلا به بیماری SMA دارای فعالیت و حرکت نسبتا کمی در مقایسه با جنین‌های نرمال هستند. در این نوع از بیماری SMA، نوزاد مبتلا قادر به غَلت خوردن و نشستن نبوده و معمولا به دلیل مشکلات تنفسی قبل از سن دو سالگی فوت می‌شود (۴). در تیپ دو این بیماری، که شکل حدواسط بیماری بوده، زمان بروز علایم در بین بیماران از شش ماهگی تا بیست و چهار ماهگی است. این بیماران به تنهایی قادر به نشستن بوده ولی برای راه رفتن نیاز به کمک دارند. در این بیماران به ندرت هیپرتروفی کاذب ماهیچه‌های ساق پا نظیر مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن نیز دیده می‌شود. با توجه به میزان ضعف عضلات تنفسی معمولا این بیماران تا بیش از ده سال عمر می‌کنند. تیپ سه این بیماری که Kugelberg-Welander نیز نامیده می‌شود، خفیف‌ترین شکل بیماری است. در این بیماران سن شروع علایم بالینی از ۱۸ ماهگی به بعد بوده و این مبتلایان به تنهایی قادر به راه رفتن می‌باشند. در این افراد هیپرتروفی ماهیچه‌های ساق پا و رعشه‌ی دست‌ها نیز دیده می‌شود (۲). در سال ۱۹۹۵ ژن مربوط به بیماری SMA توسط لفبور و همکارانش (۵) تشخیص داده شد. این ژن که SMN نامیده می‌شود، در اکثر این بیماران دچار حذف‌شدگی است. مطالعات بعدی نشان دادند که ژن‌های مؤثر دیگری مانند [NAIP] (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein)، P44 و H4F5(SERF1) وجود دارند که در شدت بروز این بیماری مؤثرند. جایگاه کروموزومی تمامی این ژن‌ها بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ می‌باشد. ژن SMN دارای دو نسخه‌ی سانترومری یا SMNc (SMN2) و تلومری یا SMNt (SMN1) است. تفاوت این دو نسخه در ۸ جفت باز است که دو جفت آن‌ها در اگزون ۷ و اگزون ۸ قرار دارد. تفاوت‌های مذکور امکان تشخیص نسخه‌ی سانترومری از تلومری را مقدور می‌سازد (۶). ژن NAIP از جمله ژن‌های مؤثر در این بیماری است که نقش آن تعدیل عملکرد پروتئین SMN می‌باشد (۷). نقش این ژن در بیماری‌زایی SMA به طور کامل مشخص نیست ولی آزمایشات مختلف نشان داده که پروتئین کد شده توسط این ژن بر تمایز و بقای سلول‌های عصبی که دارای نرون‌های حرکتی می‌باشند اثر می‌گذارد. بنابراین یک رابطه‌ی کاملا نزدیک بین NAIP و میزان تخریب نرون‌ها در مبتلایان به SMA گزارش شده است. بر اساس این یافته‌ها ژن NAIP به عنوان یک فاکتور تعدیل‌کننده در بیماری‌زایی SMA نقش دارد ولی مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا نقش عملکردی آن را ثابت نماید (۸). در این مطالعه ویژگی‌های ژنوتیپی و فنوتیپی ۷۷ بیمار مبتلا به SMA در منطقه‌ی آذربایجان‌شرقی، به منظور مطالعه‌ی ژن‌های SMN و NAIP و ارتباط این یافته‌های مولکولی با علایم بالینی قابل اندازه‌گیری مانند سن شروع و شدت بیماری (سن در زمان فوت) مورد بررسی قرارگرفته است.

روش بررسی

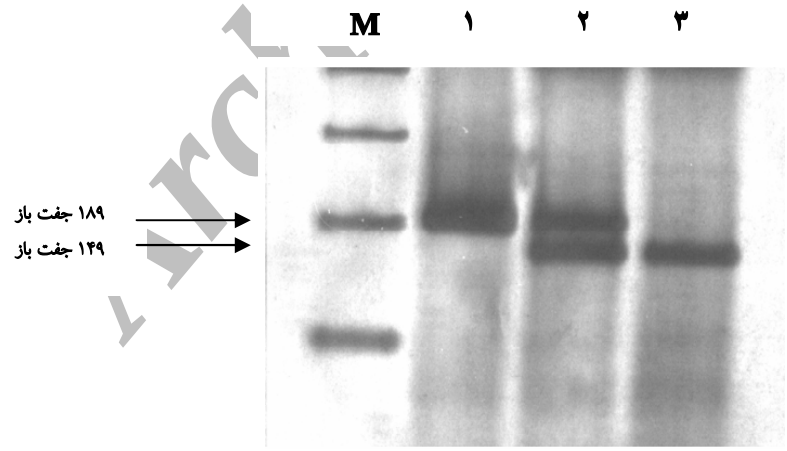
معرفی بیمار و استخراج DNA: از افرادی‌که توسط متخصصین مغز و اعصاب بیمارستان کودکان تبریز به عنوان مشکوک به SMA به مرکز ژنتیک تبریز معرفی شده بودند، خون‌گیری توسط پرستار همکار بعد از اخذ رضایت کتبی از والدین به عمل آمد. خون سریعا به آزمایشگاه مرکزی جهت استخراج DNA منتقل شده و یا در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری تا در زمان مناسب به آزمایشگاه منتقل شود. استخراج DNA با روش فنل ــ کلروفرم صورت پذیرفت. به اختصار بعد از لیزکردن گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید جدا و در بافر SE، SDS ۱۰ درصد و پروتئنازK حل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت لیزکردن سلول‌های سفید خون در بن‌ماری

Archive of SID
www.SID.ir

نگه‌داری شد. بعد از اضافه‌کردن فنل- کلروفورم به اندازه‌ی یکسان، محلول حاوی DNA جدا و به این مایع به حجم ۱ به۱۰ سدیم استات (3M) و دو برابر حجم خون اولیه اتانول مطلق سرد افزوده تا رشته‌ی DNA ظاهر شود. رشته‌ی DNA حاصل در مقدار لازمی از آب استریل شده یا در بافر TE حل شد.

تکنیک‌های مولکولی: در این تحقیق برای شناسایی فقدان هموزیگوت اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 از روش PCR/RFLP (۹) استفاده شد. محصول PCR اگزون ۷ (مربوط به ژن‌های SMN1 و SMN2)، ۱۸۹جفت باز (شکل۱) و محصول PCR اگزون ۸ (مربوط به ژن‌های SMN1 و SMN2)، ۱۸۸ جفت باز بود (شکل۲). برای تشخیص اگزون‌های دو ژن SMN1 و SMN2 از آنزیم‌های محدودالاثر استفاده شد. در مورد اگزون ۷ از آنزیم محدودالاثر *DraI* استفاده شد که این آنزیم فقط اگزون ۷ نسخه‌ی سانترومری ژن SMN (SMN2) را برش داده و دو قطعه‌ی ۱۴۹ و ۴۰ جفت بازی ایجاد می‌کند و به منظور تشخیص دو اگزون ۸ تکثیریافته از آنزیم *DdeI* استفاده شد که تنها نسخه‌ی سانترومری اگزون ۸ را برش داده و دو قطعه‌ی ۱۲۵ و ۶۳ جفت بازی تولید می‌کند (شکل۲). برای بررسی حذف‌شدگی در ژن NAIP از تکنیک مولتی‌پلکس PCR (۱۰) برای اگزون‌های ۵ و ۱۳ از این ژن و میکروستلایت (D5S1416) به عنوان کنترل داخلی دوم استفاده شد (شکل۳). جهت سهولت بررسی ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ، مبتلایان به سه گروه ژنوتیپی تقسیم شدند. گروه ژنوتیپی۱ به افرادی اطلاق می‌شود که دارای حذف هم‌زمان اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 و حذف اگزون ۵ ژن NAIP بودند. گروه ژنوتیپی۲ برای افرادی که دارای حذف اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 بوده و از نظر اگزون ۵ ژن NAIP سالم بودند و گروه ژنوتیپی ۳ به افرادی اطلاق می‌شود که تنها حذف‌شدگی اگزون ۷ ژن SMN1 را داشته و برای اگزون ۸ ژن SMN1 و اگزون ۵ ژن NAIP سالم بودند.

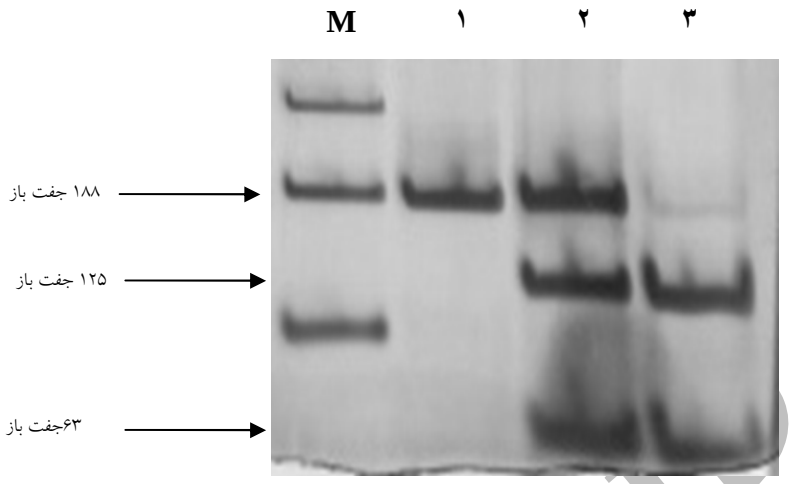
آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از تست مربع کای X^2 انجام گرفت و ۰/۰۵ >P ملاک بررسی در نظر گرفته شد.



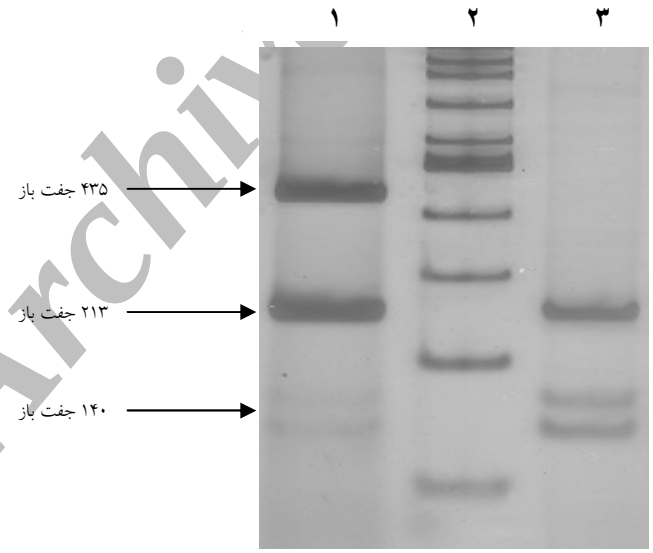
شکل ۱: مطالعه‌ی اگزون ۷ ژن SMN1 در افراد مشکوک به بیماری SMA با استفاده از روش PCR-RFLP.

M، نشان‌گر یا Ladder. ستون ۱، محصول PCR از اگزون ۷ که مربوط به SMN1 و SMN2 می‌باشد. جهت تمیز اگزون ۷ در این دو ژن، محصول PCR توسط آنزیم محدودالاثر DraI قطع شد (محصول PCR اگزون ۷ ژن SMN2 به دو قطعه‌ی ۱۴۹ و ۴۰ جفت بازی تقسیم می‌شود که باند مربوط به قطعه‌ی ۴۰ جفت بازی از ژل خارج شده است) و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز شد. ستون ۲، محصول این هضم‌شدگی مشاهده می‌شود که دو باند مربوط به دو ژن کاملا از هم تمیز داده می‌شود. ستون ۳، مربوط به بیماری مبتلا به SMA است که فاقد اگزون ۷ ژن SMN1 بوده و ژن SMN2 سالم است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: مطالعه‌ی اگزون ۸ ژن SMN1 در افراد مشکوک به بیماری SMA با استفاده از روش PCR-RFLP. M، نشان‌گر یا Ladder است. ستون ۱، محصول PCR از اگزون ۸ که مربوط به ژن‌های SMN1 و SMN2 است. جهت تمیز اگزون ۸ در این دو ژن، محصول PCR توسط آنزیم محدودالاثر DdeI برش داده شد و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز شد. در ستون ۲، محصول این هضم‌شدگی مشاهده می‌شود که سه باند مربوط به دو ژن (دو باند مربوط به محصول هضم ژن SMN2 و یک باند مربوط به محصول هضم‌نشده‌ی ژن SMN1) کاملا از هم تمیز داده می‌شوند. ستون ۳، مربوط به بیماری مبتلا به SMA است که فاقد اگزون ۸ ژن SMN1 بوده و ژن SMN2 سالم می‌باشد.



شکل ۳: مطالعه‌ی مولکولی ژن NAIP توسط مولتی‌پلکس PCR که بر روی ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز شده و با نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شده است. در این شکل باند bp ۴۳۵ مربوط به اگزون ۵، باند bp ۲۱۳ مربوط به اگزون ۱۳ و باند bp ۱۴۰ مربوط به میکروستلایت D5S 1416 می‌باشد. حذف اگزون ۵ نشان‌دهنده‌ی حذف‌شدگی ژن NAIP است. اگزون ۱۳ و میکروستلایت به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرارگرفتند. ستون ۱، کنترل مثبت پروژه است که باندهای مربوط به اگزون ۵ ، ۱۳ و میکروستلایت در آن قابل مشاهده هستند. در ستون ۳، باند مربوط به اگزون ۵ حذف شده است که این مورد دچار حذف‌شدگی ژن NAIP شده است. در ستون ۲، سایز مارکر قرارگرفته که توسط آن اندازه‌ی باندها قابل شناسایی شود.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

بر اساس علایم بالینی و کلینیکی از ۷۷ بیمار ارجاعی، ۵۲ نفر مبتلا به تیپ یک، ۱۱ مبتلا به تیپ دو و ۱۴ مبتلا به تیپ سه بیماری تشخیص داده شده بودند. نتایج مشاهده شده از آنالیز ژنوتیپ‌های SMN1 و NAIP برای ۷۷ بیمار مانند دیگر مطالعات انجام شده می‌باشد. در این مطالعه حذف هموزیگوت SMN1 در ۹۰ درصد (۶۹/۷۷) بیماران مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: الگوی حذف ژنی و علایم بالینی

SMN1		NAIP	Clinical subtype		
اگزون ۷	اگزون ۸	اگزون ۵	I N = ۵۲	II N =۱۱	III N= ۱۴
del	del	del	۳۹	۲	۱
del	del	non- del	۷	۵	۱۲
del	non- del	Non-del	۱	۱	۱
non- del	non- del	non- del	۵	۳	۰

(N= تعداد بیماران)

و حذف هر دو اگزون ۷ و ۸ از ژن SMN1 در ۸۶ درصد (۶۶/۷۷) و حذف اگزون ۷ به تنهایی در ۴ درصد (۳/۷۷) مشاهده شد. حذف اگزون ۵ ژن NAIP به همراه حذف‌شدگی در ژن SMN1 در ۵۴/۵ درصد (۴۲/۷۷) از بیماران مشاهده شد. همان طوری که در جدول ۲ نیز مشخص شده است فراوانی حذف NAIP به طور معنی‌داری (X^2 =۱۵/۴۲ و P=۰/۰۰۰) در تیپ I بیماری نسبت به تیپ‌های II و III بیماری بالاتر است. در این بررسی حذف ژن SMN1 در تیپ‌های مختلف بیماری SMA مشاهده شد.

جدول۲: الگوی حذف‌شدگی ژنی در مبتلایان به تیپ‌های مختلف بیماری

		SMN		NAIP
		حذف‌شدگی اگزون ۷	حذف‌شدگی اگزون ۸	حذف‌شدگی اگزون ۵
SMA (I نوع)	(N=۵۲)	(۹۰.۴) ۴۷	(۸۸.۵) ۴۶	(۷۵)* ۳۹
SMA (II نوع)	(N=۱۱)	(۷۳) ۸	(۶۴) ۷	(۱۸) ۲
SMA (III نوع)	(N=۱۴)	(۱۰۰) ۱۴	(۹۳) ۱۳	(۷) ۱

(N = تعداد بیماران)

** اعداد داخل پرانتز بیان‌گر درصد است*

به منظور در اختیار داشتن تعداد افراد متناسب با آنالیز آماری، بیماران به دو گروه شدید (تیپ I) و گروه ملایم (انواع II و III) تقسیم شدند. مقایسه‌ی آماری مبتلایان دارای الگوی ژنوتیپی۱ با مبتلایان دارای الگوی ژنوتیپی۲ نشان‌گر این است که فراوانی ژنوتیپ۱ در بین مبتلایان به نوع شدید بیماری (تیپ یک، ۳۹ نفر) در مقایسه با انواع ملایم

Archive of SID
www.SID.ir

بیماری (انواع II و III، ۳ نفر) به طور معنی‌داری (X^2 =۱۵/۴۲ و P=۰/۰۰۰) بیشتر است. به طوری که ژنوتیپ ۱ در ۷۵ درصد (۳۹/۵۲) از بیماران تیپ I ولی تنها در ۱۸ درصد (۲/۱۱) از تیپ II و ۷ درصد (۱/۱۴) از تیپ III مشاهده شد. با مقایسه‌ی دو گروه ژنوتیپی ۱ و ۲ در مبتلایان به نوع یک SMA مشخص شد که با وجود تفاوت در ژنوتیپ افراد، شدت علایم بالینی مشابه می‌باشد. این یافته مؤید این نکته است که در تیپ I بیماری، حذف ژن NAIP بر فنوتیپ بیماری تأثیری ندارد. در ۸ مورد از ۷۷ مورد بیمار مطالعه شده حذف‌شدگی مشاهده نشد و دسته‌بندی بر اساس یافته‌های بالینی انجام گرفت.

بحث

ژنتیک بیماری اتوزومی مغلوب SMA بسیار پیچیده می‌باشد و ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ در این بیماری هنوز کاملا مشخص نشده است. به طور کلی بر اساس مطالعات انجام شده توسط لفبور و همکارانش در سال ۱۹۹۵ مشخص شده است که در ۹۸/۶ درصد از مبتلایان به بیماری SMA حذف‌شدگی در ژن SMN وجود دارد. در این میان حذف‌شدگی اگزون ۷ به تنهایی برابر ۹۵ الی ۹۸ درصد است. نتایج مطالعه حاضر نظیر دیگر جمعیت‌ها مانند جمعیت‌های ایالات متحده آمریکا، آلمان، ایتالیا، اسپانیا و چین نشان می‌دهد که بیش از ۹۰ درصد بیماران SMA دارای حذف‌شدگی در اگزون ۷ و اگزون ۸ ژن SMN1 بودند (۱۴-۱۱). البته درصدهای کم‌تر حذف‌شدگی نیز در مطالعات دیگر بر روی جمعیت‌هایی نظیر جمعیت کانادا، ایالات متحده آمریکا، لهستان گزارش شده است (۱۸-۱۵). بر اساس مطالعه‌ای که بر روی جمعیت آذربایجان شرقی و مناطق مجاور انجام داده شد، میزان حذف‌شدگی ژن SMN در ۹۰/۳ درصد بیماران تیپ I و در ۷۲/۸ درصد بیماران تیپ II و در ۱۰۰ درصد بیماران تیپ III مشاهده شده است. از آن جا که در اکثر بیماران حذف‌شدگی اگزون‌های ژن SMN1 مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد همان‌گونه که توسط لفبور و همکارانش پیشنهاد شده، جهش در این ژن نقش تعیین‌کننده و اساسی در بروز این بیماری داشته باشد.

بر اساس مطالعات انجام شده ژن NAIP بیشتر در نوع I بیماری متحمل حذف‌شدگی شده و در انواع II و III سالم می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر نیز فراوانی حذف NAIP به طور معنی‌داری (X^2 =۱۵/۴۲ و P=۰/۰۰۰) در نوع I نسبت به انواع II و III بالاتر است. نتایج نشان می‌دهد که در اکثر موارد حذف‌شدگی ژن NAIP به همراه حذف‌شدگی در اگزون‌های ژن SMN1 بوده ولی موارد استثنایی نیز وجود دارد. بررسی فنوتیپ‌های بالینی گروه‌های ژنوتیپی بر اساس حذف‌شدگی در ژن SMN و NAIP نشان می‌دهد که گروه ژنوتیپی ۱ با سن شروع و سن مرگ پایین‌تری همراه است و علایم شدیدتری را در مقایسه با گروه ژنوتیپی ۲ نشان می‌دهد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود. به علاوه، با توجه به این نکته که در نوع I بیماری هیچ‌گونه اختلافی در سن شروع علایم بالینی و میزان بقای بین گروه‌های ژنوتیپی ۱ و ۲ وجود ندارد، می‌توان دریافت که حضور یا عدم حضور NAIP تعیین‌کننده‌ی فنوتیپ SMA در نوع I بیماری نمی‌باشد.

در این مطالعه نیز مانند دیگر مطالعات اساس مولکولی بیماری در آن گروه از مبتلایان به نوع I که دارای حذف‌شدگی ژن SMN1 بوده ولی حذف‌شدگی NAIP در آن‌ها مشاهده نمی‌شود، نامشخص باقی می‌ماند. در یک مطالعه نشان داده شده است که گروه ژنوتیپی ۱ احتمالا در اثر حذف ژن SMN1 و گروه ژنوتیپی ۲ در انواع II و III در اثر تبدیل ژنی (تبدیل ژن SMN1 به SMN2) باشد. با این حال برای گروه ژنوتیپی ۲ در بیماران نوع I امکان حذف واقعی یا تبدیل ژنی وجود دارد (۱۹). مطالعه‌ی حاضر علاوه بر این که اهمیت ژن SMN را در ایجاد بیماری نشان می‌دهد، حذف هم‌زمان ژن‌های SMN و NAIP را با شدت بیماری در

Archive of SID

www.SID.ir

ارتباط می‌داند. بر اساس گزارشات دیگر حذف هم‌زمان ژن‌های SMN و NAIP با احتمال پنج برابر باعث بروز بیماری به صورت نوع I می‌شود (۲۰). با این وجود، در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که حذف ژن NAIP در بین مبتلایان به نوع I بیماری بر روی شدت بیماری تأثیری ندارد. حذف‌شدگی ژن‌های SMN1 و NAIP در هشت بیمار ارجاع داده شده مشاهده نشد. بر اساس مطالعات انجام شده درصد کمی از مبتلایان، فاقد حذف‌شدگی قابل‌تشخیص در اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 هستند. بنابراین وجود علایم کلینیکی در این بیماران می‌تواند ناشی از جهش در توالی‌های پروموتوری یا اینترونی ژن مربوطه و یا جهش نقطه‌ای در اگزون‌های مورد مطالعه باشد که قابل‌تشخیص با تکنیک PCR-RFLP نیست. بنابراین بررسی توالی‌های دیگر این ژن در آینده پیشنهاد می‌شود. دلیل دیگر می‌تواند مربوط به هتروژنی ژنتیکی باشد یعنی این که جهش در ژن یا ژن‌های دیگر، فنوتیپی مشابه با فنوتیپ بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی را ایجاد کند. نکته‌ی قابل‌تأملی که وجود دارد، فقدان ژن SMN1 در هر سه نوع بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی می‌باشد که این امر به فقدان ارتباط ژنوتیپ- فنوتیپ در این بیماری تأکید دارد. بسیاری از مطالعات برای توضیح عدم وجود رابطه‌ی ویژه بین ژنوتیپ و فنوتیپ به وجود ژن‌های دیگری در ناحیه‌ی اطراف ژن SMN اشاره می‌کنند که در بیماران نوع I حذف شده است.

نتیجه‌گیری

برای تشخیص مولکولی بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی، مطالعه‌ی حذف‌شدگی اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 در منطقه‌ی مورد مطالعه در قدم اول نقش مهمی دارد. هم‌چنین تشخیص بالینی دقیق در طبقه‌بندی بیماری آتروفی عضلانی- نخاعی که از نظر بالینی با بعضی بیماری‌های تحلیل عصبی دیگر تشابه زیاد دارد، به نظر ضروری می‌آید. بر اساس این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین حذف‌شدگی ژن NAIP با شدت علایم بالینی وجود دارد. بنابراین اگرچه عمل ژن NAIP در این بیماری هنوز کاملا شناخته شده نیست ولی خود می‌تواند به عنوان نشانه‌ای برای شدت بیماری مدنظر قرارگیرد.

تقدیر و تشکر

مؤلفین از خانواده‌ی کلیه‌ی افراد مبتلا به دلیل همکاری در این پروژه‌ی تحقیقاتی کمال تشکر را داشته و هم‌چنین از همکاری سرکار خانم رقیه ابراهیمی سپاسگزار هستند. مؤلفین از امور پژوهشی دانشگاه تبریز به دلیل پشتیبانی مالی کمال تشکر و سپاسگزاری را دارد.

منابع

1- Lefebvre S, Burglan L, Frezal J, Munnich A, MeliK J. The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1998; 7 (10): 1531- 6.

2- Panigrahi I, Kesari A, Phadke SR, Mittal B. Clinical and molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Neurol India*. 2002; 50: 117-22.

3- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of BCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet.* 1995; 5: 257-63.

4- Kim CA, Passos-Bueno MR, Marie SK, et al. Clinical and molecular analysis of spinal muscular

Archive of SID

www.SID.ir

atrophy in Brazilian patients. *Genet Mol Biol.* 1999; 22 (4): 487-92.

5- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995; 80: 155-66.

6- Zatkova A, Hahnan E, Wirth B, Kadasi L. Analysis of the SMN and NAIP genes in solvake spinal muscular atrophy patients. *Hum Hered.* 2000; 50: 171-4.

7- Vyas Sh, Bechade C, Riveau B, Downward J, Triller A. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Human Mol Genet.* 2002; 11(22): 2751-4.

8- Akutsu T, Nishio H, Sumino K, et al. Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribiotion of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci.* 2002; 48(1-2): 25-31.

9- Van der steege G, Grootscholten PM, van der vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet.* 1995; 345(8955): 985-6.

10- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995; 80(1): 167-78.

11- Wang CH, Xu J, Carter TA, et al. Analysis of the survival motor neuron (SMN) gene in spinal muscular atrophy families. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: A253.

12- Wirth B, Rudnik-Schöneborn S, Hahnen E, Rohrig D, Zerres K. Prenatal prediction in families with autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy (5q11.2-q13.3): molecular genetics and clinical experience in 109 cases. *Prenat Diagn.* 1995; 15(5): 407- 17.

13- Brahe C, Bertini E. Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med.* 1996; 74(10): 555-62.

14- Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, et al. A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet.* 1995; 11(3): 335-7.

15- Brzustowicz LM, Ricketts A, Hausmanowa-Petrusewicz I. Extended haplotype analysis and deletions in the SMN gene in Polish families with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: A209.

16- Aubry HL, Mackenzie AE, Surth LC. Delineating the mutations in spinal muscular atrophy: improved molecular detection and genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: A234.

17- Kant JA, Rennert H, Joshi I, Wilson RB. Sensitivity of direct testing for SMN gene deletions in autosomal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: A331.

18- Al Rajeh S, Majumdar R, Awada A, et al. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Saudi spinal muscular atrophy patients. *J Neurol Sci.* 1998; 158(1): 43-6.

19- Burghes AHM. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(1): 9-15.

20- Somerville MJ, Hunter AGW, Abury HL, Korneluk RG, Mackenzi AE, Surhl C. Clinical

Archive of SID

www.SID.ir

application of the Molecular diagnosis of spinal muscular atrophy: deletions of neuronal apoptosis inhibitor protein and survival motor neuron genes. *Am J Med Genet.* 1997; 69: 159-16.

Archive of SID

www.SID.ir

Genotype – Phenotype Correlation in Patients with Spinal Muscular Atrophy in East Azerbaijan

Omrani O, Jabbarpour Bonyadi M, Barzgar M

Corresponding Author's Address: Department of Genetics, Faculty of Natural Science, University of Tabriz

E-mail: o_omrani@tabrizu.ac.ir

Background and Objectives: The neuromuscular degenerative disorder, known as spinal muscular atrophy (SMA), is a common fatal disease in neonates. In most patients with SMA, exon 7 and/or exon 8 of SMN1 gene is deleted. It is reported that the deletion of exon 5 from NAIP gene may be involved in the severity of SMA disease. The present study was aimed to evaluate the genotype- phenotype correlation of SMN1 and NAIP genes in SMA patients of East Azerbaijan.

Materials and Methods: We analyzed SMN1 and NAIP genes in SMA patients referred from East Azerbaijan province using molecular methods. The genome of SMA patients, diagnosed by neurologists, was analyzed for exons 7 and 8 of SMN1 gene and exon 5 of NAIP gene using PCR-RFLP and Multiplex-PCR techniques, respectively.

Results: Homozygous deletions of SMN1 were detected in 90% of SMA Patients. Exon 5 from the NAIP gene was deleted in 54.5% of patients and its deletion was more frequent in SMA type I (75%) as compared to type II (18%) and type III (7%).

Conclusion: The results further support that the analysis of the SMN1 gene may be used for confirming clinical manifestations of SMA, while the analysis of NAIP gene can be used to determine the severity of the disease.

Key words: Spinal muscular atrophy, SMN1 gene, NAIP gene, Genotype-phenotype correlation

Archive of SID

www.SID.ir