

Возможные генетические модификаторы спинальной мышечной атрофии

Маретина М.А.^{1,2}, Киселев А.В.¹, Баранов В.С.^{1,2}

¹ ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта», 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия 3, телефон/факс (812) 328-98-09; e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9.

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — тяжелое нейродегенеративное заболевание, вызванное мутациями в гене *SMN1*. СМА — клинически полиморфное заболевание: для пациентов с разными формами (I–IV типы СМА) характерны различия в тяжести симптомов и продолжительности жизни. Причиной вариабельности могут быть генетические факторы, влияющие на проявление и тяжесть заболевания. Наиболее известным модификатором СМА является число копий гена *SMN2*. Однако количество копий этого гена не всегда коррелирует с тяжестью СМА, что указывает на существование других факторов, модифицирующих клинические проявления заболевания. К ним могут относиться различные белки, влияющие на экспрессию гена *SMN2* или уровень белка SMN, а также факторы, определяющие выживаемость мотонейронов. Исследование таких факторов необходимо для лучшего понимания механизмов развития СМА и может иметь важное клиническое значение.

Ключевые слова: спинальная мышечная атрофия, клинический полиморфизм, гены-модификаторы, ген *SMN2*.

Работа частично поддержана грантом Администрации Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Possible genetic modifiers of spinal muscular atrophy

Maretina M.A.^{1,2}, Kiselev A.V.¹, Baranov V.S.^{1,2}

¹ D.O.Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, 199034, Saint-Petersburg, Mendeleevskaya line 3, tel/fax 7 (812) 328-98-09, e-mail: ankiselev@yahoo.co.uk

² Saint-Petersburg State University, 199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya emb. 7/9

Spinal muscular atrophy (SMA) is a severe neurodegenerative disorder caused by mutations within the *SMN1* gene. SMA is a highly polymorphic disease: patients with different forms (SMA types I–IV) are characterized by variability of severity and duration of survival. Such discrepancy can be caused by genetic factors influencing disease manifestation. *SMN2* gene copy number is the most prominent SMA modifier. Still the number of copies of this gene does not always correlate with SMA severity, indicating the existence of other factors modifying clinical manifestation of the disease. Different proteins influencing *SMN2* gene expression and SMN protein level as well as factors determining motor neuron survival might be among them. The study of such factors is necessary for better understanding the mechanisms of SMA development and might have substantial clinical relevance.

Key words: spinal muscular atrophy, clinical polymorphism, modifying genes, *SMN2* gene.

Введение

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — распространенное аутосомно-рецессивное заболевание. Основным симптомом является прогрессирующая мышечная слабость, которая возникает из-за потери функции мотонейронов передних рогов спинного мозга вследствие мутаций в гене *SMN1* (ген выживания мотонейронов) [1]. Частота встречаемости СМА составляет 1:6500–8000 новорожденных, носителем является каждый 40-й человек [2].

СМА относится к числу клинически полиморфных наследственных заболеваний. В зависимости от тяжести и времени манифестации выделяют 4 типа СМА [3]. I тип — болезнь Верднига—Гоффмана — наиболее тяжелая форма заболевания. Она характеризуется развитием мышечной слабости в первые шесть месяцев жизни и

приводит к летальному исходу на 12–14 месяце жизни, как правило в результате дыхательных нарушений. II тип — промежуточная форма, развивается также достаточно рано, но медленнее по сравнению с типом I. Пациенты способны сидеть без посторонней помощи, но не могут стоять и ходить. Продолжительность жизни составляет 15–20 лет. Тип III — болезнь Кугельберга—Веландера — более легкая форма, развивается достаточно медленно. Пациенты способны ходить и нередко живут до 30–40 лет и больше. Также выделяют IV форму СМА, которая проявляется после 20 лет. Её симптомы выражены очень слабо, и продолжительность жизни больных не отличается от продолжительности жизни здоровых людей.

В 95% случаев к развитию СМА приводят делеции гена *SMN1* в гомозиготном состоянии. В остальных слу-

чая причиной заболевания являются точковые мутации в гомозиготном состоянии, либо в компаунде с делециями [4]. Ген *SMN1* расположен на хромосоме 5 в теломерной области в локусе 5q13 и имеет высоко гомологичную копию в центромерной части — ген *SMN2* [1]. Гены различаются лишь 5 нуклеотидами и кодируют одинаковый белок SMN, однако замена цитозина на тимин в экзоне 7 гена *SMN2*, не изменяя аминокислотной последовательности, нарушает сплайсинг прематричной РНК [5]. Ген *SMN1* экспрессирует полноразмерный транскрипт, с которого считывается функционально активный белок, тогда как лишь около 10% транскриптов гена *SMN2* являются полноразмерными, а в большинстве случаев экзон 7 не включается в мРНК [5]. Белок, транслируемый с такой мРНК, не способен к правильной конформации и неактивен.

Белок SMN был обнаружен как в цитоплазме, так и в ядре клеток всех тканей [6]. Он входит в состав комплекса, отвечающего за биогенез малых ядерных РНП (мяРНП), а также за метаболизм, сборку и транспорт различных РНП [7]. Белок SMN в ядре входит в состав особых структур — «gems» («Gemini of coiled bodies» — «близнецы телец Кахаля»), названных так по причине сходства строения и функций и близкого расположения. Тельца Кахаля участвуют в созревании, сборке и транспорте мяРНК, как и ассоциированные с ними gems [8].

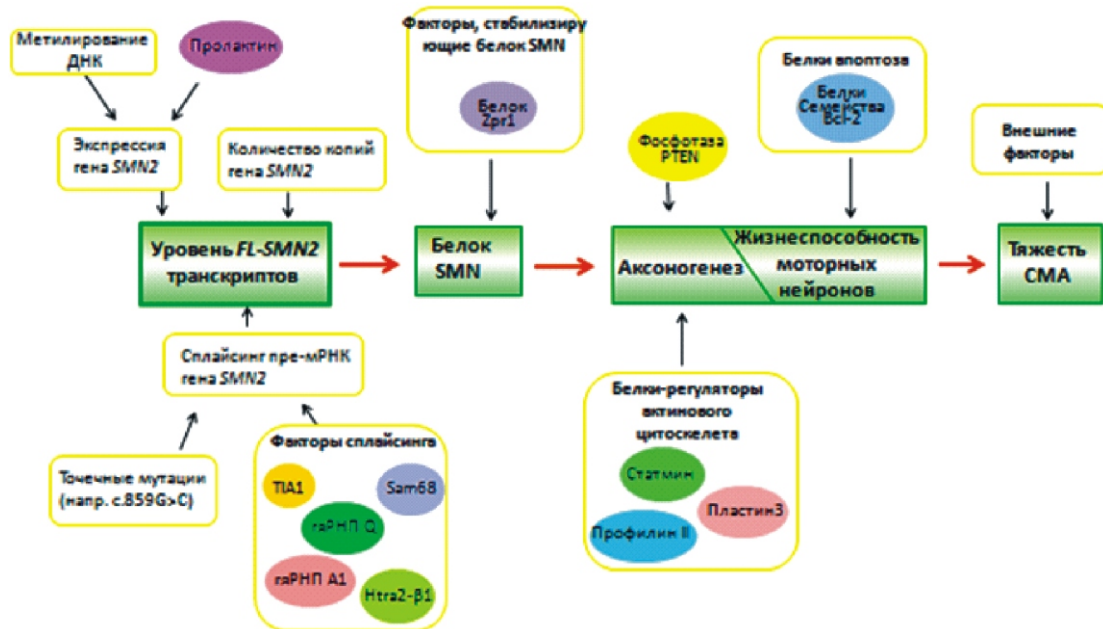
Кроме того, белок SMN выполняет ряд функций, специфичных для мотонейронов, таких как участие в созревании и работе нервно-мышечного синапса, осуществление ядерно-цитоплазматического, аксонального и дендритного транспорта различных мРНК [9, 10].

До конца не ясно, нарушение каких именно функций белка SMN приводит к специфичному поражению моторных нейронов и развитию СМА. На этот счет существует две гипотезы: согласно одной из них, мотонейроны могут нуждаться в повышенном уровне мяРНП по сравнению с другими клетками; согласно другой — СМА развивается в результате нарушения специфичных для мотонейронов функций белка SMN. Факты свидетельствуют о том, что и те и другие функции могут быть важны для поддержания жизнеспособности мотонейронов.

Вследствие мутаций в гене *SMN1* у больных СМА основным источником белка SMN является ген *SMN2*. Соответственно, увеличенное количество копий гена *SMN2* или повышенный уровень экспрессии данного гена должны приводить к более мягкому течению болезни. Действительно, была выявлена корреляция между числом копий гена *SMN2* и тяжестью СМА. Однако данная корреляция не абсолютна, что можно объяснить существованием дополнительных факторов, модифицирующих фенотип пациентов. К таким факторам могут относиться как те, которые влияют на экспрессию гена *SMN2* или стабилизацию белка SMN, так и те, которые влияют на жизнеспособность моторных нейронов независимо от SMN. Схема основных факторов, которые могут влиять на тяжесть СМА, приведена на рисунке.

Ген *SMN2* как основной модификатор фенотипа СМА

Ген *SMN2* отсутствует у 5% населения, что не имеет фенотипического проявления у здоровых людей [11]. Однако пациентам с СМА при отсутствии полноценных



Основные возможные модификаторы тяжести спинальной мышечной атрофии. *FL-SMN2* — полноразмерные транскрипты гена *SMN2*.

копий гена *SMN1* необходимо наличие хотя бы одной копии гена *SMN2*. Число копий гена *SMN2*, как правило, варьирует от 1 до 4, но в редких случаях может достигать 8 копий на геном [12]. Увеличение количества копий происходит в результате дупликаций или конверсии гена *SMN1* в ген *SMN2* [13].

Исследования показали обратную зависимость между числом копий гена *SMN2* и тяжестью СМА. В ряде работ было продемонстрировано, что большинство пациентов со СМА I типа имеют одну или две копии гена *SMN2*, пациенты со СМА II типа имеют три копии гена *SMN2*, у большинства пациентов со СМА III типа обнаруживается три или четыре копии гена *SMN2* и пациенты с IV типом заболевания, как правило, несут 4 копии гена *SMN2* [14, 15]. Роль гена *SMN2* в качестве основного модификатора фенотипа пациентов подтверждается и тем, что наличие четырех, пяти или более копий гена *SMN2* может привести к полному отсутствию симптомов заболевания, хотя это случается очень редко [12, 16].

Корреляция между числом копий гена *SMN2* и фенотипом показана и в эксперименте на трансгенных мышцах со СМА. У мышей ген *Smn* представлен только одной копией, гомологичной гену *SMN1* человека. Гомозиготные делеции в этом гене приводят к летальному исходу у мышей эмбрионов на ранних стадиях развития [17]. Для создания модели СМА человека на мышцах проводятся скрещивания мышей, гетерозиготных по нокаутированному гену *Smn*, с мышцами с введенным трансгеном *SMN2* человека [18]. В результате последующих скрещиваний получают мышей с мутациями *Smn* и трансгеном *SMN2*. У таких животных развиваются симптомы СМА, такие как мышечная слабость, нарушение подвижности, нарушения в формировании нервно-мышечного синапса, при этом степень проявления симптомов зависит от количества копий трансгена *SMN2*. При единичных копиях *SMN2* у мышей развивался фенотип, сходный с таковым у пациентов с СМА I типа, тогда как при наличии 8 копий трансгена мыши фенотипически не отличались от здоровых мышей [18].

Также была выявлена связь между числом копий гена *SMN2* и продолжительностью жизни больных СМА [12, 19]. У пациентов с I типом заболевания 1 копия гена *SMN2* определяет среднюю продолжительность жизни около 7 месяцев, максимальную — 11 месяцев; пациенты с двумя копиями *SMN2* живут в среднем 8 месяцев с летальным исходом до 21 месяца; 3 копии гена *SMN2* определяют среднюю продолжительность жизни около 37,5 месяцев [20–22].

В зависимости от числа копий гена *SMN2* различается и время манифестации болезни. Так, у пациентов с I типом СМА и одной копией гена *SMN2* заболевание развивается пренатально, при двух копиях этого гена — в первые 1–2 месяца жизни, при наличии трех копий — в течение первых 3–5 месяцев [21]. При исследовании группы взрослых пациентов было показа-

но, что у индивидов с тремя копиями гена *SMN2* болезнь проявляется раньше, чем у пациентов с четырьмя копиями гена *SMN2* (в $4,4 \pm 5,34$ и $7,5 \pm 6,0$ лет соответственно) [23].

Была установлена зависимость между числом копий *SMN2* и показателями физиологической шкалы SMAFRS (SMA functional rating scale), которая позволяет оценить двигательные функции пациентов [23]. Способность к самостоятельным действиям была выше у носителей 4 копий гена *SMN2* по сравнению с пациентами с 3 копиями. При обследовании пациентов со СМА I, II и III типа с количеством копий гена *SMN2* от 1 до 5 было обнаружено, что увеличение числа копий гена *SMN2* коррелирует с повышением уровня иннервации дистальных мышц и улучшением функционального мышечного статуса [24]. Оценка функционального статуса подразумевала необходимость вспомогательной вентиляции легких и способность самостоятельно сидеть и ходить.

Показано, что терапевтический эффект ингибиторов деацетилаз гистонов (вальпроевой кислоты, фенилбутирата) выражен сильнее у больных СМА с 3 и 4 копиями гена *SMN2* (большинство пациентов со СМА II и III типа). Соответственно, ген *SMN2* является не только модификатором СМА, но и фактором, который следует учитывать при фармакотерапии заболевания [25, 26].

Определение числа копий гена *SMN2* является важным критерием при диагностике СМА и особенно при раннем прогнозе развития заболевания. Однако число копий гена *SMN2* следует использовать только в качестве дополнительного маркера для прогноза клинического течения, так как выявленная корреляция не является абсолютной. Около 20% пациентов с I типом СМА имеют три копии гена *SMN2* и примерно у 4% пациентов со СМА III типа встречается 2 копии гена *SMN2* [27]. Описаны случаи разной тяжести заболевания у sibсов с одинаковым числом копий гена *SMN2* [28, 29]. Отсутствие полной корреляции между числом копий гена *SMN2* и тяжестью СМА может быть обусловлено различиями экспрессии разных копий гена *SMN2*, вызванными наличием точковых мутаций в гене, влиянием факторов сплайсинга или особенностями метилирования промоторной области гена.

Факторы, влияющие на сплайсинг пре-мРНК гена *SMN2*

Замена С на Т в гене *SMN2* нарушает важный энхансер сплайсинга на 5'-конце экзона 7, а также создает сайт сайленсера сплайсинга, который связывается с белком A1 гетерогенных ядерных РНП (гяРНП A1), ингибирующим включение седьмого экзона в транскрипт *SMN* [30, 31]. ГяРНП A1 взаимодействует с другим РНК-связывающим белком Sam68, что еще больше подавляет включение экзона 7 в мРНК [32].

Вероятность включения экзона 7 в транскрипт может быть повышена с помощью комплекса факторов сплайсинга, взаимодействующего с AG-богатым районом энхансера экзонного сплайсинга в центре экзона 7. Комплекс состоит из белков Htra2- β 1, Srp30c и гЯРНП G [11]. Гиперэкспрессия гена *Htra2- β 1* приводит к повышению уровня полноразмерных *SMN2* транскриптов почти до 80%. Высокая эффективность в восстановлении сплайсинга показана также для Т-клеточного цитоплазматического антигена TIA1. Установлено, что снижение уровня факторов Tga2- β , TIA1, гЯРНП Q приводит к увеличению вероятности пропуска экзона 7, при этом самое сильное влияние на этот процесс оказывало подавление белка TIA1 [33]. К противоположному эффекту приводит подавление активности белка Sam68, что стимулирует включение экзона 7 в мРНК [32].

Показано также, что не все копии гена *SMN2* одинаковы. Так, была описана замена гуанина на цитозин в положении 859 кодирующей последовательности (с.859 G>C) [34]. Данная мутация нарушает сайт связывания гЯРНП A1, в результате у пациентов с заменой с.859 G>C соотношение полноразмерных транскриптов (*FL-SMN*) к усеченным (*SMN Δ 7*) достигает 2,4, что значительно выше характерного для пациентов соотношения *FL-SMN/SMN Δ 7*, не превышающего 1 [35]. Таким образом, сделан вывод, что мутация с.859 G>C повышает вероятность включения экзона 7 в транскрипт на 40–70% [36]. Хотя данная мутация приводит к замене глицина на аргинин в белке SMN, белок остается полностью функциональным. Данная мутация не встречается у пациентов с I типом СМА, ее наличие определяет развитие II или III типов заболевания. Последнее зависит от числа копий гена *SMN2*, несущих данную мутацию, и от числа копий *SMN2* дикого типа. При двух копиях гена *SMN2*, характерных для I типа СМА, у пациента с мутацией с.859 G>C развивался III тип заболевания.

Эти данные демонстрируют, что не все копии гена *SMN2* одинаково экспрессируются. Следовательно, количество копий гена *SMN2* не является абсолютным критерием, определяющим уровень белка SMN или тяжесть СМА. Различия в экспрессии генов факторов сплайсинга или наличие мутаций, изменяющих сродство этих белков к пре-мРНК, могут влиять на соотношение полноразмерных и усеченных транскриптов гена *SMN2*.

Метилирование как возможный фактор модификации тяжести СМА

Метилирование ДНК является наиболее стабильной эпигенетической модификацией, изменяющий характер экспрессии генов. Известно, что присоединение метильной группы к CpG-динуклеотидам промоторной области подавляет экспрессию генов, тогда как метилирование внутригенных последовательностей необходимо для нормальной экспрессии, так как препятствует не-

верной инициации транскрипции с внутренних сайтов [37]. Изменения в метилировании ДНК выявлены при различных неврологических, нейродегенеративных, аутоиммунных и раковых заболеваниях. При этом характер метилирования генов, вовлеченных в различные нейродегенеративные заболевания, совпадает в ДНК лимфоцитов и в ДНК нервной ткани, что позволяет рассматривать уровень метилирования ДНК лимфоцитов в качестве возможного биомаркера эпигенетических изменений в нервных клетках [38].

В 2009 г. Nauke J. с соавторами опубликовали результаты изучения влияния метилирования промоторной области гена *SMN2* на тяжесть СМА. Были обнаружены значимые различия в уровне метилирования CpG динуклеотидов в положении -296 и -290 между пациентами с II и I типами заболевания при одинаковом числе копий гена *SMN2* [39]. Пониженная степень метилирования коррелировала с более легкой формой СМА как в случае ДНК, выделенной из лимфоцитов крови, так и при анализе ДНК из культуры клеток фибробластов от пациентов со СМА. Выявленные CpG пары располагаются в области первого сайта начала транскрипции гена *SMN2*. Следовательно, статус метилирования данных динуклеотидов может влиять на уровень экспрессии гена *SMN2* [39]. Действие на культуру фибробластов пациентов ДНК-деметилирующими препаратами приводило к дозозависимому увеличению экспрессии *SMN2* и уровня белка SMN, что указывает на корреляцию между активностью промотора *SMN2* и степенью его метилирования [39].

В недавнем исследовании было обнаружено, что уровень метилирования CpG динуклеотидов в положении -871, -735 и +999 значимо различался в крови пациентов со СМА III и I—II типов при одинаковом числе копий гена *SMN2*. Также была выявлена корреляция между степенью метилирования динуклеотидов в положении -871, +938, CpG островка в районе динуклеотидов -290, -288, -285 и уровнем полноразмерных транскриптов *SMN2* [40].

Полногеномный анализ метилирования около 500000 CpG сайтов у больных с тяжелыми (I—II) и легкими типами (III—IV) СМА в сравнении со здоровыми индивидами соответствующего возраста позволил обнаружить значимые различия в уровне метилирования CpG сайтов в 40 генах для двух анализируемых групп [41]. Многие из белковых продуктов выявленных генов имеют функции, которые возможно связаны с тяжестью СМА. При последующем анализе были выявлены различия в уровне метилирования регуляторных областей генов *SLC23A2* и *NCOR2* между пациентами с I, II и III—IV типами СМА [42]. Ген *SLC23A2* кодирует белок, участвующий в транспорте аскорбата, который способствует дифференциации эмбриональных стволовых клеток в нейроны и созреванию синаптических окончаний [43]. Ген *NCOR2* кодирует субъединицу комплекса, свя-

занного с деацетилазами гистонов, которые являются важными мишенями при терапии СМА [44].

Более подробный анализ генов, выявленных в полногеномном анализе метилирования, важен для поиска новых факторов-модификаторов СМА.

Белки-регуляторы актинового цитоскелета

Дефекты роста и ветвления аксонов мотонейронов, характерные для СМА, могут быть вызваны нарушениями полимеризации и сборки актиновых филаментов, регулируемых актин-связывающими белками.

Важным регулятором динамики актина является пластин 3, который стимулирует аксоногенез, участвуя в сборке F-актина [45]. В результате транскриптомного анализа у некоторых бессимптомных больных был выявлен повышенный уровень экспрессии гена пластина 3 (*PLS3*). Интересно, что положительный эффект пластина 3 проявлялся только у женщин, тогда как гиперэкспрессия гена *PLS3* у мужчин не приводила к смягчению фенотипа [45]. Была выявлена корреляция между типом СМА и уровнем экспрессии *PLS3*, причем данная зависимость наблюдалась только у пациенток старше трех лет [46]. При этом у больных СМА уровень экспрессии гена *PLS3* был выше по сравнению с контрольными индивидами, что говорит о возможном компенсаторном механизме действия пластина 3 при нехватке белка SMN.

В работе Askerman В. с соавторами гиперэкспрессия *PLS3* человека у трансгенных мышей со СМА способствовала улучшению нервно-мышечной проводимости, восстановлению количества синаптических везикул и увеличению размера мышечных волокон [47]. Однако в недавней работе было показано, что гиперэкспрессия гена *PLS3* у мышей со СМА не приводила к смягчению тяжести симптомов [48].

Белок профилин II является еще одним важным регулятором полимеризации актина. Этот белок располагается в цитоплазме и конусах роста нервных клеток, ингибируя сборку актиновых филаментов и высвобождение нейротрансмиттеров [49]. Показано, что белок SMN взаимодействует с профилином, ингибируя его негативный эффект, тогда как нехватка SMN в случае СМА приводит к высвобождению профилина и нарушает формирование актинового цитоскелета [50]. Подавление эффекторных молекул, активируемых профилином, приводило к улучшению работы нервно-мышечного синапса и увеличению продолжительности жизни мышей со СМА [51].

О важной роли белков-регуляторов динамики актина в патогенезе СМА свидетельствует тот факт, что уровень белка статина, дестабилизирующего микротрубочки, повышен у мышей со СМА, и наблюдается прямая зависимость между содержанием этого белка и тяжестью заболевания [52]. Более того, нокдаун гена статина способствует росту аксонов мотонейронов у мышей с тяжелой формой СМА.

Другие потенциальные модификаторы тяжести СМА

Важную роль в утрате моторных нейронов и развитии СМА играют процессы апоптоза. Установлено, что белок SMN обладает антиапоптозным действием, ингибируя активность каспазы 3, тогда как снижение уровня SMN при СМА вызывает запуск каспаз-зависимого апоптоза [53]. Обнаружена роль в патогенезе СМА белков семейства Bcl-2 — важных регуляторов апоптоза. При СМА наблюдалось снижение уровня антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-X, тогда как уровень проапоптозного белка Bax повышен [54, 55]. Гиперэкспрессия гена антиапоптозного белка Bcl-xL приводила к улучшению моторной функции и продлению жизни модельных мышей со СМА [56]. Сходный результат наблюдался при пониженном уровне белка Bax [55].

Еще одним возможным модификатором тяжести СМА является белок ZPR1, который, взаимодействуя с SMN, по-видимому, способствует его локализации в тельцах «gems». Снижение уровня ZPR1 у мышей со СМА приводило к более тяжелой форме заболевания, уменьшению продолжительности жизни и числа мотонейронов передних рогов спинного мозга. В то же время гиперэкспрессия гена *ZPR1* стимулирует аксоногенез в культуре нейрональных клеток [57].

Было показано влияние фосфатазы PTEN на тяжесть СМА. Ингибирование этого белка способствовало увеличению размера конусов роста и длины аксонов мотонейронов с пониженным уровнем SMN [58]. Подавление PTEN у модельных мышей со СМА приводило к улучшению работы нервно-мышечного синапса, сохранению веса и мышечной силы [59].

Как оказалось, пролактин тоже может быть потенциальным модификатором фенотипа СМА. Было обнаружено, что повышение уровня данного гормона приводит к усилению транскрипции гена *SMN2* в культуре нейрональных клеток человека и в мотонейронах мышей [60].

Заключение

Хотя к развитию СМА приводят мутации в одном гене *SMN1*, для заболевания характерен широкий спектр клинического полиморфизма, основу которого составляют различные модифицирующие факторы. Наиболее важным из них является число копий гена *SMN2*, которое рассматривается как важный критерий для раннего прогноза заболевания. Однако тяжесть СМА не всегда определяется количеством копий гена *SMN2*; появляются все больше данных о наличии других модифицирующих факторов СМА. Многочисленные исследования на клеточных и животных моделях СМА позволили выявить различные факторы, влияющие на экспрессию гена *SMN2*, регулирующие уровень белка SMN, вовлеченные в регуляцию динамики актина, созревание и работу нервно-мышечного синапса, аксоногенез, уровень которых влияет на тяжесть основных симптомов СМА. Эти модификаторы в разной степени могут влиять на

развитие заболевания и определять особенности его клинической манифестации, однако каждый из них представляет интерес для дальнейших углубленных исследований. Изучение модификаторов СМА имеет важное значение не только для ранней диагностики, но и для более точного клинического прогноза, а также для оптимизации лечения и поиска новых перспективных мишеней для таргетной и генной терапии.

Список литературы

- Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S. et al. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene // *Cell*. 1995; 80. № 1: 155-165.
- Markowitz J.A., Priyamvada S., Darras B.T. Spinal Muscular Atrophy: A Clinical and Research Update // *Pediatric Neurology*. 2012; 46: 1-12.
- Zerres K., Wirth B., Rudnik-Schoneborn S. Spinal muscular atrophy — clinical and genetic correlations // *Neuromuscul. Disord*. 1997; 7. № 3: 202-207.
- Wirth B. An update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (*SMN1*) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA) // *Human Mutation*. 2000; 15: 228-237.
- Monani U., Lorson C., Parsons D.W. et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2* // *Hum. Mol. Genet*. 1999; 8. № 7: 1177-1183.
- Novelli G., Calza L., Amicucci P. et al. Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues // *Biochem. Mol. Med*. 1997; 61: 102-106.
- Kolb S. J., Battle D. J., Dreyfuss G. Molecular Functions of the SMN Complex // *Journal of Child Neurology*. 2007; 22. № 8: 990-994.
- Liu Q., Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein // *EMBOJ*. 1996; 15. P. 3555-3565.
- Bechade C., Rostaing P., Cisterni C. Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport // *European Journal of Neuroscience*. 1999; 11: 293-304.
- Kariya Sh., Park G-H., Maeno-Hikichi Y. et al. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy // *Hum. Mol. Genet*. 2008; 17: 2552-2569.
- Hofmann Y., Lorson C.L., Stamm S. et al. Htra2- β stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (*SMN2*) // *PNAS*. 2000; 97(17): 9618-9623.
- Vitali T., Sossi V., Tiziano F. et al. Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for *SMN2* in the modulation of disease severity in SMA patients // *Hum. Mol. Genet*. 1999; 8. № 13: 2525-2532.
- Van der Steege G., Grootsholten P.M., Cobben J.M., Zapata S. et al. Apparent Gene Conversions Involving the *SMN* Gene in the Region of the Spinal Muscular Atrophy Locus on Chromosome 5 // *Am. J. Hum. Genet*. 1996; 59: 834-838.
- McAndrew P., Parsons D., Simard L. et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of *SMN1* and *SMN2* gene copy number // *Am. J. Hum. Genet*. 1997; 60. P. 1411-1422.
- Маретина М.А., Киселев А.В., Железнякова Г.Ю., Егорова А.А., Вахарловский В.Г., Тищенко Л.И., Баранов В.С. Определение количества копий гена *SMN2* у больных спинальной мышечной атрофией Северо-Западного региона России // *Медицинская генетика*. 2012. Т. 11. № 4. стр. 28-31.
- Zheleznyakova G.Yu., Kiselev A.V., Vakhlarovsky V.G. et al. Genetic and expression studies of *SMN2* gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. // *BMC Medical Genetics*. 2011; 12: 96.
- Schrank B., Gotz R., Gunnensen J.M., Ure J.M., Toyka K.V., Smith A.G., Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos // *Neurobiology*. 1997; 94: 9920-9925.
- Monani U., Sendtner M., Coovert D.D. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy // *Human Molecular Genetics*. 2000; 9. № 3: 333-339.
- Brahe C. Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: The more, the better // *Neuromuscul. Disord*. 2000; 10: 274-275.
- Feldkotter M., Schwarzer V., Wirth R. et al. Quantitative Analysis of *SMN1* and *SMN2* Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy // *Am. J. Hum. Genet*. 2002; 70. № 2: 358-368.
- Rudnik-Schoneborn S., Berg C., Zerres K., Betzler C., Grimm T. et al. Genotype-phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy (SMA) type I in Germany: implications for clinical trials and genetic counselling // *Clin Genet*. 2009; 76: 168-178.
- Petit F., Cuisset J.-M., Rouaix-Emery N. et al. Insights into genotype-phenotype correlations in spinal muscular atrophy: a retrospective study of 103 patients // *Muscle Nerve*. 2011; 4: 26-30.
- Elsheikh B., Prior T., Zhang X., Miller R. et al. An analysis of disease severity based on *SMN2* copy number in adults with spinal muscular atrophy // *Muscle Nerve*. 2009; 40: 652-656.
- Swoboda K.J., Prior T.W., Scott C.B. et al. Natural History of Denervation in SMA: Relation to Age, *SMN2* Copy Number, and Function // *Ann Neurol*. 2005; 57: 704-712.
- Brichta L., Hofmann Y., Hahnen E. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy // *Human Molecular Genetics*. 2003; 12. № 19: 2481-2489.
- Tiziano F.D., Lomastro R., Pinto A.M., Messina S., D'Amico A. et al. Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design // *Journal of Medical Genetics*. 2010; 47: 856-858.
- Harada Y., Sutomo R., Sadewa A. Correlation between *SMN2* copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three *SMN2* copies fail to rescue some patients from the disease severity // *J. Neurol*. 2002; 249. № 9: 1211-1219.
- Prior T., Swoboda K., Scott H., Hejmanowski A. Homozygous *SMN1* deletion in unaffected family members and modification of the phenotype by *SMN2* // *Am. J. Med. Genet*. 2004; 130A: 307-310.
- Cusco I., Barcelo M., Rojas-Garcia R. et al. *SMN2* copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings // *J Neurol*. 2006; 253. № 1: 21-25.
- Kashima T. and Manley J. A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy // *Nat. Genet*. 2003; 34: 460-463.
- Cartegni L., Hastings M., Calarco J. et al. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, *SMN1* and *SMN2* // *Am J Hum Genet*. 2006; 78. № 1: 63-77.
- Pedrotti S., Bielli P., Paronetto M.P. et al. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions

in *SMN2* alternative splicing in spinal muscular atrophy // The EMBO Journal. 2010; 29. № 7: 1235-1247.

33. Singh N.N., Seo J., Ottesen E.W. et al. TIA1 Prevents Skipping of a Critical Exon Associated with Spinal Muscular Atrophy // Molecular and cellular biology. 2011; 31. № 5. p. 935-954.

34. 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: 408-413.

35. Vezain M., Saugier-Verber P., Melki J. et al. A sensitive assay for measuring SMN mRNA levels in peripheral blood and in muscle samples of patients affected with spinal muscular atrophy // Eur J Hum Genet. 2007; 15: 1054-1062.

36. Vezain M., Saugier-Verber P., Goïna E. et al. A Rare *SMN2* Variant in a Previously Unrecognized Composite Splicing Regulatory Element Induces Exon 7 Inclusion and Reduces the Clinical Severity of Spinal Muscular Atrophy // Human Mutation. 2010; 31: E1110-E1125.

37. Portela A. and Esteller M. Epigenetic modifications and human disease // Nature biotechnology. 2010; 28: 1057-1068.

38. Ai S., Shen L., Guo J., Feng X. and Tang B. DNA Methylation as a Biomarker for Neuropsychiatric Diseases // International Journal of Neuroscience. 2012; 122: 165-176.

39. 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 // Human Molecular Genetics. 2009; 18. № 2: 304-317.

40. Cao Y.-Y., Qu Y.-J., He S.-X., Li Y. et al. Association between *SMN2* methylation and disease severity in Chinese children with spinal muscular atrophy // Journal of Zhejiang University — Science B. 2016; 17: 76-82.

41. Zheleznyakova G., Voisin S., Kiselev A.V., Almen M.S., Xavier M.J. et al. Genome-wide analysis shows association of epigenetic changes in regulators of Rab and Rho GTPases with spinal muscular atrophy severity // European Journal of Human Genetics. 2013: 1-6.

42. Zheleznyakova G.Y., Nilsson E.K., Kiselev A.V., Maretina M.A. et al. Methylation levels of *SLC23A2* and *NCOR2* genes correlate with spinal muscular atrophy severity // PloS One. 2015; 10. e0121964.

43. Qiu S., Li L., Weeber E.J., May J.M. Ascorbate Transport by Primary Cultured Neurons and Its Role in Neuronal Function and Protection Against Excitotoxicity // Journal of Neuroscience Research. 2007; 85: 1046-1056.

44. Codina A., Love J.D., Li Y., Lazar M.A., Neuhaus D., Schwabe J.W.R. Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102: 6009-6014.

45. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L. et al. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy // Science. 2008; 320, № 5875: 524-527.

46. Yanyan C., Yujin Q., Jinli B., Yuwei J., Hong W. and Fang S. Correlation of PLS3 expression with disease severity in chil-

dren with spinal muscular atrophy // Journal of Human Genetics. 2014; 59: 24-27.

47. Ackermann B., Krober S., Torres-Benito L., Borgmann A. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality // Hum. Mol. Genet. 2013; 22: 1328-1347.

48. McGovern V. L., Massoni-Laporte A., Wang X., Le T. T., Le H. T., et al. Plastin 3 expression does not modify spinal muscular atrophy severity in the $\Delta 7$ SMA mouse // PLoS ONE. 2015; 10: 1-19.

49. Sharma A., Lambrechts A., Hao le T. et al. A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells // Exp. Cell Res. 2005; 309. № 1: 185-197.

50. Bowerman M., Shafey D., Kothary R. Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity // Journal of Molecular Neuroscience. 2007; 32: 120-131.

51. Bowerman M., Beauvais A., Anderson C. L., Kothary, R. Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model // Human Molecular Genetics. 2010; 19: 1468-1478.

52. Wen H.-L., Lin Y.-T., Ting C.-H. Et al. Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy // Hum. Mol. Genet. 2010; 19: 1766-1778.

53. Vyas S., Bïchade C., Riveau B., Downward J., Triller A. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death // Human Molecular Genetics. 2002; 11: 2751-2764.

54. Soler-Botija C., Ferrer I., Alvarez J.L. Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 2003; 62: 420-426.

55. Tsai M.S., Chiu Y.T., Wang S.H. et al. Abolishing Bax-Dependent Apoptosis Shows Beneficial Effects on Spinal Muscular Atrophy Model Mice // Molecular Therapy. 2006; 13: 1149-1155.

56. Tsai L.-K., Tsai M.-Sh., Ting C.-H. et al. Restoring Bcl-xL levels benefits a mouse model of spinal muscular atrophy // Neurobiology of Disease. 2008; 31: 361-367.

57. Ahmad S., Wang Y., Shaik G.M., Burghes A.H. and Gangwani L. The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy // Human Molecular Genetics. 2012; 21: 2745-2758.

58. Ning K., Drepper C., Valori Ch.F. et al. PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons // Human Molecular Genetics. 2010: 1-10.

59. Little D., Valori Ch.F., Mutsaers Ch.A. et al. PTEN Depletion Decreases Disease Severity and Modestly Prolongs Survival in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy // Molecular Therapy. 2015; 23: 270-277.

60. Farooq F., Molina F.A., Hadwen J., et al. Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway // J Clin Invest. 2011; 121: 3042-3050.