مجله علمی پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکی زنجـــان
دوره 13، شماره 53، زمستان 1384، صفحات 22 تا 28

تشخیص و غربال‌گری بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی نوع سه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در منطقه‌ی آذربایجان شرقی طی سال 1383 تا 1384

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی*، امید عمرانی**، دکتر هرمز آیرملو***، دکتر فرحناز ریحانی‌فر****،
دکتر نادر لطفعلیزاده ****

نویسنده‌ی مسئول: گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم طبیعی، دانشگاه تبریز bonyadim@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۸٤/۷/۸ پذیرش: ۸٤/۱۰/۲٦

چکیده

زمینه و هدف: *الگوی توارث بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی (SMA)، به صورت اتوزوم مغلوب بوده و فراوانی آن یک در ۱۰۰۰۰ تولد زنده گزارش شده است. در اکثر این بیماران ژن SMN1 متحمل حذف شدگی در اگزون‌های ۷ و یا ۸ می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی حذف شدگی ژن مذکور در مبتلایان با استفاده از روش‌های مولکولی در منطقه‌ی آذربایجان شرقی طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸٤ می‌باشد.*

روش بررسی: *افراد مشکوک به نوع سه بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی بعد از تشخیص بالینی و آزمایشگاهی، جهت مطالعه‌ی مولکولی ارجاع داده شدند و پس از استخراج DNA از خون مبتلایان، میزان حذف شدگی اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 با استفاده از تکنیک چند شکلی طولی قطعات برش یافته توسط آنزیم‌های محدود الاثر (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از بین ٤۵ بیمار مشکوک به نوع سه بیماری، ۹ نفر (۲۰ درصد) دارای حذف شدگی اگزونی در ژن SMN1 بودند. از بین این ۹ نفر، یک نفر متحمل حذف شدگی تنها در اگزون هفت و بقیه متحمل حذف شدگی در هر دو اگزون هفت و هشت ژن SMN1 شده بودند.*

نتیجه‌گیری: *حذف شدگی در ژن SMN1 در درصد نسبتاً پایینی از افراد مشکوک به نوع سه بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی مشاهده گردید. مطالعات بیشتر و از جمله بررسی توالی‌های دیگر ژن مذکور پیشنهاد می‌گردد.*

واژگان کلیدی: ***آتروفی عضلانی ـ نخاعی نوع سه (SMA)، ژن SMN1، PCR-RFLP***

مقدمه

بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی ([SMA] Spinal Mascular Atrophy) از جمله بیماری‌های عضلانی ـ عصبی محسوب می‌شود. این بیماری بعد از بیماری فیبروز کیستیک (Cystic Fibrosis) شایع‌ترین اختلال اتوزومی مغلوب در دنیا 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 یک در چهل و میزان شیوع این بیماری یک در شش تا ده هزار تولد زنده است (۳).

این بیماری از لحاظ بالینی دارای سه نوع مختلف می‌باشد. در نوع یک (Werdnig-Haffmann) که شدیدترین نوع

* دکترای ژنتیک مولکولی، استادیار دانشکده‌ی علوم طبیعی تبریز، مرکز تحقیقات کاربری دارویی و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
** کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه تبریز و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
*** متخصص مغز و اعصاب، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز
**** متخصص زنان، سازمان بهزیستی تبریز
***** متخصص کودکان، سازمان بهزیستی تبریز

بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی محسوب می‌گردد، سن بروز علایم بالینی از تولد تا شش ماهگی است. در دوران جنینی، جنین‌های مبتلا به این بیماری، دارای فعالیت و حرکت نسبتاً کمی در مقایسه با جنین‌های طبیعی هستند. در این نوع از بیماری، نوزادان مبتلا قادر به غلطیدن و نشستن نبوده و معمولا به دلیل مشکلات تنفسی قبل از دو سالگی می‌میرند (٤).

در نوع دو این بیماری، که شکل حد واسط بیماری بوده، زمان بروز علایم بالینی در بین نوزادان مبتلا، از شش تا بیست و چهار ماهگی است. نوزادان مبتلا به تنهایی قادر به نشستن بوده ولی برای راه رفتن نیاز به کمک دارند. در این بیماران گاهی هیپرتروفی کاذب ماهیچه‌های ساق پا نظیر مبتلایان به دیستروفی عضلانی دوشن نیز دیده می‌شود(۲). با توجه به میزان ضعف عضلات تنفسی معمولاً این بیماران اندکی بیشتر از ده سال عمر می‌کنند.

نوع سه این بیماری (Kogelberg-Welander)، خفیف‌ترین شکل بیماری است. سن شروع علایم 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). ژن مربوط به بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی در سال ۱۹۹۵ (۵) تشخیص داده شد. این ژن که SMN (Survival Motor Neuron) نامیده می‌شود، در اکثر این بیماران دچار حذف‌شدگی است. مطالعات بعدی نشان دادند که ژن‌های موثر دیگری مانند NAIP, P44 (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) و H4F5(SERF1) وجود دارند که در شدت بروز این بیماری موثرند. 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 در۸ جفت باز است که دو جفت آن‌ها در اگزون ۷ و ۸ قرار دارد. تفاوت‌های بیان شده امکان تشخیص نسخه‌ی سانترومری از تلومری را مقدور می‌سازد. در ۹۸/٦ درصد از بیماران بدون توجه به شدت بیماری، اگزون ۷ ژن SMN1 متحمل حذف‌شدگی شده است(٦). پروتئین کد شده توسط این دو ژن شباهت زیادی با یکدیگر دارند، ولی از آنجا که در اکثر بیماران نسخه‌ی تلومری دچار حذف‌شدگی می‌باشد، به نظر می‌رسد که پروتئین حاصل از این نسخه دارای نقش مهم‌تری باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، عدم وجود پروتئین طبیعی SMN سبب مرگ سلولی یا آپوپتوزیز در نورون‌های حرکتی می‌گردد(۷). تاکنون ارتباط دقیقی بین حذف‌شدگی در ژن SMN و شدت علایم بالینی تظاهر یافته به دست نیامده ولی به نظر می‌رسد هر چه میزان حذف‌شدگی در این ژن بیشتر باشد، بیماری در سنین پایین‌تر و با شدت بیشتری عارض می‌شود. در این بیماری ژن‌های موثر دیگری نیز گزارش شده‌اند مانند NAIP و P44 که نقش آن‌ها تعدیل عملکرد پروتئین SMN است (۹،۸). با توجه به این که تشخیص بالینی نوع سه بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی از دیگر بیماری‌های میوپاتی مشکل و در مواردی غیر ممکن بوده(۲)، تشخیص مولکولی افراد مشکوک روشی موثر برای تشخیص این بیماری از دیگر بیماری‌های میوپاتی است. هم‌چنین با استفاده از روش مولکولی امکان جلوگیری از تولد فرزندان مبتلا در خانواده‌هایی که قبلاً سابقه‌ی بروز بیماری را داشته‌اند، وجود خواهد داشت. بر این اساس تحقیق حاضر به منظور تشخیص و غربال‌گری نوع سه بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی در منطقه‌ی آذربایجان شرقی بر اساس روش ژنتیک مولکولی طی سال ۱۳۸۳ تا ۱۳۸٤ مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این تحقیق توصیفی ٤٥ فردی که توسط متخصصین مغز و اعصاب بیمارستان امام تبریز و یا مرکز بهزیستی استان (بعد از معاینات پزشک متخصص) به عنوان مشکوک به نوع

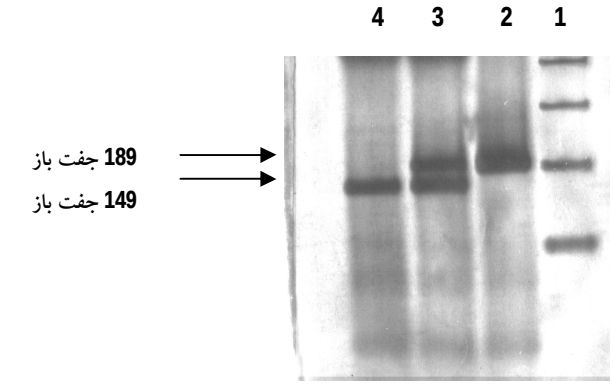
سه بیماری SMA به مرکز معرفی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های خون توسط پرستار همکار طرح تهیه شد. جهت جلوگیری از انعقاد خون، مقدار ۲۰۰ تا ٤۰۰ میکرولیتر از اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) نیم مولار به ازای ۱۰ سی‌سی خون به نمونه‌ی خون اضافه و خون سریعاً به آزمایشگاه مرکز جهت استخراج DNA منتقل شده و یا در دمای منهای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داری تا در زمان مناسب به آزمایشگاه منتقل گردد. جهت استخراج DNA ۰/۱ روش فنل- کلروفرم استفاده شد. جهت لیز کردن سلول‌های گلبول‌های قرمز و از بین بردن آن‌ها، ابتدا ۳۰ میلی لیتر بافر لیز کننده (بیکربنات سدیم ۱۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار، کلرید آمونیوم ۱۵۲ میلی‌مولار) به ۱۰ میلی لیتر خون اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داری شد. جهت جدا کردن گلبول‌های قرمز از گلبول‌های سفید حاوی هسته، محلول حاصل برای مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی که حاوی گلبول‌های قرمز بود، جدا و مایع تحتانی جهت آزمایشات بعدی نگه داری گردید. جهت تکثیر ژن SMN از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (Polymerase Chain Reaction [PCR]) استفاده گردید. در این روش، از دو جفت آغازگر (پرایمر) برای تکثیر اگزون‌های ۷ و ۸ که قبلاً در مقالات دیگر(۱۰) گزارش شده بود، استفاده گردید. برای انجام PCR (در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر)، از کلرید منیزیوم با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، بافر PCR (کلرید پتاسیم ۵۰۰ میلی مولار، Tris-HCL ۲۰۰ میلی مولار (pH ۸/٤) با غلظت نهایی یک واحد (1X)، آنزیم Taq پلیمراز یک واحد (سیناژن)، dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار استفاده گردید. برنامه‌ی ارایه شده برای چرخه های PCR به قرار ذیل بوده است:

برای تکثیر اگزون ۷، چرخه‌ی اول با ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه جهت جدا کردن رشته‌های DNA از یکدیگر شروع شده و سپس چرخه‌های بعدی به صورت، ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه، ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه تنظیم شد که این چرخه برای ۳۵ بار تکرار شده و بعد از تکمیل چرخه‌ها، آخرین چرخه با ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید. تنها تفاوت تکثیر اگزون ۸ با اگزون ۷، استفاده از دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت پیوستن آغازگرها (پرایمرها) به DNA بود. محصول PCR اگزون ۷ ، ۱۸۹جفت باز (شکل ۱) و محصول PCR اگزون ۸ ، ۱۸۸ جفت باز است (شکل ۲).

در هضم آنزیمی برای تشخیص اگزون‌های دو ژن SMN1 و SMN2 از آنزیم‌های محدود الاثر استفاده شد. در مورد اگزون ۷ از آنزیم DraI استفاده شد که این آنزیم اگزون ۷ نسخه‌ی سانترومری ژن SMN (SMN2) را برش داده و دو قطعه‌ی ۱٤۹ و ٤۰ جفت بازی ایجاد می کند(شکل ۱) و به منظور تشخیص دو اگزون ۸ تکثیر یافته از آنزیم DdeI استفاده گردید که نسخه‌ی سانترومری اگزون ۸ را برش داده و دو قطعه ۱۲۵ و ٦۳ جفت بازی تولید می‌کند (شکل ۲). برای هضم آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر از ۱۰ میکرولیتر محصول PCR ، آنزیم محدود الاثر یک واحد و بافر آنزیم مربوط با غلظت یک واحد (1X) استفاده شد. هضم آنزیمی در دمای ۳۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت انجام گردید. برای مشاهده‌ی محصولات PCR و هضم آنزیمی از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و در صورت لزوم از ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم برماید استفاده شد.

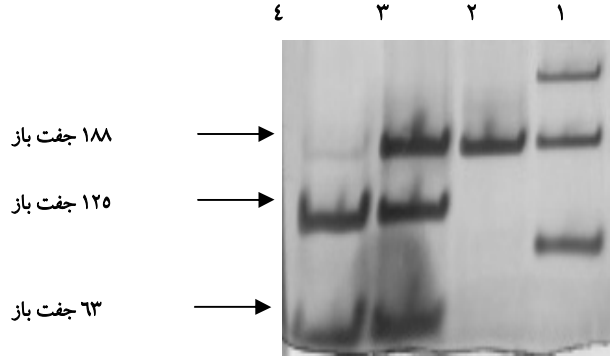
یافته‌ها

در این بررسی حذف شدگی در اگزون ۷ از ژن SMN1 (شکل ۱) و حذف شدگی در اگزون ۸ همین ژن (شکل ۲) برای ٤۵ فرد مشکوک به نوع سه بیماری آتروفی عضلانی نخاعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۰ درصد (۹ نفر) از افراد مورد بررسی دارای حذف شدگی



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

لاین ۱، نشانگر یا Ladder است. لاین ۲، محصول PCR از اگزون ۷ است که مربوط به هر دو الل SMN1 و SMN2 است. جهت تشخیص اگزون ۷ در این دو الل، محصول PCR توسط آنزیم محدودالاثر DraI قطع شده و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمیدالکتروفورز گردید. در لاین ۳، محصول این هضم شدگی مشاهده می‌شود که دو باند مربوط به دو الل کاملاً از هم تمییز داده می‌شوند. لاین ٤، مربوط به بیماری مبتلا به SMA است که فاقد اگزون ۷ ژن SMN1 بوده و ژن SMN2 سالم است.



شکل ۲: مطالعه‌ی اگزون ۸ ژن SMN1 در افراد مشکوک به بیماری SMA با استفاده از روش PCR-RFLP.

لاین ۱، نشانگر یا Ladder است. لاین ۲، محصول PCR از اگزون ۸ است که مربوط به هر دو الل SMN1 و SMN2 است. جهت تشخیص اگزون ۸ در این دو الل، محصول PCR توسط آنزیم محدودالاثر DdeI برش داده شده و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز گردید. در لاین ۳، محصول این هضم شدگی مشاهده می‌شود که دو باند مربوط به دو الل کاملاً از هم تمییز داده می‌شوند. لاین ٤، مربوط به بیماری مبتلا به SMA است که فاقد اگزون ۸ ژن SMN1 بوده و ژن SMN2 سالم می‌باشد.

اگزون ۷ در ژن SMN1 بودند. حذف شدگی در اگزون ۸ در ۸ نفر (۱۷/۷ درصد) از مبتلایان مشاهده گردید. به طور کلی در ۸۹ درصد (۸ نفر) از افرادی که حذف شدگی اگزونی مشاهده شده بود، هر دو اگزون ۷ و ۸ هم‌زمان در ژن SMN1 حذف شده بودند.

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که ۲۰ درصد افراد مبتلا به نوع سه آتروفی عضلانی ـ نخاعی دارای حذف شدگی اگزون ۷ در ژن SMN1 و ۱۷/۷ درصد آنان دارای حذف شدگی در اگزون ۸ می‌باشند.

بر اساس مطالعات انجام شده (۱۹۹۵) مشخص شده که در ۹۸/٦ درصد بیماران مبتلا به بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی حذف شدگی در ژن SMN وجود دارد. در این میان حذف شدگی اگزون ۷ به تنهایی برابر ۹۵ الی ۹۸ درصد است (۱). در واقع بیش از ۹۰ درصد بیماران نوع I و II و بیش از ۷۰ درصد از مبتلایان نوع سه، در جمعیت های مختلف مانند ایالات متحده، آلمان، ایتالیا، اسپانیا و چین دارای حذف شدگی در اگزون ۷ و اگزون ۸ می باشند(۱٤-۱۱). البته درصدهای کمتر حذف شدگی در مطالعات دیگری بر روی جمعیت‌هایی نظیر جمعیت کانادا، ایالات متحده، لهستان نیز دیده شده است (۱۷-۱۵) که در راستای نتایج تحقیق اخیر می‌باشند. بر اساس مطالعه‌ی حاضر بر روی جمعیت آذربایجان شرقی و مناطق مجاور، میزان حذف شدگی ژن SMN برابر ۲۰ درصد می‌باشد. از آنجا که حذف شدگی اگزون‌های ژن SMN1 در مبتلایان به آتروفی عضلانی ـ نخاعی نوع سه مشاهده گردید، به نظر می‌رسد همان‌گونه که توسط سایر محققان پیشنهاد شده است (۱)، جهش در این ژن نقش تعیین کننده و اساسی در بروز این بیماری داشته باشد. بر اساس مطالعه‌ای (۱۹۹۸) که در عربستان سعودی انجام گرفته است هیچ حذف شدگی در

اگزون ۷ و ۸ ژن SMN1 مربوط به بیماران نوع سه مشاهده نشده است(۱۸)، که این میزان در مطالعه‌ی ما به ۲۰ درصد رسیده است. در برزیل نیز، نتایج مطالعات حاکی از آن است که مبتلایان نوع III ، ۱٤/۳ درصد حذف‌شدگی اگزون ۷ به تنهایی و ٤۷/٦ درصد حذف‌شدگی در هر دو اگزون ۷ و ۸ را نشان داده‌اند (٤). در مطالعه‌ای که ما بر روی بیماران نوع III انجام دادیم، ۲/۲ درصد از مبتلایان دارای حذف شدگی در اگزون ۷ به تنهایی و ۱۷/۷ درصد دارای حذف شدگی در هر دو اگزون ۷ و ۸ می باشند. حذف‌شدگی ژن SMN1 در بعضی از بیماران ارجاع داده شده (حدود ۸۰ درصد) مشاهده نشد. بر اساس مطالعات انجام شده درصد کمی از بیماران، فاقد حذف‌شدگی قابل تشخیص در اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 هستند. این امر می‌تواند ناشی از جهش در توالی‌های پروموتوری یا اینترونی ژن مربوطه بوده و یا جهش نقطه‌ای در اگزون‌های مورد مطالعه باشد که قابل تشخیص با روش چند شکلی طولی قطعات برش یافته توسط آنزیم‌های محدود الاثر (Restriction Fragment Length Polymorphism [PCR-RFLP]) نیست. بنابراین بررسی توالی‌های دیگر این ژن در فازهای بعدی مورد نیاز است. دلیل دیگر می‌تواند مربوط به هتروژنی ژنتیکی باشد، به این معنی که جهش در ژن یا ژن‌های دیگر، فنوتیپی مشابه با فنوتیپ بیماری SMA را ایجاد کند. در بین مبتلایان، یک نفر فاقد ژن SMN2 بود درحالی که هیچ گونه حذف شدگی در اگزون ۷ و اگزون ۸ ژن SMN1 را نشان نداده بود. مطالعه‌ی والدین، برادران و خواهران سالم دیگر این فرد نشانگر وجود حذف شدگی در همین ژن در بعضی از اقوام درجه‌ی یک این افراد بوده که از نظر بالینی هیچ‌گونه علایمی نشان نداده بودند. بنابراین، حذف شدگی ژن SMN2 به تنهایی تاثیری در بروز بیماری ندارد ولی احتمال داده می‌شود که در صورت حذف شدگی در ژن‌های ناشناخته‌ی دیگر، حذف شدگی در این ژن باعث افزایش شدت بیماری گردد.

وجود حذف شدگی اگزون ۷ و یا اگزون ۸ ژن SMN1 در بیماران مورد بررسی، نشان می‌دهد که این اگزون‌ها نقش مهمی در ایجاد این بیماری دارند و احتمالاً بخشی از پروتئین SMN را کد می‌کنند که نقش اصلی را در عملکرد این پروتئین بازی می‌کند. بنابراین برای تشخیص مولکولی این بیماری در مرحله‌ی اول بررسی حذف شدگی این اگزون‌ها ضروری است. دلیل دیگر بر پیشنهاد مذکور، آن است که در بعضی بیماران حذف شدگی تنها در اگزون ۷ و در بعضی دیگر تنها در اگزون ۸ دیده می شود، ولی هر دو گروه دارای فنوتیپ‌های مشابه می باشند و البته در اکثر بیمارانی که دارای حذف شدگی بودند، هر دو اگزون مذکور متحمل حذف شدگی شده بودند.

نتیجه گیری

برای تشخیص مولکولی بیماری SMA در منطقه‌ی مورد مطالعه، اولین قدم مطالعه‌ی حذف شدگی اگزون‌های ۷ و ۸ ژن SMN1 می باشد. هم‌چنین تشخیص بالینی دقیق در طبقه‌بندی بیماری SMA که از نظر بالینی با بعضی بیماری‌های تحلیل عصبی دیگر تشابه زیاد دارد، خیلی مهم به نظر می‌رسد. فراوانی حذف شدگی ژن SMN1 در مبتلایانی که به عنوان بیماری SMA به آزمایشگاه معرفی شده بودند، در مقایسه با مطالعات دیگر اندکی کمتر بوده که این ناشی از دخالت ژن‌های موثر دیگر در بروز بیماری (هتروژنی ژنی)، جهش‌های نقطه‌ای غیرقابل تشخیص در مناطق مختلف ژن و یا عدم تشخیص دقیق بالینی بیماری آتروفی عضلانی ـ نخاعی نوع سه توسط پزشکان متخصص مغز و اعصاب است. از آنجا که هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد، تنها می‌توان از بروز بیماری در فرزندان دیگر جلوگیری کرد که البته این امر به کمک روش های تشخیص قبل از تولد امکان پذیر است. انجام مطالعات بیشتر از جمله بررسی توالی‌های دیگر ژن مورد بررسی در مراحل بعدی

پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله مولفین از ریاست محترم مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و سایر همکاران این مرکز و هم‌چنین از پرستار همکار طرح، سرکار خانم ابراهیمی تشکر می‌نمایند.

منابع

1- Lefebvre S, Burglan L, Frezal J, Munnich A, Mel KJ. 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. ***Neurology 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.***1996; 5: 257-63.

4- Kim CA, Passos-Bueno MR, Marie SK, et al. Clinical and molecular analysis of spinal muscular 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. ***Hum Mol Genet.*** 2002; 11: 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: 25-31.

9- Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, et al. The multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. ***Hum Mol Genet.***1997; 6: 229-36.

10- Vander steege G, Grootscholten PM, Vander vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. ***Lancet.*** 1995; 345:985-6.

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: 407- 17.

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

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

15- Brzustowicz LM, Ricketts AH, 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. ***Neurol Sciences.*** 1998; 158: 43-6.