

بررسی حذف‌های ژن SMN در بیماران ایرانی مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی و تشخیص پیش از تولد

ماندانا حسن زاد^۱، زهرا گلکار^۲، واله هادوی^۲، رکسانا کریمی نژاد^۲، نوید المدنی^۲، فربیبا افروزان^۲،
ایمان سلحشوری فر^۳، یوسف شفقتی^۳، کیمیا کهریزی^۳، حسین نجم آبادی^۴

^۱ دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

^۲ مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد - نجم آبادی، تهران

^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران

^۴ استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران

چکیده

سابقه و هدف: آتروفی عضلانی نخاعی گروهی از بیماریهای نرون حرکتی هستند. سه ژن در ایجاد بیماری نقش دارند. مهم‌ترین آنها ژن SMN می‌باشد و دارای دو نسخه سانترومری و تلومری است. در ۹۵ درصد از بیماران SMA نسخه تلومری ژن SMN به طور هموژیگوت حذف شده است و مابقی دارای جهش‌های نقطه‌ای در ژن مذکور می‌باشند. در اکثریت بیماران، اگزون‌های ۷ و ۱ ژن SMN1 حذف می‌شود. از این رو بررسی جهش‌های این ژن در شناسایی بیماران و ناقلين حائز اهمیت بسیاری است. هدف از این پژوهش بررسی جهش‌های ژن SMN1 و فراوانی آن در بیماران ایرانی است.

روش بررسی: پس از مشاوره دقیق و ارزیابی علائم بیماران بر اساس معیارهای کنسرسیوم SMA، بررسی مولکولی با استفاده از روش PCR-RFLP انجام گرفت.

یافته‌ها: بیش از ۶۰ درصد از خانواده‌ها، ازدواج فامیلی داشته که اغلب از نواحی مرکزی و شمال ایران بودند. در این تحقیق ۲۴۳ خانواده از نظر جهش اگزون ۷ ژن SMN1 مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۹۵ خانواده با سابقه SMAI، ۳۰ خانواده SMAII و ۱۸ خانواده باقی مانده در SMAIII طبقه‌بندی شدند. بررسی حذف اگزون ۷ در خانواده‌های با فرزند مبتلای زنده نشان داد که ۹۴ درصد از خانواده‌های SMAI، ۹۵ درصد SMAII و ۱۰۰ درصد SMAIII دارای حذف هموژیگوت ژن SMN1 بودند. در تشخیص پیش از تولد از مجموع ۹۲ نمونه، ۲۱ نمونه (۲۲/۸) مبتلا بودند و ختم بارداری در آنها صورت گرفت.

نتیجه‌گیری: فراوانی هموژیگوتی حذف اگزون ۷ ژن SMN1 در هر سه نوع SMA درصد بود که شبیه گزارشات ارائه شده در غرب اروپا، چین، ژاپن و کویت بود.

واژگان کلیدی: آتروفی عضلانی نخاعی، SMN1، بیماران ایرانی.

دیستروفی عضلانی دوشن به عنوان شایع‌ترین بیماری عصبی- عضلانی محسوب می‌شود. مشخصه پاتولوژیک بیماری تحلیل نرون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع و هسته‌های حرکتی قاعده مغز است (۲،۱).

پس از بیماری فیبروز کیستیک، آتروفی عضلانی نخاعی شایع‌ترین علت مرگ شیرخواران به دلیل بیماری‌های ژنتیکی با توارث اتوزومی مغلوب می‌باشد و شیوع آن تقریباً ۱ در

مقدمه

بیماری آتروفی عضلانی نخاعی (SMA) از بیماری‌های شایع و کشنده عصبی- عضلانی می‌باشد. این بیماری بعد از

به SMA دیده شده است و در غرب اروپا، چین، ژاپن و کویت شایع‌تر بوده و به بیش از ۹۰٪ می‌رسد، در حالی که فراوانی کمتری در مالزی و هند گزارش شده است (۱۰-۱۵). همچنین جهش نقطه‌ای و یا حذف‌های کوچک در نسخه تلومری ژن SMN دیده شده است که در واقع تاییدی بر نقش بیماریابی نسخه تلومری ژن SMN است (۱۵-۱۶).

در بررسی اخیر، فراوانی حذف‌های اگزون ۷ ژن SMN تلومری در بیماران ارجاع شده به این مرکز تعیین شد و تشخیص پیش از تولد برای خانواده‌هایی که حذف در آنها تعیین شده بود، صورت گرفت. جهش در ژن SMN1 شاخص پیشرفت بیماری است، در حالی که تعداد نسخه‌های SMN2، نسخه همو لوگ SMN1 بعنوان فاکتور تغییر دهنده فنوتیپ حائز اهمیت است، در این مطالعه بررسی وضعیت جهش‌های ژن SMN1 و وفور آن در بیماران ایرانی است.

جدول ۱- طبقه‌بندی SMA بر اساس سن بروز علائم، عملکردۀای حرکتی و زمان مرگ.

مرگ	سن بروز	عملکردۀای حرکتی	عملکردۀای
۲	۰-۶ ماهگی	بدون کمک قادر به زیر سالگی نشستن نیستند.	SMAI
۲	۱۸ قبل از بالاتر از ۲ سالگی	می‌نشینند، قادر به راه رفتن نیستند.	SMAII
	۱۸ بعد از بزرگسالی	ماهگی تا سن خاصی قادر به راه رفتن هستند.	SMAIII

مواد و روشها

در این پژوهش کاربردی، ۲۴۳ خانواده با تشخیص SMA که در طی سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۶ به مرکز ژنتیک و پاتولوژی کریمی نژاد-نجم‌آبادی ارجاع شده بودند، جهت تائید تشخیص و تعیین نوع جهش مورد بررسی قرار گرفتند. خانواده‌ها بر اساس معیارهای کنسرسیوم بین المللی SMA انتخاب شدند. تشخیص بالینی بیماران با بررسی علائم بیماری و در برخی از موارد با الکترومیوگرافی (EMG) تأیید شد. پس از اخذ رضایت‌نامه مطابق با مصوبات کمیته اخلاق در پزشکی DNA ژنومی از خون محیطی بیماران و والدین خانواده با روش Salting out استخراج شد (۲۰).

همه افراد جهت شناسایی حذف همو لوگ اگزون ۷ ژن SMN1 توسط پرایمرهای mismatch با روش PCR-RFLP شرح داده شده توسط van der steege مورد ارزیابی قرار گرفتند

۱۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ تولد زنده است. شیوع ناقلين این بیماری بین ۱/۳۴ تا ۱/۶۰ در ۱۰۰۰۰ نفر می‌باشد که از نظر بالینی مبتلا نیستند (۱، ۵-۳).

کنسرسیوم بین المللی SMA سه شکل دوران کودکی (نوع I، II و III) را بر اساس سن بروز و شدت علائم بالینی که با آزمایشات بالینی، نمونه‌برداری عضلانی و الکتروفیزیولوژی ارزیابی می‌شود مشخص نمود (جدول ۱).

در نوع I (Werdnig Hoffmann) که شدیدترین و حادترین شکل این بیماری است، معمولاً بروز قبل از ۶ ماهگی و مرگ قبل از ۲ سالگی رخ می‌دهد و کودکان هیچگاه قادر به نشستن بدون کمک نیستند. در نوع II که شکل حد واسطه‌بیماری است، بروز معمولاً قبل از ۱۸ ماهگی و مرگ بعد از ۲ سالگی رخ می‌دهد و کودک قادر به نشستن یا راه رفتن بدون کمک نمی‌باشد. در نوع III یا شکل خفیف بیماری با بروز پس از ۱۸ ماهگی، بیمار همه شاخص‌های حرکتی را کسب می‌کند. نوعی از بیماری که در سنین بزرگسالی بروز می‌کند اصطلاحاً نوع IV نامیده می‌شود که سن بروز آن مختلف و از دهه دوم تا پنجم گزارش شده است (۱، ۶).

بیش از ۵۰ درصد از بیماران آتروفی عضلانی نخاعی دارای شدید ترین شکل این بیماری یعنی نوع یک هستند، که معمولاً منجر به اختلالات تنفسی تا ۲ سالگی می‌شود.

در اشکال خفیف تر بیماری، افراد با ضعف و تحلیل عضلانی پیش‌رونده مواجه هستند. آنها معمولاً جهت کنترل اختلالات و عوارض بیماری بطور مداوم نیاز به فیزیوتراپی و مراقبت‌های پزشکی دارند. در حال حاضر درمان یا معالجه قطعی برای این بیماری وجود ندارد، اما پیشرفت‌های چشم‌گیری در داشت ژنتیک و بیولوژی مولکولی این بیماری حاصل شده است که چشم‌اندازهای روشنی را برای محققین در زمینه درمان موثر این بیماری باز کرده است.

در سال ۱۹۹۰، با استفاده از آنالیز پیوستگی، جایگاه هر سه نوع آتروفی عضلانی نخاعی در کروموزوم 5q11.2-q13.3 شد (۷-۹). تاکنون سه ژن SMN، NAIP و P44 شناخته شده‌اند که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ قرار داشته و عاملی برای ایجاد بیماری هستند. ژن SMN (Survival motor neuron) دارای ۹ اگزون و دو نسخه سانترومی (SMN2) و تلومری (SMN1) است که تنها نسخه تلومری فعال بوده اما از نظر ساختاری بسیار مشابه یکدیگر هستند. فقدان نسخه تلومری، معمولاً حذف خوانده می‌شود که این فقدان می‌تواند در اثر مکانیسم تبدیل ژنی یا Gene Conversion نیز ایجاد گردد. حذف اگزون ۷ ژن SMN1 در اکثربیماران مبتلا

SMAI ، ۹۵ درصد (۱۹ از ۲۰ نفر) SMAII و ۱۰۰ درصد (۱۰ از ۱۰ نفر) SMAIII دارای حذف بصورت هموزیگوت بودند.

در تشخیص پیش از تولد از مجموع ۷۷ نمونه CVS و ۱۵ نمونه آمنیوستنتز که برای حذف اگزون ۷ مورد بررسی قرار گرفتند، ۵۲ (۵۶/۵ درصد) نمونه دارای حذف هتروزیگوت و (۱۹ ۲۰/۶ درصد) نمونه هموزیگوت و (۲۱ ۲۲/۸ درصد) نمونه نیز طبیعی بودند که توزیع بیماری در نمونه‌های جنینی مورد بررسی مطابق قوانین مندل می‌باشد.

بحث

میزان ازدواج خویشاوندی در ایران بالا و در برخی نواحی به ۵۰ درصد می‌رسد که منجر به وقوع و شیوع بالای بیماری‌های ژنتیکی با توارث مغلوب می‌شود. در بررسی حاضر نیز فراوانی ازدواج خویشاوندی ۶۰ درصد برآورد شده است. به همین علت SMA یکی از علتهای اصلی بیماری و مرگ و میر در دوران نوزادی و کودکی در ایران است. اکثر بیماران SMA با حذف‌های هموزیگوت اگزون ۷ و یا ۸ ژن SMN1 مشخص می‌شوند (۱۰-۱۳، ۲).

پس از دیستروفی عضلانی دوش، SMA یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عصبی-عضلانی محسوب می‌گردد. جهش در ژن SMN1 عمدت‌ترین عامل ژنتیکی در ابتلا به بیماری SMA بوده، اما در شدت بیماری اثری نداشته و برای بروز فنتوپیپ بیماری ضروری می‌باشد.

در بعضی بیماران مبتلا به SMA، مکانیسم تبدیل ژنی، توالی ژن SMN1 را به SMN2 تبدیل می‌کند که باعث باقی ماندن اگزون ۸ و حذف اگزون ۷ می‌شود. به دلیل اهمیت اگزون ۷ ژن SMN1 در فرایند بیماری، اگزون ۸ در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفت (۲۹).

فراوانی هموزیگوتی حذف اگزون ۷ ژن SMN1 برای هر سه نوع SMA حدود ۹۴ درصد بود که مشابه گزارش‌های سایر جمیعت‌ها مثل چین، ژاپن، کویت، تونس، اروپای غربی و کانادا است (۱۰، ۱۱، ۱۳-۱۶، ۲۲-۲۹). فراوانی این حذف در میان بیماران مالزی و هند کمتر و در حدود ۸۰ درصد می‌باشد (۳۰، ۳۱). شباهت‌ها و تفاوت‌ها در فراوانی حذف اگزون ۷ ژن SMN1 بین گروه‌های بیماران از جمیعت‌های متفاوت احتمالاً به فراوانی یک جهش خاص در یک جمیعت خاص مربوط می‌شود.

(دنا) توره شدن اولیه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال ۵۵ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای گسترش ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل (۲۱).

محصولات PCR اگزون ۷ ژن SMN1 توسط آنزیم DraI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. محصولات PCR هضم شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ هدایت شدند و توسط رنگ‌آمیزی سیانورات نقره قابل رویت شدند. افراد طبیعی و ناقل SMA دارای قطعاتی به طول ۱۸۸، ۱۴۹ و ۳۹ جفت باز هستند ولی قطعه ۳۹ جفت بازی بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد قابل مشاهده نبوده و تنها دو قطعه دیگر دیده می‌شوند.

در بیماران مبتلا به SMA بعد از هضم کامل آنزیمی توسط DraI تنها یک قطعه ۱۴۹ جفت بازی قابل مشاهده است.

قطعه ۱۸۸ جفت بازی مربوط به نسخه تلومری ژن (SMN1) و قطعه ۱۴۹ به نسخه سانترومری ژن (SMN2) مربوط می‌شود. قسمت‌های هضم نشده متعلق به نسخه تلومری و قسمت‌های هضم شده به نسخه سانترومری تعلق دارند. بیماران مبتلا به SMA تنها ژن سانترومری را دارا هستند. در هر برآرد آزمایش جهت تأیید الگوی دیده شده، نمونه‌های کنترل مثبت طبیعی، ناقل و مبتلا نیز مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). جهت بررسی باندهای حاصل از هضم آنزیمی از نرم افزار Lab Work 4.0 استفاده شد، که قابلیت بررسی دانسیتومتریک باندها را فراهم می‌کند و امکان شناسایی ناقلین و افراد طبیعی با استفاده از آن بسیار دقیق خواهد بود.

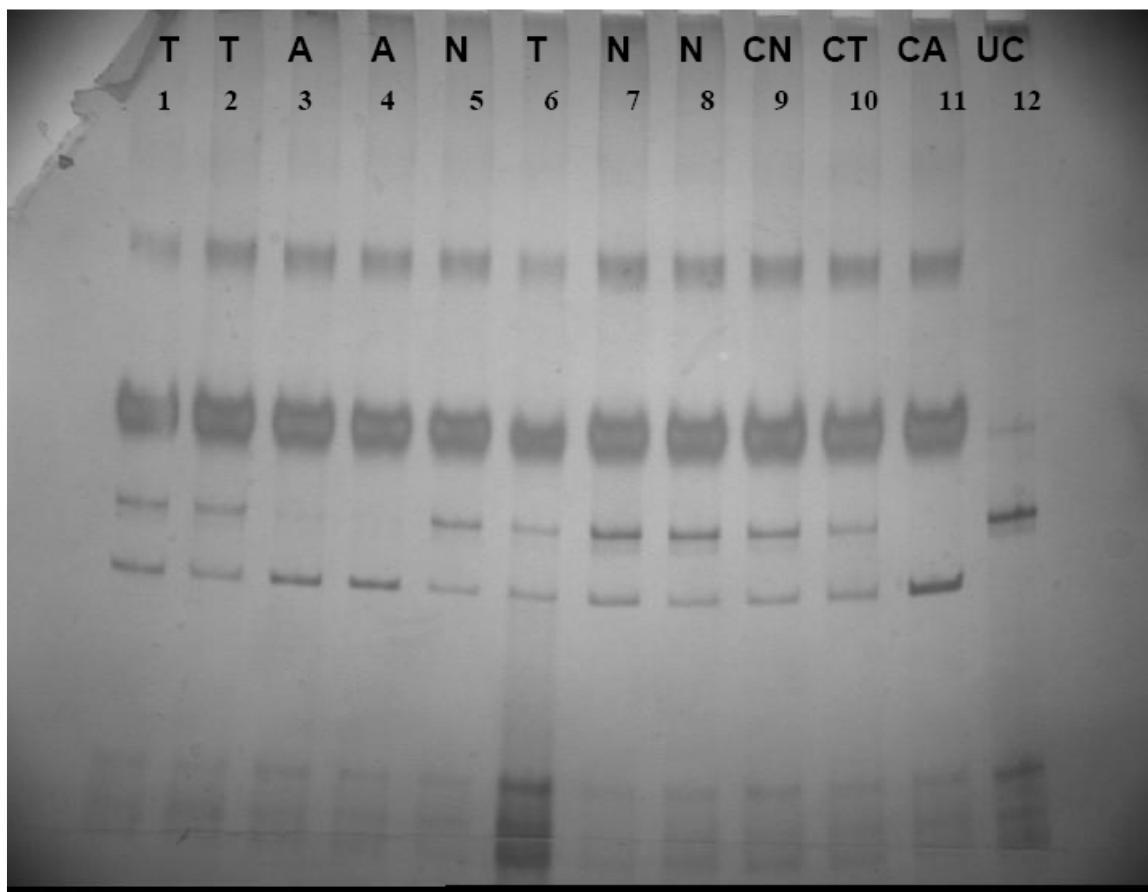
تشخیص پیش از تولد برای خانواده‌هایی که حداقل یک کودک مبتلا داشتند صورت گرفت. نمونه‌های جنینی از پرزه‌های کوریونی (CVS) و مایع آمنیون (AF) گرفته شد. از ۷۷ نمونه CVS توسط روش نمک اشباع و ۱۵ نمونه آمنیونی با استفاده از کیت Viennalab استخراج شد.

یافته‌ها

در این بررسی ۲۴۳ خانواده برای آتروفی عضلانی نخاعی و ارزیابی حذف اگزون ۷ ژن SMN1 مورد بررسی قرار گرفتند. فراوانی ازدواج خویشاوندی در این مطالعه ۶۰ درصد و اغلب بیماران از نواحی مرکزی و شمال ایران بودند.

در میان ۲۴۳ خانواده، ۱۹۵ خانواده با سابقه SMAI، ۳۰ خانواده SMAII و ۱۸ خانواده باقی مانده در SMAIII طبقه‌بندی شدند. این طبقه‌بندی بر اساس سن بروز علایم انجام گردید.

بررسی حذف اگزون ۷ در میان خانواده‌های با فرزند مبتلا زنده نشان داد که ۹۴ درصد (۶۲ از ۶۶ نفر) از خانواده‌های



شکل ۱- محصولات هضم آنزیمی لود شده روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪. در هر ردیف دو باند مشهود است

که باند بالایی مربوط به ژن SMN1 (۱۸۸bp) و باند پایینی مربوط به ژن SMN2 (۱۴۹bp) می باشد.

نمونه های کنترل طبیعی، ناقل ، مبتلا و همچین نمونه برش نخورده با آنزیم محدود کننده شاخص سایر نمونه ها در هر بار آزمایش می باشد.
(N : طبیعی، T : ناقل، A : مبتلا، CN : کنترل ناقل، CA : کنترل مبتلا، UC : نمونه برش نخورده با آنزیم محدود کننده)

تشخیص بیماری مورد قبول محققین است. این امر نیاز به انجام تشخیص های تهاجمی نظری نمونه برداری عضله را در کودک مبتلا به SMA مرتفع می سازد. از طرف دیگر در صورتی که در فرد مبتلا حذف هایی بصورت هموزیگوت دیده شود، تشخیص پیش از تولد دقیقی را می توان از طریق بررسی SMN1 برای خانواده انجام داد. همچنین با استفاده از تشخیص پیش از تولد می توان از تولد نوزادان مبتلا جلوگیری نمود و به این ترتیب از طریق آگاه سازی والدین با توضیح ریسک خطر پیشگیری از این بیماری ممکن می گردد.

از ۹۲ نمونه جنینی، ۲۲/۸ درصد دارای حذف اگزون ۷ به صورت هموزیگوت بودند که ختم بارداری صورت گرفت. کلیه جنین هایی که با بررسی حذف اگزون ۷ غیرمبتلا تشخیص داده شده بودند، پس از تولد نیز از نظر بیماری SMA سالم بودند.

طبق یافته های این پژوهش، روش بررسی DNA بطور قابل ملاحظه ای به تأیید بیماری SMA در افرادی با علائم بالینی غیرمعمول یا نتایج غیرعادی نمونه برداری عضله یا EMG کمک می کند. تشخیص حذف هموزیگوتی اگزون ۷ SMN1 در کودک مبتلا به همراه علائم بالینی بیماری به عنوان

REFERENCES

1. Talbot K. Spinal muscular atrophy. *J Inherited Metab Dis* 1999;22:545-54.
2. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155-65.
3. Roberts DF, Chavez J, Court SD. The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child* 1970; 45:33-8.
4. Pearn J. The genetic frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type I). A total population survey in North-East England. *J Med Genet* 1973;10:260-65.
5. Pearn J. Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1978;15:409-13.
6. Dubowitz V. Chaos in the classification of SMA: a possible resolution. *Neuromuscul Disord*. 1995;5:3-5.
7. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 1990;336:271-73.
8. Wirth B, Pick E, Leutner A, Dadze A, Voosen B, Knapp M, et al. Large linkage analysis in 100 families with autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) and 11 CEPH families using 15 polymorphic loci in the region 5q11.2-q13.3. *Genomic* 1994;20:84-93.
9. Wirth B, Voosen B, Rohrig D, Knapp M, Piechaczek B, Rudnik-Schoneborn S, et al. Fine mapping and narrowing of the genetic interval of the spinal muscular atrophy region by linkage studies. *Genomics* 1993;15:113-18.
10. Chang JG, Jong YJ, Huang JM, Wang WS, Yang TY, Chang CP, et al. Molecular basis of spinal muscular atrophy in Chinese. *Am J Hum Genet* 1995;57:1503-505.
11. Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H, et al. Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe J Med Sci* 2002;48:25-31.
12. DiDonato CJ, Ingraham SE, Mendell JR, Prior TW, Lenard S, Moxley RT 3rd, et al. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann Neurol* 1997;41:230-37.
13. Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE. Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1995;4:631-34.
14. Simard LR, Rochette C, Semionov A, Morgan K, Vanasse M. SMN(T) and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity. *Am J Med Genet* 1997;72:51-58.
15. 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 cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Gene* 1996;52:257-63.
16. Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Burglen L, Cruaud C, et al. A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 1995;11:335-37.
17. Parsons DW, McAndrew PE, Monani UR, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW. An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1727-32.
18. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1999;64:1340-56.
19. Brahe C, Clermont O, Zappata S, Tiziano F, Melki J, Neri G. Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum Mol Genet* 1996;5:1971-76.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
21. Van der Steege G, Grootenhuis PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995;345:985-86.
22. Cobben JM, van der Steege G, Grootenhuis P, de Visser M, Scheffer H, Buys C. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1995;57:805-808.
23. Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoneborn S, Schonling J, Zerres K, et al. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995;4:1927-33.

24. Burlet P, Burglen L, Clermont O, Lefebvre S, Viollet L, Munnich A, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996;33:281-83.
25. Matthijs G, Schollen E, Legius E, Devriendt K, Goemans N, Kayserili H, et al. Unusual molecular findings in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1996;33:469-74.
26. Erdem H, Pehlivan S, Topaloglu H, Yalnizoglu D, Akcoren Z. Deletions in the survival motor neuron gene in Turkish spinal muscular atrophy patients. *J Inher Metab Dis* 1996;19:724-28.
27. Samilchuk E, De Souza B, Bastaki L, Al-Awadi S. Deletion analysis of the SMN and NAIP genes in kuwaiti patients with spinal muscular atrophy. *Hum Genet* 1996;98:524-27.
28. Mrad R, Dorboz I, Ben Jemaa L, Maazoul F, Trabelsi M, Chaabouni M, et al. Molecular analysis of the SMN1 and NAIP genes in 60 Tunisian spinal muscular atrophy patients. *Tunis Med* 2006;84:465-69.
29. Van der Steege G, Grootenhuis PM, Cobben JM, Zappata S, Scheffer H, den Dunnen JT, 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;59:834-38.
30. Watihayati MS, Zabidi-Hussin AM, Tang TH, Matsuo M, Nishio H, Zilfalil BA. Deletion analyses of SMN1 and NAIP genes in Malaysian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr Int* 2007;49:11-14.
31. Kesari A, Idris MM, Chandak GR, Mittal B. Genotype-phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy patients from India. *Exp Mol Med* 2005;37:147-54.