SMN2 유전자 복제수가 척수성 근위축 환자의 표현형에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교병원 어린이병원 소아신경과¹, 서울대학교병원 어린이병원 소아뇌신경센터², 서울대학교 의과대학³,

분당서울대학교병원 소아청소년과⁴, 서울대학교 보라매병원 소아청소년과⁵

우승¹ · 고영준¹ · 김수연^{1,2} · 최선아^{1,2} · 유일한⁴ · 김현민⁴ · 임병찬^{1,2} · 황희^{3,4} · 채종희^{1,2,3} · 최지은^{3,5} · 김기중^{1,2,3} · 황용승^{1,2,3}

The Role of *SMN2* Copy Number in Modulating the Spinal Muscular Atrophy Phenotype

Purpose: Spinal muscular atrophy (SMA) is degenerative disease of motor neuron caused by loss of survival motor neuron (*SMN*)1 gene. *SMN2* gene is highly homologous to *SMN1* and is known to influence disease severity according to its copy number. Our purpose was to investigate genotype-phenotype correlation between the *SMN2* copy number and the clinical course in spinal muscular atrophy patients.

Methods: The correlation between *SMN2* copy number and clinical severity (sub-type, ventilator support, mortality and independent walking) was analyzed.

Results: The *SMN2* copy number was analyzed in 60 SMA patients (male 29, female 31). The average follow-up duration was 4.0 years (0.2 to 16.7). One patient had 1 *SMN2* copy and was on ventilator support. In 20 patients who had 2 *SMN2* copies, 19 (95.0%) were type I and 11 (55.0%) were on ventilator support. There were 4 mortalities in these patients. In 37 patients who had 3 *SMN2* copies, 36 (97.3%) were type II. The 3 patients (8.1%) were on ventilator support and 17 (45.9%) could walk independently. The two patients had 4 *SMN2* copies, each patient was type I and III. Two *SMN2* copies were significantly correlated with earlier ventilator dependence and higher mortality than three *SMN2* copies.

Conclusion: This is the first report that compared the relationship between *SMN2* copy number and clinical phenotype in Korean SMA patients. The lower *SMN2* gene copies were significantly correlated with severe clinical outcomes of SMA. However, additional biomarkers capable of predicting more detailed clinical outcomes within subtypes need to be further determined in an extended cohort.

Key Words: Spinal Muscular Atrophies of Childhood, *SMN2* copy number, SMA

Seung Woo, MD¹, Young Jun Ko, MD¹, Soo Yeon Kim, MD^{1,2}, Sun Ah Choi, MD^{1,2}, Il Han Yoo, MD⁴, Hunmin Kim, MD⁴, Byung Chan Lim, MD^{1,2}, Hee Hwang, MD^{3,4}, Jong Hee Chae, MD, PhD^{1,2,3}, Jieun Choi, MD, PhD^{3,5}, Ki Joong Kim, MD, PhD^{1,2,3}, Yong Seung Hwang, MD, PhD^{1,2,3}

¹Division of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, Seoul National University Children's Hospital, ²Pediatric Clinical Neuroscience Center, Seoul National University Children's Hospital, ³Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea, ⁴Department of Pediatrics, Seoul National University Bundang Hospital, Gyeonggi-do, Korea, ⁵Department of Pediatrics, SMG-SNU Boramae Medical Center, Seoul, Korea

We announced this report as a oral presentation in 64th meeting of Korean Pediatric Society, 2014.

Submitted: 4 June, 2015

Revised: 28 June, 2015

Accepted: 4 July, 2015

Correspondence to Byung Chan Lim, MD, PhD
Division of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, Seoul National University Children's Hospital, 101 Daehak-ro Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: +82-2-2072-2364, Fax: +82-2-2072-3917
E-mail: prabbit7@snu.ac.kr

서론

척수성 근위축은 척수와 뇌간의 운동 신경이 퇴화하여 몸통과 팔다리 근육의 위약감을 일으키는 상염색체 열성 운동신경 질환이다. 척수성 근위축의 유병률은 11,000명당 1명으로 알려져 있으며 증상이 발현하는 시기와 임상적인 중증도에 따라서 3가지의 아형으로 나뉜다^{1,2)}. 가장 심한 형태인 제 1형은 출생 직후에서 6개월 이내에 증상이 발현하며 대부분의 환자들에게서 앓기가 불가능 하다. 이 그룹의 환자들은 생후 수개월

내로 사망하거나 호흡 보조기를 사용하게 되는 경우가 많다. 중등도 형태인 제 2형의 경우, 6개월에서 18개월 사이에 증상이 발생하며 이 환자들은 앓을 수는 있으나 걸을 수 없는 경우가 많다. 생후 18개월이 지나서 증상이 발생하는 척수성 근위축 환자들은 제 3형에 속하는데, 이 환자들은 대부분 걸을 수 있고, 운동발달의 지연이나 경미한 근육의 위약감 및 피로감을 호소한다.

현재 척수성 근위축과 관련된 유전자로 *SMN* (*survival motor neuron*)1 유전자, *SMN2* 유전자, *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) 유전자 등이 알려져 있으며 *SMN1* 유전자의 동형접합 결손 (homologous deletion) 이 척수성 근위축을 발생시키는 주요한 원인으로 알려져 있다^{1,3,4)}. 이 *SMN1* 유전자는 5q13 염색체의 말단소체 쪽에 위치하여 SMN 단백을 생성하며, 이 유전자와 몇 개의 뉴클레오티드의 차이만을 갖는 *SMN2* 유전자는 염색체의 중심질 쪽에 존재한다. 최근 여러 연구에서 이 *SMN2* 유전자의 복제수가 척수성 근위축 환자들의 아형과 임상양상을 결정하는데 큰 역할을 한다고 보고하고 있다⁵⁻¹³⁾.

Coovert 등은 척수성 근위축 환자들에게서 대조군보다 SMN 단백질의 농도가 낮다는 것을 보고하였는데¹⁴⁾, 이처럼 척수성 근위축은 SMN 단백질이 없어서 발생하는 질환이 아니라 SMN 단백질의 양이 감소하여 발생하는 질환으로 알려져 있다. *SMN1* 유전자는 하부 운동신경이 기능을 하는데 필요한 SMN 단백을 완전한 길이로 만들 수가 있는데¹⁵⁾, *SMN2* 유전자는 7번 엑손이 전사되지 못하여 불안정한 SMN 단백을 만들게 된다. 따라서 *SMN1* 유전자에 돌연변이가 생긴 경우 *SMN2* 유전자만으로는 정상적인 양의 SMN 단백을 만들 수 없게 된다. 하지만 *SMN2* 복제수가 증가해 있는 경우에는 적은 양이지만 완전한 길이를 가지고 있는 SMN 단백질이 생성될 가능성이 더 높아지게 된다. 그 결과 더 많은 양의 *SMN2* 복제수를 갖는 척수성 근위축 환자일수록 더 경미한 임상 양상의 아형을 나타내게 되는 것이다¹⁶⁾. Mcandrew 등은 척수성 근위축 보인자 환자들에게 양적 중합연쇄반응 분석을 통하여 *SMN1* 및 *SMN2* 유전자의 복제수를 조사하였고⁹⁾, Wirth 등은 척수성 근위축 환자들의 *SMN2* 유전자 복제수 및 아형을 조사하여 *SMN2* 유전자의 복제수를 척수성 근위축 환자들의 예후를 예측하는 인자로 사용할 수 있음을 주장하였다¹¹⁾. Tiziano 등은 다기관 연구를 통해서 *SMN2* 유전자의 복제수와 제 2형 척수성 근위축 환자들의 Hammersmith functional motor scale과의 연관성을 조사하였고 이를 통해 *SMN2* 유전자 복제수로 환자의 기능적 장애의 정도를 예측하기도 하였다¹²⁾.

본 연구에서는 척수성 근위축으로 진단받은 한국 소아 환자들을 대상으로 *SMN2* 유전자의 복제수와 그 임상양상 및 예후의 연관성을 찾아보았다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구는 서울대학교병원 임상윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(IRB No. 1503-133-660). 1995년 8월부터 2015년 3월 사이에

서울대학교 어린이병원을 처음으로 방문한 환자 중 multiple ligation dependent probe amplification (MLPA) 검사를 통하여 *SMN1*, *SMN2* 복제수 분석을 통해 척수성 근위축으로 진단받은 환자를 대상으로 연구를 시행하였다.

의무기록을 바탕으로 대상 환자들에게서 증상이 시작된 나이, 생존여부 및 사망 시의 나이, 호흡보조기 사용 유무, 보행 가능성 및 마지막 보행 시의 나이를 조사하였다. 또한 증상이 시작된 나이를 고려하여 생후 6개월 이전에 증상이 발생한 경우 제 1형, 6개월에서 18개월 사이에 증상이 발생한 경우 제 2형, 18개월 이후에 증상이 발생한 경우 제 3형으로 각각의 그룹을 세분화 하였다.

2. 방법

1) *SMN2* 복제수 분석

SALSA MLPA kit P021 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands)를 사용하여 *SMN1* 유전자와 *SMN2* 유전자의 복제수 분석을 시행하였다. 약 200 ng의 genomic DNA를 사용하였고 ligation과 amplification은 ABI 9600 Thermal Cycler로 시행되었다. 중합 연쇄 반응은 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 60초, 마지막으로 72°C에서 20분을 포함하여 33 cycle이 시행하였다.

모든 증폭된 fragment는 ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)의 capillary electrophoresis를 사용하여 분리되었다. GeneMarker software version 1.8 (SoftGenetics, State College, PA, USA)을 사용하여 대조들의 최대값의 구간과 비교하여 각각의 증폭된 fragment의 최대값의 구간을 측정 및 정규화 하였다.

2) 통계학적 분석

본 연구에서는 후향적으로 서울대학교 어린이병원에 저장되어 있는 환자들의 전자 의무 기록을 검토하였다. 분석프로그램인 SPSS 21.0 (SPSS, an IBM Company, USA)을 사용하여 통계분석을 하였는데, 카이제곱을 검정을 통하여 *SMN2* 유전자의 복제수와 각각의 증중도 지표들과의 관계가 유의한지 확인하였다. 또한 생존분석을 통하여 *SMN2* 유전자 복제수에 따른 환자들의 사망률 및 호흡 보조기 사용률의 차이를 확인하고자 하였다. 유의수준은 모든 검사에서 *P* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과

1. 환자군의 임상특성

연구기간 안에 척수성 근위축 의심 하에 총 152명의 환자에게 유전자검사를 시행하였고, 그중 55명은 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 검사로 *SMN1* 유전자 검사를 시행하였으며, 73명의 환자들에게서 MLPA 검사를 이용하여 *SMN1*과 *SMN2* 유전자 검사를 시행하였다. MLPA 검사를 통하여 확진된 60명의 환자를 대상으로 이번 연구를 진행하였다.

환자들 중 남자는 29명(48.3%), 여자는 31명(51.7%)이었고, 병원에 방문 당시의 연령은 출생 직후에서부터 20세까지 다양했으며 평균 방문 연령은 2.0세였다. 평균 추적 관찰 기간은 4.0년(0.2-16.7년)이었으

며 19명(31.7%)의 환자가 스스로 보행이 가능했던 경험이 있었다. 보행이 가능했던 19명의 환자 중 14명이 추적관찰 중 걷지 못하게 되었는데, 보행이 불가능해진 평균 나이는 6.6세(1.0–10.9세)였다. 호흡보조기가 필요했던 환자는 총 15명(25.0%) 이었고, 이들의 호흡 보조기 사용 시의 평균 나이는 2.6세(0.1–16.7세)였다. 총 4명(6.7%)의 환자가 사망하였는데, 사망 시의 연령은 0.2세, 3.3세, 0.3세, 0.5세였으며 각각의 사망 원인은 호흡 부전, 패혈성 쇼크였고 두 명의 사망 원인은 알 수 없었다. 발병연령을 기준으로 아형을 분류하였을 때 제 1형은 21명(35.0%), 제 2형은 36명(60.0%), 제 3형은 3명(5.0%)이었다(Table 1).

2. *SMN2* 유전자 복제수에 따른 중증도 분석

대상 환자들의 *SMN2* 유전자 복제수는 1개에서 4개까지 확인이 되었는데 각 그룹별 특징은 다음과 같다.

1) 1개의 *SMN2* 유전자 복제수($n=1$, 1.7%)

이 환자는 제 1형 그룹에 속해 있었고 현재 3세로 1.4세부터 호흡 보조기를 사용하고 있었다.

2) 2개의 *SMN2* 유전자 복제수($n=20$, 33.3%)

이들의 평균 추적관찰기간은 30.2개월(2.1–200.7개월) 이었다. 이 환자들 중 19명(95.0%)은 제 1형 그룹, 나머지 1명(5.0%)은 제 2형 그룹에 속해 있었다. 이들 중 4명의 환자(20.0%)가 연구기간 중 사망하였고 11명(55.0%)의 환자가 호흡 보조기를 사용하고 있었다. 2개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가진 환자들 중 보행이 가능했던 환자는 1명(5.0%) 밖에 없었다.

3) 3개의 *SMN2* 유전자 복제수($n=37$, 61.7%)

이들의 평균 추적관찰 기간은 60.9개월(2.2–174.4개월) 이었다. 이 환자들 중 36명(97.3%)은 제 2형 그룹, 나머지 1명(2.7%)은 제 3형 그룹에 속해 있었다. 이들 중 사망한 환자는 없었으며 호흡 보조기를 사용하고 있는 환자는 3명(8.1%) 이었다. 3개의 *SMN2* 유전자 복제수를

가진 환자들 중 보행이 가능했던 환자는 17명(45.9%) 이었다.

4) 4개의 *SMN2* 유전자 복제수($n=2$, 3.3%)

이들은 각각 제 1형, 제 3형 그룹에 속해 있었다. 제 1형 환자는 현재 5.9세로 생존해 있으며 호흡 보조기를 사용하고 있지 않으나 보행 가능했던 적은 없었다. 제 3형 환자는 현재 22.1세로 생존해 있으며 호흡 보조기를 사용하고 있지 않고 22.0세까지 보행 가능하였으나 현재는 보행 불가능한 상태였다(Table 2).

본 연구에서는 가장 빈도가 높은 2개와 3개의 *SMN2* 유전자 복제수를 갖는 그룹에서의 *SMN2* 유전자 복제수와 중증도 지표(아형, 사망률, 호흡 보조기 사용 유무, 보행 가능성)와의 관계를 확인해 보았다. 2개, 3개의 *SMN2* 유전자 복제수 그룹 내에서 제 1형, 제 2형, 사망률, 호흡 보조기 사용 유무, 보행 가능성을 각각 카이제곱 검정을 통하여 비교해 보았을 때 아형($P<0.01$), 사망률($P=0.01$), 호흡 보조기 사용 유무($P<0.01$)가 통계학적으로 유의하게 *SMN2* 유전자 복제수와 관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 생존 분석을 통하여 각각의 *SMN2* 유전자 복제수 그룹들의 사망률 및 호흡 보조기 사용률을 비교해 보았을 때 *SMN2* 유전자 복제수가 3개인 그룹에서 사망률(Fig. 1A) 및 호흡 보조기 사용률(Fig. 1B)이 감소함을 알 수 있었다.

고찰

이번 연구를 통하여 한국 척수성 근위축 환자들에게서 *SMN2* 유전자 복제수와 질병의 중증도의 연관성을 조사하였고 예후인자로서의 *SMN2* 유전자 복제수의 가능성에 대하여 확인해 보았다.

우선 *SMN2* 유전자 복제수와 환자들의 몇 가지 임상양상을 비교하였을 때 이전 여러 연구에서 알려진 바와 마찬가지로 *SMN2* 유전자 복제수가 증가할수록 임상적으로 경한 아형을 나타내며 사망률 및 호흡 보조기를 사용한 환자의 수가 감소하고, 보행을 경험했던 환자의

Table 1. Clinical Feature of Spinal Muscular Atrophy Patients

Sex (M:F)	29:31
Age at presentation (years)	2.0 (0.0–20.9)
Follow-up duration (years)	4.0 (0.2–16.7)
Mortality (n, %)	4, 6.7%
Ventilator support (n, %)	15, 25.0%
Independent walking (n, %)	19, 31.7%
Type I (n, %)	21, 35.0%
II (n, %)	36, 60.0%
III (n, %)	3, 5.0%

Table 2. Correlation between Survival Motor Neuron (*SMN2*) Copy Number and Clinical Severities

<i>SMN2</i> copy number	1 (n=1)	2 (n=20)	3 (n=37)	4 (n=2)
Type ($P<0.01$)				
I	1	19	0	1
II	0	1	36	0
III	0	0	1	1
Mortality ($P=0.01$)	0	4	0	0
Ventilator support ($P<0.01$)	1	11	3	0
Independent walking ($P=0.07$)	0	1	17	1

Fig. 1A. The cumulative overall survival curves of SMA patients according to *SMN2* copy number ($P=0.01$).

Fig. 1B. The cumulative self respiration curves of SMA patients according to *SMN2* copy number ($P<0.01$).

수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 다만, 4개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가진 환자 중 한명이 제 1형으로 분류가 되었는데, 이는 *SMN2* 유전자뿐만 아니라 다른 예후인자 및 환경적인 요인이 추가로 예후에 영향을 미칠 가능성을 시사한다.

이미 알려진 바와 같이 척수성 근위축은 척수의 전각 세포의 운동 신경이 퇴화하여 근육의 위약을 일으키는 유전질환으로 다양한 임상 양상을 가지게 된다. 가장 증상이 심한 제 1형 척수성 근위축 환자의 경우 출생 직후부터 근력의 저하 및 호흡장애가 나타나며 사망하는 경우도 있고 호흡보조기를 사용하게 되는 경우가 많다. 그에 비하여 제 3형 척수성 근위축 환자들은 생후 18개월까지 증상이 없다가 점차 증상이 진행하고 보행이 가능한 경우도 많다. 따라서 척수성 근위축 환자들을 치료하는데 있어서, 획일적인 치료방법으로 접근하는 것보다 각각의 환자들의 예후를 미리 파악하고 발생할 수 있는 질병의 경과를 예측하여 상황에 맞는 치료를 선택하고 재활의 시기를 정하는 것이 중요하다고 생각한다. 또한 최근 Crawford 등은 전향적인 연구를 통하여 SMN enhancing agent를 통한 치료의 가능성을 언급하였는데⁸⁾, 이렇게 유전자 치료에 대한 연구가 활발해지면 그 치료 대상을 결정하는 데 있어 예후인자의 중요성은 더 커질 것으로 보인다. 최근 안티센스 올리고핵산염(antisense oligonucleotide)을 척수강내로 주입하여 *SMN2* 유전자의 스플라이싱을 조절함으로써, 7번 exon이 포함된 기능적으로 완벽한 단백질이 생성되어 근위축 증상이 현저하게 개선되는 현상을 생쥐모델에서 증명한 연구가 발표되었다¹⁷⁾. 이 방법을 응용하여 현재 척수성 근위축 환자를 대상으로 한 임상시험이 진행 중으로(NCT02193074), 실제 환자의 선정기준에 *SMN2* 복제수가 2개인 조건이 포함되었다. 이는 안티센스 올리고핵산염을 이용한 치료가 *SMN2* 유전자를 타겟하고 있다는 사실 이외에, 객관적인 예후 예측인자로서의 *SMN2* 유전자 복제수 평가의 유용성을 시사하는 소견으로 해석할 수 있다.

이번 연구결과를 보면 *SMN2* 유전자 복제수와 척수성 근위축 환자들의 아형이 매우 밀접한 관계가 있기 때문에 중증도 지표로 분석한 사망률, 호흡 보조기 사용 유무, 보행 가능성 등에서 환자의 아형을 통하여 예측한 것과 *SMN2* 유전자 복제수를 가지고 예측했을 때 큰 차이가 없었다. Harada 등이 진행했던 연구에서도⁶⁾ 1개 혹은 2개의 *SMN2* 유전자 복제수를 갖는 8명의 환자들은 모두 제 1형 그룹에, 3

개의 *SMN2* 유전자 복제수를 갖는 18명의 환자 중 16명은 제 2형 그룹에, 4개 이상의 *SMN2* 유전자 복제수를 갖는 1명의 환자는 제 3형 그룹에 속해 있어 *SMN2* 유전자 복제수를 이용하여 예측한 예후와 아형을 통해 예측한 예후에는 큰 차이가 없었다. 하지만, 본 연구에서 같이 *SMN2* 복제수 및 아형 안에서도 호흡기 의존시기 및 사망시기 차이가 존재함을 확인하였고, 이는 초기에 적극적인 치료가 필요한 환자군을 선별할 필요가 있음을 시사한다고 볼 수 있다. 이러한 제한점을 보강하기 위해, *SMN2* 유전자 복제수 외에도 NAIP 결손, H4F5 유전자 복제수 등 다른 예후인자에 대한 연구가 진행되었으나^{5,7)} 아직은 *SMN2* 복제수 이외에 예후예측을 위해 임상에 적용가능한 바이오마커는 확인되지 않았다. 추후 더 다양한 예후인자의 분석을 포함한 대규모의 전향적인 코호트 연구를 통하여 척수성 근위축 환자들의 정확한 예후인자를 파악하기 위한 노력이 필요할 것으로 생각된다.

요약

목적: 척수성 근위축은 *SMN1* 유전자 기능이 소실되면서 운동 신경이 퇴행하여 발생하는 질환이다. *SMN2* 유전자는 *SMN1* 유전자와 구조가 상당히 비슷한 유전자인데, 그 복제수에 따라서 척수성 근위축 환자들의 중증도에 영향을 미친다고 알려져 있다. 이번 연구에서는 한국 척수성 근위축 환자들에게서 *SMN2* 유전자 복제수에 따른 유전형과 표현형의 상관관계 및 임상적인 질병의 경과를 조사해 보았다.

방법: 서울대 어린이 병원에 방문한 척수성 근위축 환자들을 대상으로 *SMN2* 유전자 복제수와 중증도 지표들(생존 유무, 호흡 보조기 사용 유무, 독립 보행 유무)과의 관계를 분석하였다.

결과: 총 60명의 환자들(남자 29명, 여자 31명)을 대상으로 연구를 진행하였고 이들의 평균 추적관찰 시간은 3.5년(0.2년-16.7년)이었다. 한 명의 환자가 1개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가지고 있었으며 이 환자는 호흡 보조기를 사용하고 있었다. 20명의 환자가 2개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가지고 있었으며 이중 19명의 환자가(95.0%) 제 1형 척수성 근위축 그룹에 속해있었고 11명이(55.0%) 호흡 보조기를 사용하고 있었으며 이 환자들 중 사망한 수는 4명 이었다. 37명의 환자가 3개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가지고 있었는데, 그 중 36명은(97.3%) 제 2형 척수성 근위축 그룹에 속해 있었고 3명의(8.1%) 환자가 호흡기 보조기를 사용하고 있었으며 17명의(45.9%) 환자가 보행 경험이 있었다. 2명의 환자가 4개의 *SMN2* 유전자 복제수를 가지고 있었는데 이들은 각각 제 1형, 제 3형 척수성 근위축 그룹에 속해 있었다. 또한 3개의 *SMN2* 유전자 복제수보다 2개의 *SMN2* 유전자 복제수가 사망률 및 초기 호흡 보조기 사용률과 더 밀접한 관계가 있었다.

결론: 이번 연구는 한국 척수성 근위축 환자들에게서 시행된 첫 번째 *SMN2* 유전자 복제수 분석 이었다. 연구를 통해서 *SMN2* 유전자 복제수가 작을수록 더 심한 임상 경과를 갖는다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 각 아형 내에서 보다 정확한 예후를 예측하기 위해서는 추가적인 인자들을 포함한 광범위한 코호트 연구가 필요할 것으로 보인다.

References

- 1) Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfes EM, et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72400 specimens. *Eur J Hum Genet* 2012;20:27-32.
- 2) Yuan P, Jiang L. Clinical characteristics of three subtypes of spinal muscular atrophy in children. *Brain Dev* 2015;37:537-41.
- 3) Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6307-11.
- 4) Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, et al. Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 1998;6:467-74.
- 5) Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH, et al. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 2009;31:42-5.
- 6) Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, et al. 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;249:1211-9.
- 7) Amara A, Adala L, Ben Charfeddine I, Mamaï O, Mili A, Lazreg TB, et al. Correlation of SMN2, NAIP, p44, H4F5 and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2012;16:167-74.
- 8) Crawford TO, Paushkin SV, Kobayashi DT, Forrest SJ, Joyce CL, Finkel RS, et al. Evaluation of SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study. *PLoS One* 2012;7:e33572.
- 9) McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 1997;60:1411-22.
- 10) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, et al. Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain Dev* 2014;36:914-20.
- 11) Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 2006;119:422-8.
- 12) Tiziano FD, Bertini E, Messina S, Angelozzi C, Pane M, D'Amico A, et al. The Hammersmith functional score correlates with the SMN2 copy number: a multicentric study. *Neuromuscul Disord* 2007;17:400-3.
- 13) Zheleznyakova GY, Kiselev AV, Vakharlovsky VG, Rask-Andersen M, Chavan R, Egorova AA, et al. Genetic and expression studies of SMN2 gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. *BMC Med Genet* 2011;12:96.
- 14) Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997;6:1205-14.
- 15) Lefebvre S, Bürglen 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.
- 16) Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, Melki J. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:294-8.
- 17) Passini MA1, Bu J, Richards AM, Kinnecom C, Sardi SP, Stanek LM, Hua Y, Rigo F, Matson J, Hung G, Kaye EM, Shihabuddin LS, Krainer AR, Bennett CF, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2011;2:72ra18.