

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Jasmina M. Maksić

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA STATUSA PRENOSIOCA  
KOD DIŠENOVE I BEKEROVE MIŠIĆNE  
DISTROFIJE U POPULACIJI SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Jasmina M. Maksić

**THE IMPORTANCE OF DETERMINING CARRIER  
STATUS IN DUCHENNE'S AND BEKER'S  
MUSCULAR DYSROPHY IN THE POPULATION  
OF SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:**

Mentor:

- Prof dr Ivana Novaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

- Prof. dr Vidosava Rakočević Stojanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
- Doc. dr Nela Maksimović, docent Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
- Prof. dr Dragan Rapaić, redovni profesor Fakulteta za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZNAČAJ ODREĐIVANJA STATUSA PRENOSIOCA KOD DIŠENOVE I BEKEROVE MIŠIĆNE DISTROFIJE U POPULACIJI SRBIJE

### Sažetak

**Uvod:** Distrofinopatije su bolesti koje nastaju kao posledica mutacija u genu za distrofin. Dišenova mišićna distrofija (DMD) predstavlja najteži oblik iz ove grupe bolesti. Karakteriše je rani početak bolesti, progresivna mišićna slabost koja dovodi do gubitka pokretljivosti bolesnika i kardio-pulmonalne slabosti zbog zahvatanja srčanog i respiratornih mišića. Bekerova mišićna distrofija (BMD) se javlja kasnije, ima blaži tok bolesti, ali sa velikom varijabilnošću u kliničkoj slici. Nasleđujuju se X-vezano recesivno, oboljevaju muškarci dok su žene uglavnom zdravi prenosioci bolesti. Procenjeno je da su 2/3 majki nosioci, 5-10% ima gonadni mozaicizam, dok 25-30% nema mutaciju. Gen za distrofin (DMD gen) je najveći opisani gen u humanom genomu i često je podložan promenama. Najčešće su prisutne intragenske delecije (65%-70%) i duplikacije (5-15%) jednog ili više egzona, dok su tačkaste mutacije prisutne u 20% slučajeva. 1/3 bolesnika ima *de novo* mutaciju. Za sada nema uspešne terapije distrofinopatija, pa je utvrđivanje statusa nosioca kod ženskih članova u porodici od značaja za davanje genetskog saveta i prenatalnu dijagnozu.

**Cilj rada** je bio da se utvrde i analiziraju delecije i duplikacije u genu za distrofin kod probanada; da se u slučajevima potvrđenih delecija i duplikacija kod probanada utvrdi status prenosioca kod njihovih ženskih srodnika; u slučajevima bez dokazanih delecija i duplikacija kod probanada, da se ispita mogućnost indirektno genetičke analize za određivanje statusa ženskih prenosioca; da se u indikovanim slučajevima izvrši prenatalna molekularno genetička analiza DMD gena, primenom adekvatne metode za datu porodicu.

**Material i metode:** Uzorak su činila 72 DMD/BMD probanda, 69 ženskih članova iz 44 porodice probanada i 11 trudnica (15 trudnoća). Genomska DNK za analizu je izolovana iz limfocita periferne krvi ispitanika metodom isoljavanja prema standardnoj proceduri, a za prenatalnu dijagnozu, DNK je izolovana iz uzorka horionskih resica, plodove vode ili krvi pupčanika ploda primenom komercijalnog kita. Za detekciju delecija i duplikacija u DMD genu kod probanda primenjene su metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (MLPA); za

detekciju ženskih nosioca primenjene su MLPA metoda i analiza vezanosti; za prenatalnu dijagnozu primenjene su PCR metoda, analiza vezanosti i MLPA metoda.

**Rezultati:** Primenom PCR i/ili MLPA metode kod 29 DMD i 43 BMD probanada je otkriveno 68,1% velikih mutacija, tj. 87,7% delecija i 12,3% duplikacija. Delecije i duplikacije su zahvatile veći broj egzona u 79,6% slučajeva, a najčešća lokalizacija je bila u štapičastom domenu gena, u 85,7%. Odstupanje od Monakovog pravila je bilo prisutno kod 8,7% DMD bolesnika i 16,7% BMD bolesnika. Kod ispitanih ženskih srodnika probanada, velike mutacije su bile nađene u 39,6% slučajeva. Od 37 ispitanih majki probanada, potvrđenih nosioca je bilo 45,9%. Kod izolovanih DMD slučajeva je nađeno 50% majki nosioca, odnosno 37,5% kod BMD. Među DMD/BMD slučajevima sa delecijom, majke su bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva, a u DMD/BMD slučajevima sa duplikacijom majke su bile nosioci u 75% slučajeva. Od preostalih 16 ženskih srodnika, kod 25% su bile nađene delecije koje ima i proband sa kojim su u srodstvu. U analizi vezanosti najinformativniji je bio marker DXS1237 (intron 45) u 77,8% slučajeva. Na osnovu samo analize vezanosti kod 8 porodica, učestalost ženskih hetozigota je iznosila 82,3%. Kod 7 porodica analiza vezanosti je bila dopunjena MLPA analizom, a predviđanje na osnovu analize vezanosti da su nosioci ili ne, je bilo potvrđeno kod 55,5% ispitanica (dve porodice); kod 4 porodice nije mogla biti isključena tačkasta mutacija; a kod jedne porodice MLPA analiza nije potvrdila nosioce. Kod 3 trudnice kod kojih je primenjena indirektna molekularno genetička metoda, za dva muška ploda očekivani ishod je bio da će biti zdravi, dok kod trećeg ploda predviđeni ishod, da će biti bolestan, nije bio potvrđen MLPA analizom, ali se ne isključuje mogućnost prisustva tačkaste mutacije. Kod 8 trudnica (12 trudnoća) je bila primenjena direktna molekularno genetička metoda. Kod jedne majke, iz tri trudnoće, dva ploda (jedan muški, jedan ženski) su imala deleciju, dok jedan muški plod nije imao deleciju; kod druge majke, u dve trudnoće, delecija je bila potvrđena kod oba muška ploda.

**Zaključak:** U porodicama sa dokazanim delecijama ili duplikacijama u DMD genu kod probanda, direktna molekularno genetička analiza omogućuje precizno otkrivanje žena prenosioca ovog tipa mutacije i utvrđivanje stope *de novo* i nasleđenih mutacija. Na osnovu dobijenih podataka za naš uzorak, utvrđena stopa novih mutacija iznosi ukupno 51,4%, odnosno 45,5% za DMD bolesnike i 60% za BMD bolesnike. U slučajevima bez

dokazanih delecija ili duplikacija u DMD genu kod obolelog, indirektnom molekularno genetičkom analizom tj. analizom vezanosti, može se pratiti nasleđivanje rizičnog hromozoma kod svih članova u porodici. Ukoliko se kod majke ne otkrije promena u DMD genu, to još uvek ne isključuje prisustvo mutacije, tj. mogućnost prisustva gonadnog mozaicizma kod majke, pa je prenatalna dijagnoza od velikog značaja u svakom od pomenutih slučajeva.

**Ključne reči:** distrofinopatije, mutacije u DMD genu, ženski nosioci, prenatalna dijagnoza

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Genetika

UDK broj:

# THE IMPORTANCE OF DETERMINING CARRIER STATUS IN DUCHENNE'S AND BEKER'S MUSCULAR DYSROPHY IN THE POPULATION OF SERBIA

## Abstract

**Introduction:** Dystrophinopathies are diseases that result from mutations in the dystrophin gene. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most severe form of this group of diseases. It is characterized by an early onset of the disease, a progressive muscle weakness that leads to loss of mobility of the patient, spreading to the heart and respiratory muscles, causing cardio-pulmonary weakness. Becker muscular dystrophy (BMD) occurs in late childhood or adolescence, has a milder course of the disease, but with widely variable clinical presentations. It has an X-linked recessive inherited pattern, whereby males are affected, while females are mostly healthy carriers of the disease. It is estimated that 2/3 of the mothers are carriers, 5-10% have gonadal mosaicism and 25-30% have no mutation. The gene for dystrophin (DMD gene) is the largest known gene in the human genome and is often subject to change. The most common changes are intragenal deletions (65% -70%) and the duplication (5-15%) of one or more exons, as well as point mutations in 20% of cases. 1/3 of patients have *de novo* mutation. There is no successful therapy for dystrophinopathy, therefore the detection of female carriers in a family is important for genetic counseling and prenatal daignosis.

The **aim of work** was to determine and analyze the deletions and duplications of the dystrophin gene in probands; in the cases of confirmed deletions and duplications in the trial, to determine the status of the carrier in their female relatives; in the cases with no proven deletions and duplications in the trial, the possibility of indirect genetic analysis for determining the status of female carriers; in the indicated cases to perform prenatal molecular genetic analysis of the DMD gene, using an appropriate method for a particular family.

**Material and methods:** The sample consisted of 72 DMD/BMD probands, 69 female members from 44 proband families and 11 pregnant women (15 pregnancies). The genomic DNA for analysis was isolated from the peripheral blood lymphocytes of the subjects, according to the standard procedure, and for prenatal diagnosis, the DNA was

isolated from the sample of chorionic villi, amniotic fluid or blood of the umbilical cord using a commercial kit. For the detection of deletions and duplications in the DMD gene, polymerase chain reaction (PCR) method and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method were applied; for the detection of female carriers, the MLPA method and linkage analysis were used; for prenatal diagnosis, the PCR method, linkage analysis and MLPA methods were applied.

**Results:** By using PCR and/or MLPA methods in 29 DMD and 43 BMD probands 68.1% large mutations were found, i.e. 87.7% deletion and 12.3% duplication. Deletions and duplications included more exons in 79.6% of cases, and the most common localization was in the central rod domain of the gene, in 85.7%. An exception from the Monaco rule was present in 8.7% of DMD patients and 16.7% of BMD patients. In the case of female relatives of probands, large mutations were found in 39.6% of cases. Out of the 37 proband mothers tested, 45.9% were confirmed as carriers. In isolated DMD cases, 50% of the mothers were confirmed as carriers, and 37.5% in the BMD. Among DMD/BMD cases with deletions, mothers were confirmed as carriers in 56% of cases, and in DMD/BMD cases with duplications, the mothers were confirmed as carriers in 75% of cases. Of the remaining 16 female relatives, deletions were found in 25%, and they were the same as those of their proband relatives. In the linkage analysis, the most informative marker was DXS1237 (intron 45) in 77.8% of cases. Based only on the linkage analysis in 8 families, the frequency of female heterozygous was 82.3%. In 7 families, linkage analysis was supplemented by MLPA analysis, and prediction based on the linkage analysis of whether they are carriers or not, was confirmed in 55.5% of respondents (two families); in 4 families point mutation could not be excluded; while in one family MLPA analysis did not confirm the carriers. In 3 pregnant women, an indirect molecular genetic method was applied. For two male fetuses the expected outcome was that they would be healthy, while in the third fetus the predicted outcome was not confirmed by MLPA analysis, which does not exclude the possibility of point mutation. In 8 pregnant women (12 pregnancies), a direct molecular genetic method was applied. In one mother, from three pregnancies, two fetuses (one male, one female) had a deletion, while one male fetus had no deletion; in the second mother, in two pregnancies, deletion was confirmed in both male fetuses.



**Conclusion:** In families with proven deletions or duplications in the DMD gene in the probands, direct molecular genetic analysis enables the precise detection of female carriers of this type of mutation and determining the rate of *de novo* and inherited mutations. Based on the data obtained for our sample, the determined rate of new mutations amounts to a total of 51.4%, or 45.5% of DMD patients and 60% of BMD patients. In cases where there is no evidence of deletion or duplication in the DMD gene in the probands, indirect molecular genetic analysis (linkage analysis) can be used to follow the inheritance of risky chromosome in all family members. If there are no confirmed changes in the DMD gene of the mother, this does not still exclude the presence of a mutation and the possibility of the presence of gonadal mosaicism in the mother, therefore prenatal diagnosis is of great importance in each of the above cases.

**Key words:** dystrophinopathies, mutations in DMD gene, female carrier, prenatal diagnosis

**Scientific area:** Medicine

**Scientific field:** Genetics

UDK number:

*Zahvaljujem se mojoj mentorki, prof. dr Ivani Novaković, koja mi je omogućila izradu doktorske teze i koja je svih ovih godina bila uz mene.*

*Zahvaljujem se zaposlenima u genetskoj laboratoriji Neurološke klinike, posebno Valeriji Dobričić, kao i zaposlenima Instituta za humanu genetiku na pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se uvažanim članovima Komisije na ukazanom poverenju.*

*Zahvaljujem zaposlenima Fakulteta za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju, mojim prijateljima i porodici na nesebičnoj podršci.*

*Ovaj rad posvećujem mojim ćerkama*

<b>Sadržaj</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Gen za distrofin</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3. Patogeneza distrofinopatija</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4. Mutacije u genu za distrofin</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5. Genotip-fenotip korelacija</b> .....	<b>11</b>
<b>1.6. Nasleđivanje DMD/BMD</b> .....	<b>13</b>
<b>1.7. Klinička slika DMD/BMD</b> .....	<b>16</b>
<b>1.8. Dijagnoza DMD/BMD</b> .....	<b>18</b>
<b>1.9. Genetičko testiranje i detekcija nosioca</b> .....	<b>19</b>
1.9.1. PCR metoda .....	20
1.9.2. MLPA metoda.....	22
1.9.3. Analiza vezanosti (Linkage analiza).....	24
<b>1.10. Genetičko savetovanje i prenatalna dijagnoza</b> .....	<b>26</b>
<b>1.11. Genska terapija kod DMD/BMD bolesnika</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Ciljevi rada</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Materijal i metode</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2. Primenjene metode</b> .....	<b>33</b>
3.2.1. Izolacija DNK.....	34
3.2.2. Multipleks PCR analiza .....	35
3.2.3. Gel elektroforeza .....	36
3.2.4. MLPA analiza.....	36
3.2.5. Kvantifikacija PCR produkata kapilarnom elektroforezom .....	39
3.2.6. Linkage analiza .....	39

<b>4. Rezultati</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. Rezultati PCR i/ili MLPA analize kod probanda</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2. Rezultati MLPA analize kod ženskih srodnika probanada</b> .....	<b>59</b>
<b>4.3. Rezultati dobijeni analizom vezanosti (linkage analiza)</b> .....	<b>66</b>
4.3.1. Prikaz porodica kod kojih je rađena analiza vezanosti.....	69
<b>4.4. Rezultati prenatalne dijagnoze</b> .....	<b>73</b>
<b>5. Diskusija</b> .....	<b>75</b>
<b>6. Zaključci</b> .....	<b>100</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>104</b>

## ***1. Uvod***

---

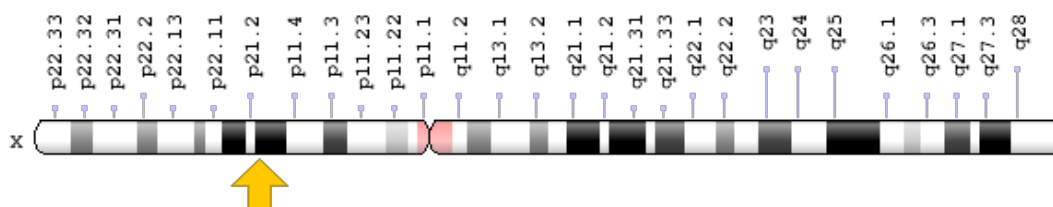
Mišićne distrofije obuhvataju klinički heterogenu grupu naslednih poremećaja. Karakteriše ih progresivna slabost simetričnih grupa skeletnih mišića, u nekim slučajevima i srčanog, što dovodi do različitog stepena invaliditeta i preuranjene smrti. U ovu grupu poremećaja spadaju Dišenova i Bekerova mišićna distrofija, ređa stanja vezana za skeletne ili srčane miopatije, kao i kardiomiopatija vezana za X hromozom.

Prvi radovi koji govore o neuromišićnim poremećajima datiraju još iz 19. veka. Npr. Conte i Gioja 1836. godine (1), opisuju pojavu mišićne slabosti kod dva brata sa početkom u 10-oj godini života, koja progredira u generalizovanu mišićnu slabost sa hipertrofijom mišića. Takođe, Meryon 1852. godine (2) daje prikaz porodice u kojoj su bila zahvaćena četiri dečaka sa značajnim promenenama na mišićima, ali bez promena u centralnom nervnom sistemu. Ovi podaci su ukazivali da je u osnovi poremećaja defekt sarkoleme mišića, da je naslednog karaktera i da oboljevaju muškarci. Francuski neurolog Guillaume Duchenne 1868. godine (3) daje obiman prikaz neuromišićne bolesti kod 13 pacijenata, koju naziva – pseudohipertrofična mišićna paraliza (engl. "paralyse musculaire pseudo-hypertrophique"). Zbog velikog doprinosa razumevanju mišićnih bolesti, u čast Guillaume Duchenne-a, klasičan oblik mišićne distrofije kao najteži oblik u ovoj grupi bolesti, dobija ime po njemu - Dišenova mišićna distrofija.

Distrofinopatije čine Dišenova mišićna distrofija, Bekerova mišićna distrofija i kardiomiopatija vezana za X hromozom, a nastaju kao posledica mutacija istog gena koji kodira citoskeletni protein distrofin. To su monogenske bolesti sa X-vezanim recesivnim tipom nasleđivanja gde oboljevaju muškarci, dok su žene uglavnom zdravi prenosioci bolesti. Dišenova mišićna distrofija (DMD) se javlja sa učestalošću 1:3500 živorođene muške dece i predstavlja najteži oblik iz ove grupe poremećaja zbog odsustva proteina distrofina. Bolest se ispoljava oko treće godine života, a karakteriše je progresivno slabljenje skeletne i glatke muskulature, kao i funkcije srčanog mišića, u dvadesetim godinama života (4). Bekerova mišićna distrofija (BMD) predstavlja alelni oblik DMD, javlja se kasnije tokom života, uglavnom sa srednje teškom kliničkom slikom, ali varijabilnom, od veoma blagih - skoro asimptomatskih oblika, do formi graničnih sa DMD. Kako se radi o bolestima za koje još uvek nema uspešne terapije, otkrivanje mutacije kod bolesnika, kao i utvrđivanje statusa ženskih prenosioca bolesti su od velikog značaja za davanje genetičkog saveta i prenatalnu dijagnozu.

## 1.1. Gen za distrofin

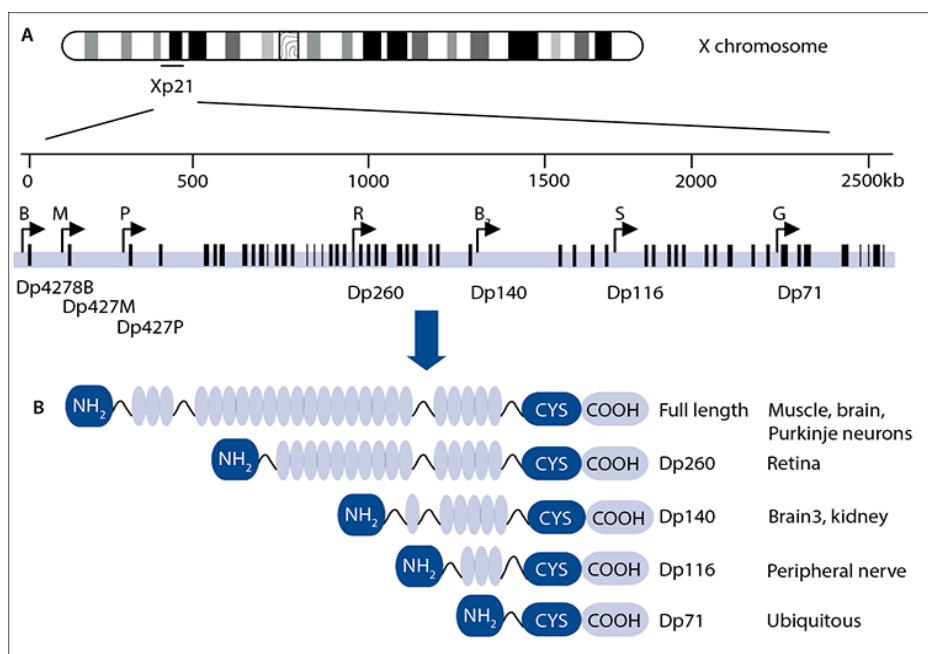
Humani X hromozom sadrži 155 miliona baza i oko 1900 gena, od čega 824 gena kodira proteine, a samo 48 gena ima funkcionalne parove na Y hromozomu. Gen za distrofin (DMD gen) se nalazi na X hromozomu i najveći je otkriveni gen u humanom genomu. Kompletna cDNK ovog gena i njegova preliminarna organizacija data je 1987. godine (5). DMD gen je lociran na kratkom kraku X hromozoma (Xp21.2- p21.1; slika 1) i obuhvata 2.220.223 baznih parova, što čini oko 0,1% humanog genoma. Strukturu gena čini 79 kodirajućih sekvenci, odnosno egzona i najmanje 7 tkivno specifičnih promotora, povezanih sa jedinstvenim prvim egzonima (slika 2) (6). Nekodirajući regioni – introni, čine 99% gena za distrofin.



Slika 1. Pozicija DMD gena na X hromozomu (preuzeto sa <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DMD>)

Poznato je da DMD gen daje najmanje 18 različitih transkripata iRNK i samim tim različite forme distrofina (7). Transkript DMD gena koji se prevodi u protein pune dužine (427kDa) (8) ima 14000bp, i za njegovu sintezu potrebno je 16h. Tri izoforme distrofina, pune dužine i istog broja egzona, imaju različite specifične promotore na 5' kraju gena koji su povezani sa jedinstvenim prvim egzonima. Ovi promotorski regioni su nazvani prema tkivima u kojima se prevashodno ekspimiraju - dp427m se ekspimirira u skeletnim i srčanom mišiću, i u nekim glijalnim ćelijama (9); dp427c je prisutan u mozgu, primarno u kortikalnim neuronima i hipokampusu, kao i u ćelijama retine; dok dp427p kontroliše ekspresiju u Purkinjeovim ćelijama, ali i u skeletnim mišićima (10). Osim pomenutih tkiva, opisane su forme distrofina koje su prisutne i u Švanovim ćelijama, bubrezima, jetri, plućima, limfocitima... Ove forme distrofina su poreklom sa četiri promotora koja su lokalizovana unutar samog gena, a dovode do

stvaranja kraćih izoformi distrofina. Svaki od ovih promotora koristi jedinstveni prvi egzon za spajanje sa egzonima 30, 45, 56 i 63 za izoforme distrofina određene veličine. Imena ovih promotora odgovaraju molekularnoj težini proteina koji daju: dp260 (intron 29) je retinalna izoforma, takođe prisutna u mozgu i srčanom mišiću (11); dp140 (intron 44), izoforma je prisutna u mozgu i bubrezima (12); dp116 (intron 55), je izoforma koja se nalazi samo kod odraslih osoba duž membrane Švanovih ćelija (13); i dp71 (lokalizovan 8kb uzvodno od egzona 63), daje opštu izoformu distrofina koja se nalazi u većini nemišićnih tkiva – mozgu, bubrezima, jetri i plućima (14). Iako su ove izoforme distrofina sa nedostajućim aktin vezujućim krajem, one sadrže cistein-bogati domen, kao i C-terminus, sa vezujućim mestima za proteine – distroglikana, distrobrevina i sintrofina. Važan mehanizam nastanka mnogih izoformi distrofina leži u mehanizmu alternativnog splajsovanja, što predstavlja vid regulacije genske ekspresije (7), ali i mehanizmu egzonskog premeštanja koji se ogleda u recipročnom rasporedu egzona (engl. exon scrambling) (15). Od svih pomenutih izoformi distrofina, kao funkcionalno najznačajnija forma, izdvaja se mišićni distrofin.



Slika 2. Strukturna organizacija DMD gena (modifikovano prema Muntoni i sar. (6)): prikazani su tkivno specifični promotori – za mozak (B i B<sub>3</sub>), mišiće (M), Purkinjeove ćelije (P), mrežnjaču (R), Švanove ćelije (S), opšti promotor (G).



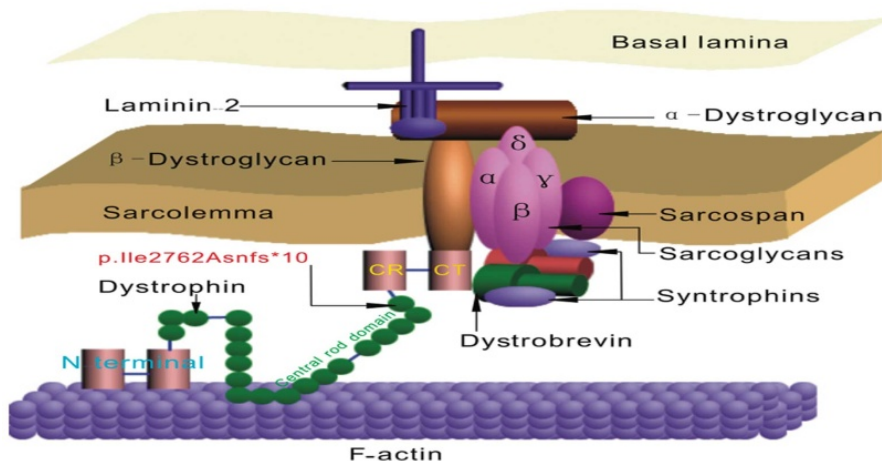
## **1.2. Distrofin i distrofin-glikoproteinski kompleks**

Distrofin je veliki štapićasti protein, molekulske težine 427kDa, i pripada spektrinskoj porodici proteina. Izgrađen je od 3685 aminokiselina i ima 4 različita funkcionalna domena. N-terminalni domen (engl. N-terminal actin-binding domain; sa ABD1 vezujućim mestom) je kodiran egzonima 1-8 DMD gena i sadrži do 240 aminokiselina. Ovaj domen sadrži dva kalponin-homologa regiona CH1 i CH2, sa tri aktin vezujuće sekvence, i omogućuje vezivanje distrofina za aktinske filamente citoskeleta (16). Centralni, štapićasti domen (egzoni 9-62), se sastoji iz 24 ponovaka sličnih spektrinu i sadrži oko 3000 aminokiselina, kao i 4 zglobna mesta bogata prolinom (H1-H4) koja daju fleksibilnost proteinu. U blizini središnjeg dela štapićastog domena nalazi se drugo vezujuće mesto (engl. second actin-binding domain; ABD2) preko koga, zajedno sa ABD1, distrofin gradi jaku bočnu vezu duž aktinskih filamenata, sa jedne strane, a preko cistein bogatog domena ostvaruje vezu sa C-terminalnim krajem, sa druge strane (17). Cisteinski domen je bogat cisteinom (egzoni 62-69), izgrađen je od 280 aminokiselina i sadrži WW domen, EF ručni domen (engl. hand domain), i ZZ domen. C-terminalni domen (egzoni 70-79) se sastoji od 420 aminokiselina, a kodira ga visoko konzervisan, alternativno splajsovan deo gena. C-terminalni deo distrofina ostvaruje vezu sa  $\beta$ -dystroglikanom mišićne membrane preko WW domena, ali samo u prisustvu EF ručnog domena, koji WW domenu omogućuje pravilnu prostornu konformaciju za formiranje te veze (18). ZZ domen ima važnu ulogu u ostvarivanju stabilne veze između distrofina i  $\beta$ -dystroglikana membrane mišićne ćelije.

Distrofin čini svega 2% od ukupnih proteina koji su sadržani u mišićima, ali je očigledno da ima veoma važnu ulogu u njihovoj strukturi i funkciji (19). Za normalnu funkciju mišićne ćelije i integritet mišićne membrane – sarkoleme, važan je veliki broj proteina i glikoproteina koji su specifični za mišić. Centralnu ulogu imaju distrofin i distrofin-glikoproteinski kompleks (DGK). DGK čine dva transmembranska subkompleksa: dystroglikani ( $\alpha$  i  $\beta$ ) i sarkoglikan-sarkospan ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ -sarkoglikani) i citoplazmatski proteini: distrofin, sintrofini i  $\alpha$ -dystrobrevin, kao i niz drugih distrofin-udruženih proteina (engl. dystrophin-associated proteins, DAP) (20). Uloga ovog kompleksa je da interaguje sa laminom u ekstracelularnom matriksu, a njegov sastav se razlikuje u zavisnosti od tkiva. Dystroglikani ( $\alpha$  i  $\beta$ ) potiču od istog polipeptida, koji

posttranslacionom obradom daje odgovarajuće forme proteina, u zavisnosti od njihove lokalizacije i uloge.  $\alpha$ -dystroglikan je veliki ekstracelularni glikoprotein, nalazi se na površini sarkoleme i ima ulogu receptora za ligande (21;22). Preko glukoznog lanca,  $\alpha$ -dystroglikan je povezan sa komponentom bazalne lamine, lamininom-alfa 2, i takođe, tesno je povezan sa  $\beta$ -dystroglikanom kao transmembranskim proteinom. Unutar ćelije,  $\beta$ -dystroglikan interaguje sa dystrofinom preko cistein-bogatog domena i prve polovine C-terminalnog domena. Za drugu polovinu C-terminalnog domena dystrofina vezuje se sintrofinski citoplazmatski kompleks. Familiju sintrofina čine  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ , i  $\gamma_2$  proteini, pri čemu je  $\alpha$ -sintrofin predominantno prisutan u skeletnim mišićima. Smatra se da su sintrofinski adaptorni proteini koji lokalizuju signalne molekule blizu sarkoleme. Takođe,  $\alpha$ 1-sintrofin je neophodan za povezivanje neuronalne azot-oksida sintetaze (nNOS) sa membranom mišićne ćelije (23). Drugi submembranski glikoproteinski kompleks čine sarkoglikani koji su povezani sa dystrofinom preko bočne veze dystroglikanskog kompleksa. Sastav sarkoglikanskog kompleksa razlikuje se u zavisnosti od tkiva (20).

Iz navedenog se vidi da dystrofin ima važnu ulogu osovine u mišićnoj ćeliji, jer predstavlja vezu između proteina citoskeleta i plazma membrane mišićnog vlakna. Sa jedne strane, preko N-terminalnog i štapićastog domena dystrofin je povezan sa f-aktinom citoskeleta, a preko cistein-bogatog domena i C-terminusa sa  $\beta$ -dystroglikanom i drugim proteinima i glikoproteinima sarkoleme, čineći dystrofinsko-glikoproteinski kompleks (DGK, slika 3.) (24;25). Uloga ovog kompleksa je da stabilizuje sarkolemu i štiti mišićna vlakna od oštećenja koja nastaju njihovom dugoročnom kontrakcijom (24;26). Kako je ranije pomenuto, pojedini proteini DGK-a imaju ulogu i u prenosu signala između ćelija. U osnovi tu ulogu imaju sintrofinski koji, kao citoplazmatski periferni membranski proteini, povezuju jonske kanale i signalne proteine sa dystrofinom (preko C-terminusa) i njemu sličnim proteinima (27;23). Takođe, druga dva membranska kompleksa proteina – integrini i kaveolini, predstavljaju medijatore u signalanim kaskadama u ćeliji, koje učestvuju u mehanizmu ćelijske odbrane i regulaciji ravnoteže između ćelijskog preživljavanja i ćelijske smrti (26).



Slika 3. Distrofin i distrofin-glikoproteinski kompleks

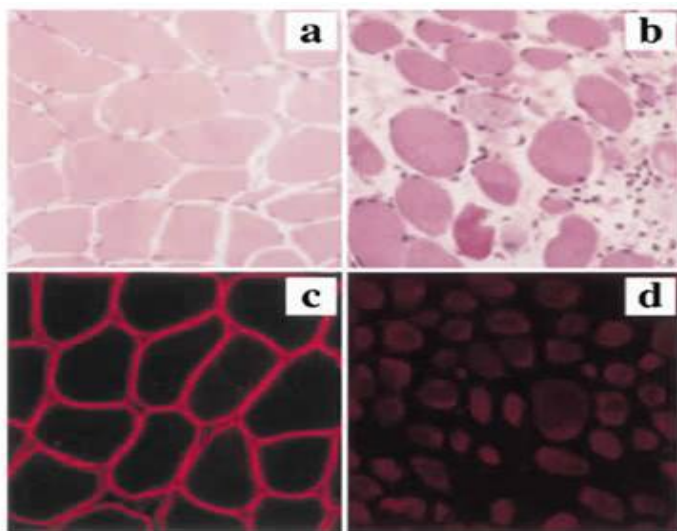
(preuzeto sa <https://www.spandidospublications.com/ijmm/32/5/1166>)

### 1.3. Patogeneza distrofinopatija

Promene u genima koji kodiraju proteine DGK-a dovode do različitih oblika mišićnih distrofija (28). DGK sadrži distroglikane, sarkoglikane, integrine i kaveolin, a mutacije u genima koji kodiraju za ove proteine uglavnom uzrokuju autozomno recesivne oblike bolesti (29). U osnovi ovih poremećaja leže abnormalnosti distrofin-udruženog kompleksa i oštećenja membrane mišićne ćelije. Ove promene izazivaju niz događaja koji vode povećanom ulasku kalcijumovih jona u ćeliju i aktivaciji proteaza, čime se ćelije dodatno oštećuju pa nastaje nekroza. Mutacije u DMD genu koje uzrokuju nedostatak distrofina vode destabilizaciji DGK-a i progresivnom propadanju intracelularnih komponenti, što rezultuje visokom koncentracijom enzima kreatin-fosfo kinaze (CPK). Takođe, u serumu se nalaze i povišene vrednosti drugih izoenzima, laktat dehidrogenaze, alanin transaminaze i aspartat transaminaze. DMD oštećeni mišić ima nejednake ćelije, zamenjene masnim i fibroznim tkivom, a nezahvaćena mišićna vlakna postaju hipertrofična (slika 4). Kako proces progredira, mišić se smanjuje, bleđi i slabi. Kod BMD bolesnika prisustvo skraćenog, delimično funkcionalnog distrofina, u određenom stepenu može da stabilizuje membranu mišića, ali izmenjeni ćelijski procesi ipak vremenom vode nekrozi ćelije.

Istraživanja pokazuju da patogeneza ovih poremećaja često uključuje promene u strukturi neuromišićne sinapse, sa posledičnim smanjenjem (gubitkom) neuronalne azot-oksida sinteze (nNOS) na postsinaptičkoj membrani. Kao što je rečeno,  $\alpha$ 1-

sintrofin povezuje enzim nNOS sa sarkolemom, dok distrofin ima ulogu u dovođenju nNOS do membrane. Uloga nNOS je u sintezi azot-oksida (NO) koji vazodilacijom arterijskih krvnih sudova obezbeđuje dotok krvi u mišiće tokom njihove kontrakcije. Oštećenjem proteina DGK-a i smanjenjem nivoa NO dolazi do lokalne ishemije u mišiću, a verovatno i do povećanja ćelijske osetljivosti na metabolički stres, što vodi nekrozi ćelije (26;30). Takođe, u patogenezi distrofinopatija je značajno i učešće imunološkog sistema. Promene u DGK-u dovode do aktivacije većeg broja komponenti imunog sistema i niza zapaljenskih signalnih kaskada u različitim periodima bolesti. Uočena je rana infiltracija mišićnih ćelija makrofagima i eozinofilima, koja perzistira, a njihova interakcija sa oslobođenim zapaljenskim faktorima vremenom vodi nekrozi ćelije (31;32). Takođe, specifični antigeni koji se nalaze na površini distrofične ćelije, sa svoje strane, aktiviraju T-ćelije koje pokazuju citotoksični efekat prema izmenjenom mišiću (33). Vremenom, nekrotični mišići bivaju zamenjeni fibroblastima, a mišić postaje tvrd i neelastičan. Nedostatak funkcionalnih mišićnih jedinica uzrokuje slabost i, konačno, kontrakture. DMD pacijenti su vezani za invalidska kolica do svoje 12-te godine života, dok zahvaćenost respiratornih i kardijalnog mišića vodi ranoj smrtnosti, u dvadesetim godinama života (34).



Slika 4. a) normalan mišić b) mišić kod DMD bolesnika d) kompletno odsustvo distrofina (preuzeto sa <https://mmcneuro.wordpress.com/tag/beckers-muscular-dystrophy>)

Prisustvo distrofina u mišićnoj ćeliji u količini koja je manja od 3%, je karakteristična za DMD. Takođe, bez obzira na veličinu proteina, nivoi distrofina između 3% i 10% koreliraju sa intermedijarnim fenotipom (blaži DMD ili teški BMD), dok se nivoi proteina veći od 20% viđaju kod blagih ili umerenih blika BMD (35). Ipak, još uvek je nedovoljno jasno zašto su kod ovih bolesnika određene mišićne grupe zahvaćene slabošću više od drugih i zašto se mišićna slabost manifestuje tek nakon nekoliko godina, iako je distrofin nedostajući/izmenjen već u fetalnom mišiću.

#### ***1.4. Mutacije u genu za distrofin***

Mutacije su promene u strukturi gena. DMD gen je zbog svoje veličine često podložan promenama i predstavlja veliki izazov u otkrivanju i analizi mutacija koje dovode do DMD/BMD. Tako su u DMD genu opisane promene koje zahvataju jedan ili više egzona (velike mutacije), zatim promene manje od jednog egzona (male mutacije), ili retko, promene u intronu (manje od 1% slučajeva).

U literaturi je opisano više od 200 različitih mutacija u DMD genu, a najčešće prisutne promene su delecije. Učestalost velikih intragenskih delecija kod DMD bolesnika iznosi 65-70%, odnosno kod 55% obolelih od BMD (36). Raspored nađenih delecija u DMD genu je specifičan, a najčešće su zahvaćena dva regiona tzv. vruća mesta (engl. hot spots). Ovi lokaliteti obuhvataju egzone 45-55 (distalni deo gena), sa tačkom prekida u intronu 44 u 30% slučajeva (37) i egzoni 2-20 (proksimalni deo gena), sa najčešćom tačkom prekida u egzonima 2 i 7 (6). Duplikacije su prisutne u 5-15% DMD bolesnika i kod 5-19% bolesnika sa BMD (38). Passos-Bueno i sar. zapažaju da se kod izolovanih DMD/BMD slučajeva, 30% intragenskih delecija i duplikacija javlja u proksimalnom delu gena i oko 70% u distalnom delu gena, dok je taj odnos u familijarnim slučajevima praktično izjednačen (39). Autori zaključuju da delecije u proksimalnom delu gena verovatno nastaju tokom rane embriogeneze, sa većom šansom da postanu familijarne, dok se delecije u distalnom delu gena dešavaju kasnije i uglavnom su sporadične. Prema istim autorima, rizik rekurencije kod novih mutacija u proksimalnom delu gena iznosi oko 30%, a za nove mutacije u distalnom delu gena oko 4%.

Delecije u DMD genu uglavnom nastaju kao posledica nejednakog krosing-overa tokom oogeneze, u 75% slučajeva, dok su u 56% slučajeva posledica mutacija nastalih u

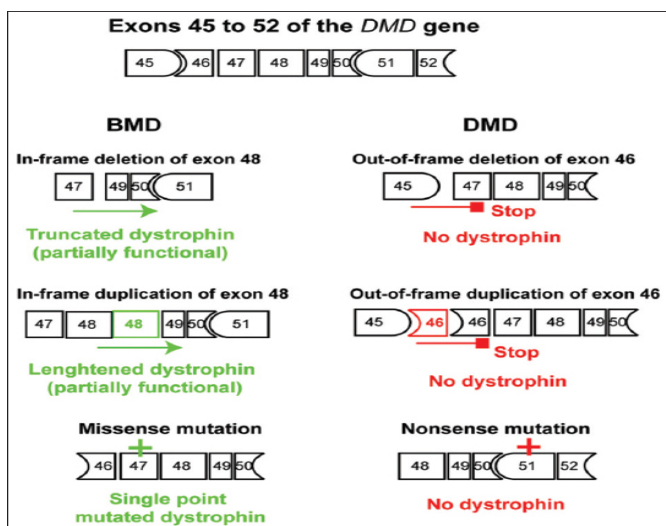
muškim gametima (37). Za razliku od delecija, duplikacije češće nastaju zbog događaja tokom spermatogeneze (engl. grandpaternal germline) (40). U osnovi, duplikacije mogu nastati istim mehanizmom kao i delecije, tokom homologe ili nehomologe rekombinacije, ili pak insercijom, ali je analizom tačaka prekida pokazano da verovatnije nastaju usled sintezis-zavisnog povezivanja nehomologih krajeva (41). Takođe, duplikacije su češće zastupljene u familijama, što povećeva rizik rekurencije. Iako se duplikacije mogu naći u bilo kom delu DMD gena, ipak su češće prisutne u blizini 5' kraja gena, a duplikacija egzona 2 je opisana kao najčešća duplikacija jednog egzona (41).

Pored delecija i duplikacija, ostale promene koje se mogu javiti u DMD genu su male mutacije (manje od jednog egzona) i javljaju se u 20% slučajeva. Od toga su mikrodelecije prisutne u 25% slučajeva, mikroinsercije u 9%, a u 14% greške u intron/egzon povezivanju (engl. splice sites). Preostalih 52% malih mutacija čine tačkaste mutacije, od kojih su 50% besmislene (engl. nonsense), a 2 % su pogrešnog smisla (engl. missense). U 0,3% slučajeva javljaju se promene unutar introna (42). Većina tačkastih mutacija je lokalizovana u nekodirajućim regionima i ne pokazuju specifičnu distribuciju u genu, mada se veliki broj nalazi distalno od egzona 55 (43). Tačkaste mutacije su najčešće besmislene i udružene sa DMD fenotipom, u 20-25% slučajeva, dok se kod BMD bolesnika javljaju u manje od 5% slučajeva (44;45). Kod malog broja DMD slučajeva, a češće kod BMD bolesnika, tačkaste mutacije vode supstituciji aminokiseline, ali je teško predvideti funkcionalne posledice. 1/3 mutacija u DMD genu su *de novo* mutacije. Novonastale delecije su uglavnom posledica događaja tokom oogeneze (majčina baka), dok su duplikacije i tačkaste mutacije najčešće poreklom iz spermatogeneze (majčin deda) (46).

S obzirom na izuzetnu veličinu DMD gena, pretpostavilo se da ima veću stopu mutacije od prosečne stope mutacije drugih gena u genomu (47). Stopa spontanih mutacija u DMD genu je visoka i iznosi  $1 \times 10^{-4}$  po genu, po gametu. Takođe, stopa intragenskih rekombinacija u DMD genu je i do četiri puta veća od očekivane (oko 10%), a dva najčešće zahvaćena regiona obuhvataju egzone 44-51 i egzon 7, što se poklapa sa distribucijom delecija u genu tj. "vrućim tačkama" (48). Visoku stopu intragenskih rekombinacija i visoku učestalost novih mutacija u DMD genu nalazimo u radovima većeg broja autora (40;49-53).

### ***1.5. Genotip-fenotip korelacija***

Pokazalo se da veličina i lokalizacija mutacije nisu u korelaciji sa težinom kliničke slike, s obzirom da male mutacije vode težem DMD fenotipu, odnosno, mutacije velikog broja egzona mogu da daju blaži, BMD fenotip. Prema Monakovom pravilu, efekat mutacije na fenotip zavisi od toga da li mutacija menja okvir čitanja genetičke šifre ili ne – engl. reading frame rule (slika 5) (54). Teža klinička slika kod DMD bolesnika posledica je frame-shift mutacija u genu za distrofin. Ove mutacije (delecije ili duplikacije) menjaju okvir čitanja (engl. out-of-frame), što vodi stvaranju praktično nedetektujućih količina skraćenog, nefunkcionalnog proteina. Delecije koje ne menjaju okvir čitanja (engl. in-frame) rezultuju stvaranjem skraćenog, delimično funkcionalnog proteina, što se povezuje sa blažom kliničkom slikom kod BMD bolesnika. Ipak, oko 10% DMD/BMD bolesnika odstupa od ovog pravila (55). Ova činjenica se odnosi na BMD bolesnike koji imaju delecije ili duplikacije koje menjaju okvir čitanja, kao i one DMD bolesnike koji imaju delecije ili duplikacije koje ne menjaju okvir čitanja. Novije studije ukazuju da duplikacije, koje su češće prisutne kod BMD bolesnika, odstupaju od Monakovog pravila čak u preko 30% slučajeva (38). Opisano je nekoliko delecija i duplikacija koje menjaju okvir čitanja kod BMD bolesnika, i to u egzonima 3-7, 5-7, 3-6, 51, 49-50, 47-52, 44 ili 45. Ova pojava objašnjena je kroz dva mehanizma – mehanizam alternativnog splajsovanja koji preskakanjem egzona vodi ponovnom uspostavljanju okvira čitanja, i drugi, prisustvo dodatnog mesta za otpočinjanje translacije, nizvodno od mutacije. Tako delecija egzona 3-7, koja predstavlja out-of frame mutaciju, vodi stvaranju BMD fenotipa, zbog alternativnog spajanja sa egzonom 8, od koga praktično kreće sinteza proteina (56).



Slika 5. In frame/out of frame delecije u genu za distrofin (preuzeto sa <https://www.bjbm.org/ojs/index.php/bjbm/rt/printerFriendly/636/168>)

Pomenuto je da distrofin sadrži četiri funkcionalna domena, a promene u njima mogu različito da utiču na fenotip. N-terminalni domen, kako je ranije navedeno, sadrži aktivna mesta koja omogućavaju vezivanje distrofina za citoskeletni aktin. Mutacije u ovom delu bitno remete stabilnost distrofinске sprege i smanjuju afinitet za ostvarivanje ove veze, što rezultuje težom kliničkom slikom kod bolesnika (57). Procenjeno je da 7% DMD bolesnika ima mutaciju u ovom domenu, a najčešće su zahvaćeni egzoni 2-7. I kod BMD bolesnika mutacije koje se javljaju u ovom regionu dovode do nižeg nivoa distrofina, što takođe uslovljava težu kliničku sliku. Smatra se da 1/3 bolesnika koji imaju mutaciju u ovom regionu odstupa od Monakovog pravila (58). Na primer male delecije kod DMD pacijenata koje ne menjaju okvir čitanja (egzoni 3, 5, 3-13), daju teži fenotip jer remete 5' aktin vezujući kraj proteina. Kada su u pitanju BMD bolesnici opisane su delecije egzona 3-7, 5-7, 3-6, koje remete okvir čitanja, ali još uvek daju srednje teški oblik bolesti. Besmislene mutacije su prisutne u 10% slučajeva i uglavnom su povezane sa DMD fenotipom, s obzirom da su besmislene mutacije povezane sa BMD sklonije da izazovu egzonsko preskakanje (59).

Štapićasti domen čini 75% distrofina, sadrži četiri zglobna mesta koja mu daju fleksibilnost i drugo vezujuće mesto koje učestvuje u formiranju bočne veze sa aktinskim filamentima. Velike mutacije u ovom domenu, koje ne remete okvir čitanja, a ograničene su na štapićasti domen i imaju očuvani N i C terminalni domen, uglavnom



daju BMD fenotip (60). Ipak, opisana su odstupanja u slučajevima velikih in-frame mutacija koje daju DMD fenotip, a koje su obuhvatile egzone 10-44, 13-40 i 3-41 (61). Tipična lokalizacija za ovaj region koja daje BMD fenotip jesu delecije distalno od egzona 44 (44-59), ali često sa varijabilnom kliničkom slikom (62;63). Tako na primer, delecije egzona 45-47 i 45-49 daju teži BMD fenotip, nego delecije egzona 45-48 i 45-51 (64). Takođe, delecije egzona 32-44, 48-51 i 48-53 pokazuju skoro normalne vrednosti distrofina i manifestuju se izolovanom hiper CPK, mijalgijom i grčevima, ali bez mišićne slabosti (65). Tome možemo dodati i deleciju egzona 48, koja takođe daje blažu BMD formu (66).

### ***1.6. Nasleđivanje DMD/BMD***

Dišenova i Bekerova mišićna distrofija su monogeneske bolesti koje se nasleđuju X-vezano recesivno, oboljevaju muškarci koji su hemizigoti za mutirani alel, dok su žene uglavnom zdravi heterozigotni prenosioci bolesti.

Prema Mendelovom principu nasleđivanja: 1. otac oboleo od X recesivne bolesti prenosi mutirani alel samo ženskoj deci koja će biti fenotipski zdravi prenosioci bolesti; 2. žena heterozigotni nosilac mutiranog gena, ima verovatnoću od 50% da njene ćerke naslede X hromozom sa mutiranim alelom i budu nosioci, kao i 50% da taj hromozom naslede sinovi i obole. Da bi žena obolela od X vezane recesivne bolesti, njena majka bi morala biti prenosilac, a otac bolestan, a verovatnoća iznosi 25%. Ili ređe, žena može oboleti od X recesivne bolesti - u našem slučaju od DMD/BMD, ako se mutirani gen nalazi na jedinom X hromozomu, kao kod Turnerovog sindroma (67); usled uniparentalne dizomije X hromozoma koji nose mutirane gene (68); kod postojanja balansirane translokacije između X hromozoma i autozoma, sa tačkom prekida u DMD genu (zbog inaktivacije zdravog X hromozoma); ili kao posledica preferencijalne inaktivacije X hromozoma (69).

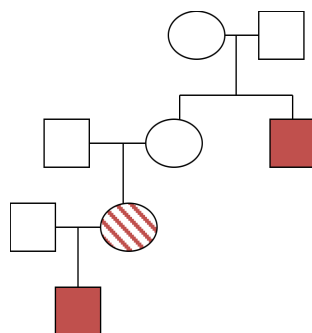
Kod izolovanih slučajeva Dišenove mišićne distrofije procenjeno je da su 2/3 majki nosioci mutacije, kod 5-10% je prisutan gonadni mozaicizam, dok je u 25-30% slučajeva u pitanju nova mutacija nastala tokom mejoze (67). Nalazi autora na osnovu nivoa CPK, za majke sporadičnih DMD slučajeva, pokazuju mogućnost od 62,3% da je majka nosilac, 6,7% da ima gonadni mozaicizam i 31% da nije nosilac (70). Takođe,

odsustvo novih aficiranih muških članova, uz niži nivo CPK kod majke snižava rizik da bude nosilac. Tomoko i sar. (71) nalaze značajnu razliku u učestalosti majki nosilaca u zavisnosti od toga da li je u pitanju DMD ili BMD fenotip. Učestalost BMD majki nosilaca iznosila je 89,5%, a kod DMD majki nosilaca – 57,6%, verovatno zbog mogućnosti da BMD bolesnici imaju potomstvo. Takođe, učestalost DMD majki nosilaca je bila niža za delecije nego za duplikacije i male mutacije, dok su *de novo* mutacije više bile prisutne kod delecija (71). S obzirom na karakter bolesti, DMD bolesnici ne prenose mutirani alel potomstvu, što znači da u svakoj generaciji 1/3 tih alela biva izgubljena za populaciju, ali nadalje biva kompenzovana novim mutacijama (72).

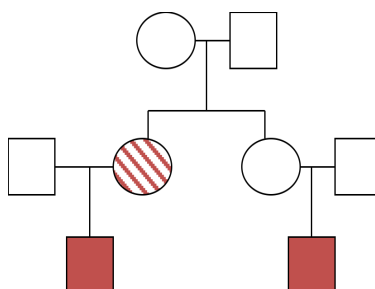
Prema genetičkom modelu žena može biti nosilac ako je njena majka nosilac; ako je nastala nova mutacija tokom mejoze u oogenezi kod njene bake ili majke, ili u spermatogenezi kod njenog dede; ili kao posledica novonastale mutacije tokom mitoze u oogenezi kod njene bake ili majke, ili tokom spermatogeneze kod njenog dede, što rezultuje gonadnim mozaicizmom (73).

Prema porodičnom stablu, žene koje se smatraju obaveznim prenosiocima su one koje imaju: 1. obolelog oca; 2. obolelog sina i obolelog brata ili ujaka; 3. obolelog sina i sestru koja takođe ima obolelog sina (slike 6 i 7). Žena koja ima dva ili više obolelih sinova, bez drugih bolesnih muških rođaka, je verovatan prenosilac, kao i žena sa obolelim sinom i jednim ili više bolesnih muških unuka. Mogući prenosilac je žena koja ima jednog obolelog sina ili ako nema bolesne dece ali ima obolele druge muške članove u porodici (74). Ako žena ima jednog obolelog sina, i nema obolelih drugih muških članova u porodici, rizik rekurencije će zavistiti od toga da li je ona nosilac mutacije ili ne. U tom slučaju razmatraju se sledeće mogućnosti:

1. Žena je nosilac mutiranog gena sa rizikom od 50% da svaki muški potomak bude zahvaćen.
2. Kod sina je mutacija novonastala (tokom mejoze u gametu koji je vodio njegovom začeću), a rizik rekurencije je neznatan.
3. Žena ima gonadni mozaicizam. Mutacija je kod žene nastala za vreme mitoze germinativnih ćelija, i u zavisnosti od veličine nastalog mutiranog klona, rizik rekurencije u narednim trudnoćama je između 0% i 50%.



Slika 6. Obavezni prenosilac - žena koja ima obolelog sina i ujaka (porodično stablo)



Slika 7. Obavezni prenosilac - žena koja ima obolelog sina i sestru koja ima obolelog sina

Prisustvo više obolelih potomaka kod roditelja koji ne nose mutirani alel, ukazuje na prisustvo gonadnog mozaicizma. Bilo da je prisutan kod oca ili kod majke, gonadni mozaicizam povećava rizik ponovnog javljanja mutacije kod potomaka. Bakker i sar. (75) procenjuju da je kod majki koje imaju obolelog sina, a same nisu bile potvrđene kao nosioci, rizik rekurencije kod muškog ploda u narednoj trudnoći 14%, ukoliko je u pitanju rizični haplotip (7% ako je haplotip nepoznat). Ovakav rizik rekurencije autori nalaze na osnovu ponovne pojave mutacije među ukupno prenesenim rizičnim haplotipovima. Van Essen i sar. (74) nalaze da taj rizik iznosi 20%. Hartl smatra da je rizik rekurencije niži od 5% ako je samo jedan sin aficiran, dok zahvaćenost dva ili više sinova povećava rizik na 25-30% (76). Velika studija, Barbujanija i sar. (77), pokazala je da je najmanje u 10% sporadičnih slučajeva mutacija nastala kao posledica greške tokom rane deobe germinativnih ćelija. Helderman i sar. (78), za germinativni mozaicizam, nalaze rizik od 8,6% prilikom prenošenja rizičnog haplotipa, ali naglašavaju da postoji razlika ukoliko su u pitanju proksimalne delecije (15,6%), odnosno distalne delecije (6,4%). Za nepoznat haplotip, prema istim autorima, rizik rekurencije u familijama iznosi 4,3%.

### ***1.7. Klinička slika DMD/BMD***

Dišenovu mišićnu distrofiju karakteriše progresivna mišićna slabost i rana smrtnost zbog razvoja respiratorne i kardijalne slabosti kod ovih bolesnika. Klinička slika Dišenove mišićne distrofije se manifestuje oko treće godine života, mada blaže motoričko zaostajanje može biti prisutno i ranije. Kako najranije bivaju zahvaćeni mišići donjih ekstremiteta, roditelji zapažaju promene u hodu deteta, koji je „gegav“, trapav, dete često pada, hoda na prstima, teško ustaje sa poda, i otežano se penje uz stepenice. Na potkolenicama je uočljiva pseudohipertrofija mišića, mada hipertrofija može biti prisutna i na drugim skeletnim mišićima. Vremenom, mišići sve više propadaju, nekrotični mišići bivaju zamenjeni vezivnim i masnim tkivom, razvija se hipotrofija mišića sa sve izraženijom mišićnom slabošću i lumbalnom lordozom. Ova mišićna slabost uzrok je sve težem hodu i ustajanju, a Gowersov znak je pozitivan (pacijent se podiže iz čučnja oslanjajući se o svoja kolena i „puzeći“ dalje uz noge pri uspravljanju). Osim slabosti ekstenzora kuka, kolena i stopala, bivaju zahvaćeni i proksimalni mišići ruku, ramenog pojasa i fleksori vrata. Ne retko, biva zahvaćena i mimična muskulatura, ali bulbomotorika i funkcija sfinktera ostaju očuvani. Zahvaćenost srčanog mišića je prisutna kod najvećeg broja DMD bolesnika. Oko 25% bolesnika ima kardiomiopatiju oko 6-te godine života, 59% od 10-te godine, a više od 90% posto bolesnika starijih od 18 godina pokazuje patološki elektrokardiogram (79). Napredovanje bolesti dovodi do gubitka pokretljivosti bolesnika, sa produblјivanjem deformiteta kičmenog stuba i stvaranjem kontraktura (kukovi, kolena, laktovi, skočni zglobovi). DMD pacijenti su obično vezani za invalidska kolica do 12 godine starosti (34). Napredovanjem bolesti pacijent više nije u mogućnosti da sedi, deformiteti grudnog koša i slabost respiratorne musculature povećavaju rizik za infekcije pluća sa fatalnim ishodom, a zbog kardiomiopatije i od akutnog zastoja srca. Respiratorna i kardijalna slabost vode smrtnom ishodu kod ovih bolesnika u kasnim tinejdžerskim ili ranim dvadesetim godinama života (34).

Bekerova mišićna distrofija je prvi put opisana 1955. godine (80). Karakteristika ove forme mišićne distrofije jeste da je blažeg kliničkog toka, često sa varijabilnom kliničkom slikom - od praktično asimptomatskih oblika do onih koji se graniče sa DMD. Incidenca BMD je 1:30.000, karakteriše je kasniji početak (oko 10-te godine) i

sporiji tok bolesti. U početku je prisutan bol u potkolenicama nakon fizičkog napora, što vremenom postaje sve izraženije, a u četvrtoj deceniji obično prestaje samostalno kretanje. Lakši oblici BMD mogu ići sa asimptomatskom hiper CPK-emijom, grčevima i mioglobinurijom, dok srednje teški oblici BMD pokazuju progresivnu, simetričnu mišićnu slabost i atrofiju, uglavnom proksimalne muskulature (65). Takođe, slabost mišića kvadricepsa dugo može biti jedini klinički znak kod bolesnika. Teže oblike BMD karakteriše brži razvoj bolesti i ranija vezanost za kolica, ali ne pre 16 godine života. Pacijenti sa blažim oblikom BMD zadržavaju sposobnost kretanja i posle 40-te godine. Zahvaćenost srčanog mišića može biti prisutna bez obzira na stepen zahvaćenosti skeletne muskulature. Studija bolesnika sa blažim oblikom BMD, starosti od 6-48 godina, pokazala je da je kod čak 68% bio zahvaćen i srčani mišić, iako su kardijalni simptomi bili prisutni kod samo dva bolesnika od 28 ispitanih (81). Ovo ukazuje da je kod BMD bolesnika zahvaćenost srčanog mišića primarna karakteristika (82). Takođe, kod BMD bolesnika mutacije u proksimalnom delu DMD gena praćene su ranijom kardijalnom simptomatologijom, oko 20-te godine života, za razliku od mutacija u distalnom delu gena (83).

Kod trećine DMD/BMD pacijenata prisutan je intelektualni deficit, koji prate kognitivna oštećenja, a prosečan IQ je oko 85. Kod DMD bolesnika nađene su promene u strukturi CNS-a, poremećaj funkcije dendrita, gubitak neurona i promene u EEG-u, kao posledica odsustva distrofina, uz prisustvo neurona koji imaju normalan sadržaj distrofina (84). Takođe, u mozgu su prisutne veće količine jedinjenja koja sadrže holin, što je udruženo sa patološkim procesima u CNS-u.

Žene koje su nosioci mutiranog DMD gena uglavnom su fenotipski zdrave. Ipak, kod manjeg broja (manifestni nosioci), može biti prisutna simptomatologija od strane skeletnih i/ili srčanog mišića, a težina kliničke slike može ići od relativno blage do one sličnoj kod DMD bolesnika. Na osnovu zahvaćenosti skeletne muskulature procenjeno je da su u 5-8% slučajeva žene manifestni nosioci mutacije (85). Međutim, u studiji koja je obuhvatila i izolovane kardiološke slučajeve taj procenat je bio veći - 22% (86). Najčešće je prisutna asimetrična mišićna slabost (82%); sa zahvaćenošću samo gornjih ekstremiteta (41%), samo donjih ekstremiteta (23%), ili i gornjih i donjih ekstremiteta (36%) (86). Serumski nivo keratin-fosfo kinaze je povišen kod 45-70% žena nosioca, i to je najčešće korišćeni parameter za otkrivanje nosioca (87). Mada, serumski nivo i

aktivnost CPK nisu uvek u korelaciji sa promenama u mišićima. Srčane manifestacije kod nosioca, mogu sa javiti udruženo sa skeletnim ili kao izolovane, i to u 55% slučajeva pre 16-te godine, i u 90% slučajeva posle 16-te godine (88). Ranija istraživanja na osnovu imunohistohemijske analize mišićnog distrofina, kod simptomatskih i asimptomatskih nosioca, pokazala su da pojedina mišićna vlakna sadrže distrofin, neka ne sadrže distrofin, a neka vlakna ga imaju u sniženoj koncentraciji. Ipak procenat mišićnih vlakana bez distrofina nije pokazao korelaciju sa težinom manifestacije kod nosioca (89). Novija studija, na osnovu analize obrasca X inaktivacije i transkripcije DMD gena, je pokazala da nema korelacije između fenotipa kod nosioca i nivoa DMD transkripta, odnosno fenotipa i relativne proporcije prisutnog divljeg tipa transkripta, kao i da su ta dva procesa nezavisna (90). Autori, takođe, zaključuju da bi količina prisutnog proteina mogla imati presudan uticaj na fenotip kod žena nosioca.

### ***1.8. Dijagnoza DMD/BMD***

Svaki zaostatak u neuromuskularnom razvoju kod dečaka treba da pobudi sumnju na distrofinopatije, posebno ako postoji pozitivna porodična anamneza. Do kloniranja DMD gena i identifikacije kodiranog proteina, dijagnoza distrofinopatija podrazumevala je kliničke parametre. To uključuje detaljnu ličnu i porodičnu anamnezu i fizikalni pregled: vreme početka bolesti, kašnjenje u motorom razvoju dece (govor, hod), prisustvo slabosti proksimalnih mišića ili pak hipertrofije pojedinih mišića. Zatim, određivanje ukupne aktivnosti kreatin-fosfo kinaze u serumu, kod bolesnika i potencijalnih nosioca. Karakteristične vrednosti CPK su 20-100 puta više od normalnih, mada na početku bolesti mogu biti povećane i do nekoliko hiljada puta. Serumska CPK značajno varira u zavisnosti od telesne aktivnosti bolesnika i progresije bolesti, i ne pokazuje pozitivnu korelaciju sa težinom kliničke slike. Takođe, treba imati u vidu da povišena CPK može biti posledica oštećenja mišića izazvanih nekim drugim uzrokom. Dalje, karakterističan nalaz elektromioneurografije kod bolesnika. Elektromiogram pokazuje znake miopatije, u početku samo na proksimalnim, a kasnije na svim mišićima, uz normalne motorne i senzitivne brzine provođenja u perifernim nervima. Na ovaj način se mogu diferencijalno dijagnostički isključiti neurogene miopatije, s obzirom da distrofinopatije spadaju u grupu oboljenja bez poremećaja centralnog ili

perifernog motoneurona. Zatim, biopsija mišića koja daje uvid u njegovu strukturu. Na histološkom preparatu kod DMD/BMD bolesnika su vidljive varijacije u veličini mišićnih vlakana, sa tipičnim nalazom pojedinačnih ili grupisanih nekrotičnih mišićnih vlakana, kao i deponovanje masti i fibroza mišića u kasnijem stadijumu bolesti. U diferencijalnoj dijagnozi DMD/BMD, jedan od kliničkih parametara je i vezanost ovih bolesnika za invalidska kolica, s obzirom da su DMD bolesnici zavisni od kolica pre 12-te godine života, a BMD bolesnici posle 16-te godine.

### ***1.9. Genetičko testiranje i detekcija nosioca***

Dijagnoza DMD/BMD može biti postavljena analizom samog gena ili analizom njegovog proteinskog produkta. Genska analiza omogućuje direktno ili indirektno otkrivanje mutacija u DMD genu i neophodna je kod svih DMD/BMD bolesnika, čak iako je dijagnoza postavljena imunohistohemijski na mišićnom bioptatu. Genetičko dijagnostičko testiranje se izvodi kod simptomatskih bolesnika, radi potvrde kliničke dijagnoze ili u cilju diferencijalne dijagnoze; kod žena u cilju određivanja statusa prenosioca bolesti; kao prenatalna genetička dijagnostika i preimplantaciona genetička dijagnostika. Za analizu, DNK može biti izolovana iz periferne krvi bolesnika ili nosioca (najčešće limfociti), ili iz uzorka horiona, amnionske tečnosti ili krvi iz pupčanika ploda – kada je u pitanju prenatalna dijagnostika. Metode za uspostavljanje DMD/BMD dijagnoze su:

1. Za velike delecije/duplikacije – multiplex PCR, Q-PCR, MLPA, MAPH, SCAIP, Southern blot analiza
2. Za tačkaste mutacije; male delecije/duplikacije – Next-generation sequencing (NGS), Sanger sekvencioniranje, Resekvencioniranje, Linkage analiza mikrosatelitnim markerima
3. Biopsija mišića i kvalitativna/kvantitativna analiza distrofina u mišićnim ćelijama – Imunohistohemija, Western blot analiza. Kod ženskih nosioca, ova analiza na osnovu mozaičnog prisustva distrofina u mišićima, potvrđuje njihov status.
4. Određivanje statusa nosioca i prenatalno testiranje – MLPA, Linkage analiza i dr.

### 1.9.1. PCR metoda

Grupisanje delecija u predilekcionim regionima DMD gena olakšava njihovo otkrivanje. Metoda Lančane reakcije polimerizacije (engl. – Polymerase chain reaction, PCR), koju su opisali Chamberlain (91;92) i Beggs (93) korišćena je za detekciju parcijalnih delecija u genu za distrofin i analizom samo 19 egzona omogućila je otkrivanje oko 95% svih delecija DMD gena. Ukoliko se analizom obuhvati veći broj egzona moguće je preciznije odrediti veličinu i lokalizaciju mutacije. Uz primenu tri seta prajmera (A, B i C), multipleks PCR reakcija omogućuje analizu 26 egzona u DMD genu. Set A obuhvata egzone: 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51; Set B obuhvata egzone: Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60; i Set C obuhvata egzone: Pb, 16, 32, 34, 41, 42, 49 (92). Na ovaj način detektuje se oko 98% svih delecija, odnosno 65% svih mutacija otkrivenih u DMD genu (94). U osnovi PCR metode je proces selektivnog *in vitro* umnožavanja željenog fragmenta DNK, koji imitira proces replikacije DNK (95;96). Prednost PCR metode je i brzina njenog izvođenja.

Za izvođenje analize, neophodno je poznavanje strukture graničnih regiona željenog segmenta DNK i primena sintetskih jednolančanih oligonukleotida (prajmera), koji su komplementarni ovim regionima. Umnožavanje DNK sekvence se bazira na hibridizaciji specifičnih prajmera i sintezi kopija fragmenta DNK koji je ograničen prajmerima, i to željeni broj puta. PCR protokol za izvođenje PCR reakcije podrazumeva (92;93;97):

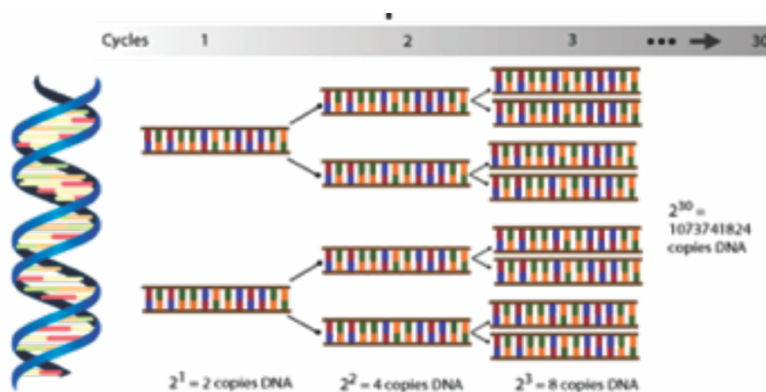
1. DNK-matricu; DNK koja sadrži fragment koji želimo da umnožimo.
2. Prajmere; oligonukleotidne sekvence koje su komplementarne krajevima koji ograničavaju željeni fragment na DNK. Prajmer na 5' kraju ciljne sekvence se naziva uzvodni, a prajmer na 3' kraju nizvodni. Veličina prajmera ima 20-30 nukleotida, a sadržaj guanina i citozina mora biti 45-55%. Tačke topljenja prajmera treba da budu što približnije.
3. Termostabilnu DNK polimerazu (Taq); vrši sintezu novih lanaca DNK, a optimalna temperatura za njenu aktivnost je 72°C. Ovaj enzim ugrađuje nukleotide brzinom od 200 nukleotida /min, a učestalost greške iznosi 1/10<sup>5</sup>.



4. Smešu slobodnih dezoksiribonukleotida (dezoksinukleozid- trifosfat, dNTP); ugrađuju se u nove DNK lance, a koncentracija dNTP mora biti jednaka, da ne bi došlo do ugrađivanja pogrešnih nukleotida. Reakciju katalizuju  $Mg^{+2}$  joni.
5. Pufer; ovaj rastvor sadrži KCl, Tris i  $MgCl_2$ .

Ovako napravljena reakciona smeša stavlja se u aparat Termocycler (PCR uređaj) koji omogućuje odvijanje PCR reakcije. Svaki ciklus se sastoji iz tri faze koje se ponavljaju 20-30 puta (slika 5):

1. Inicijalna denaturacija – zagrevanje smeše na  $94-96^{\circ}C$  dovodi do razdvajanja dvostrukih lanaca DNK matrice. Ova faza traje oko jedan minut.
2. Hibridizacija (engl. Annealing) – hlađenje smeše na  $40-60^{\circ}C$  kada se vezuju prajmeri. Ova faza traje oko 30 sekundi, mada je većim prajmerima potrebno nešto više vremena za vezivanje.
3. Elongacija – zagrevanje smeše na  $72^{\circ}C$  kada Taq polimeraza vrši sintezu DNK fragmenata (5'-3'smer). Dužina ove faze je 1-2 minuta, u zavisnosti od dužine željenog fragmenta.



Slika 8. PCR amplifikacija (preuzeto sa <http://www.zonabiokita.web.id/2015/12/teknik-polymerase-chain-reaction-pcr.html>)

Reakcija je ciklična, a u svakom novom ciklusu kao matrice služe i nosintetisani molekuli DNK. Na kraju čitavog procesa PCR produkt je dovoljne veličine ( $10^6$  kopija; slika 8), a to omogućava njegovu vizuelizaciju i analizu nakon gel-elektroforeze i bojenja.

Kod bolesnika sa delecijom u DMD genu, egzoni koji su u deletiranim regionima se neće umnožiti prilikom PCR reakcije, a njihovo odsustvo će se potvrditi gel elektroforezom. Zbog hemizigotnosti, delecije kod muškaraca se mogu lako otkriti ovom metodom. Međutim, kod žena nosioca, delecije u genu za distrofin bivaju maskirane amplifikacijom normalnog X hromozoma, pa ova metoda nije od koristi. Takođe, PCR metoda ne otkriva delecije koje su van predilekcionih regiona u DMD genu, kao ni duplikacije, kod probanada i ženskih nosioca. U ovu svrhu su korišćene metode Southern blotting, qPCR (engl. quantitative Polymerase chain reaction) i MAPH (engl. Multiplex amplification and probe hybridization), ali su se pokazale komplikovane za izvođenje u svakodnevnoj praksi (98).

### *1.9.2. MLPA metoda*

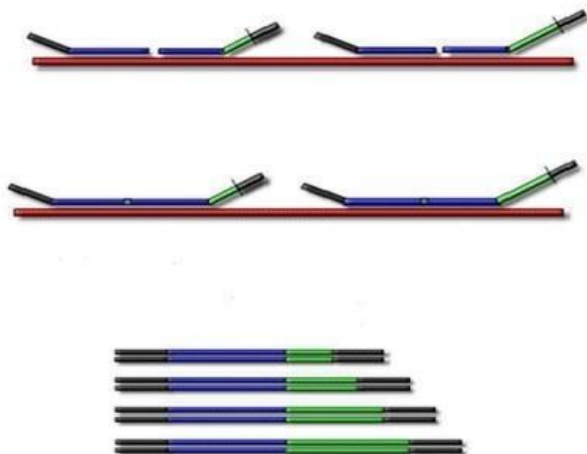
Noviji pristup u otkrivanju mutacija u genu za distrofin je metoda višestrukog umnožavanja vezanih proba (engl. Multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). Ova metoda je prvi put opisana 2002. godine, sa svrhom kvantitativne analize (99). MLPA metoda omogućuje analizu svih 79 egzona DMD gena (100), i otkriva delecije koje su van "vrućih mesta" u genu, kao i duplikacije, kod probanada i ženskih nosioca. MLPA metoda se temelji na PCR reakciji, kombinujući hibridizaciju specifičnih proba i amplifikaciju ciljnih sekvenci putem umnožavanja proba sa kojima hibridizuju. Za odvijanje procesa amplifikacije dovoljna su dva PCR prajmera. MLPA metodom je moguće istovremeno analizirati do 96 različitih uzoraka, a rezultati se dobijaju za 24 sata.

MLPA metodu čini 5 koraka (MLPA protokol, MRC-Holland) (101):

1. Denaturacija DNK zagrevanjem (5min. na 98°C) i hibridizacija MLPA sondi (dodaje se SALSA miks sondi i MLPA pufer, inkubira se 1 min. na 95°C, a zatim, a narednih 16 sati odvija se hibridizacija na 60°C);
2. Reakcija ligacije; dodaje se smeša ligaze i vrši inkubacija na temperature 54°C, 15 minuta, a zatim se smeša zagreva 5 min. na 98°C, da bi se inaktivirao enzim ligaza;
3. PCR reakcija; dodaju se prajmeri, dezoksiribonukleotidi (dNTP) i enzim polimeraza;

4. Odvajanje proizvoda amplifikacije kapilarnom elektroforezom;
5. Analiza podataka na osnovu relativne visine fluorescentnih vrhova (pikova).

Svaka MLPA proba (sonda) sastoji se od dva oligonukleotida, čiji je zadatak da hibridizuju sa susednim ciljnim sekvencama. Jedan oligonukleotid na 3' kraju sadrži sekvencu komplementarnu specifičnoj ciljnoj sekvenci, dok na 5' kraju sadrži sekvencu koja je zajednička za sve MLPA probe i komplementarna je fluorescentno obeleženom PCR prajmeru. Drugi oligonukleotid na 5' kraju ima sekvencu komplementarnu specifičnoj ciljnoj sekvenci, a na 3' kraju sadrži sekvencu koja je zajednička za sve MLPA probe i komplementarna je neobeleženom prajmeru. Između ova dva kraja nalaze se popunjavajuće ili "stuffer" sekvence različite dužine. Ovakav model omogućuje istovremenu amplifikaciju i do 50 različitih MLPA proba, korišćenjem jednog para prajmera. Sam proces najpre podrazumeva denaturaciju DNK uzorka u koji se dodaje smeša MLPA sonde. Kada hibridizuju oba dela MLPA sonde sa susednim ciljnim sekvencama DNK uzorka, omogućena je ligacija leve i desne strane sonde enzimom, nakon čega sledi umnožavanje proba PCR reakcijom (slika 9). Sve ligirane sonde se istovremeno amplifikuju pomoću istog para PCR prajmera. Kao rezultat toga nastaju produkti dužine 100 – 500 nukleotida, koji sadrže sekvence od interesa različitih dužina. Fluorescentno označeni PCR prajmer omogućuje vizuelizaciju proizvoda tokom razdvajanja fragmenata na osnovu njihovih dužina.



Slika 9. Mlpa metoda: 1. Hibridizacija 2. Ligacija 3. PCR reakcija (preuzeto sa [http://healthdocbox.com/Autism\\_and\\_Pdd/67122050-Varijacije-u-broju-kopija.html](http://healthdocbox.com/Autism_and_Pdd/67122050-Varijacije-u-broju-kopija.html))

Fragmenti dobijeni PCR reakcijom se identifikuju i kvantifikuju kapilarnom elektroforezom, na aparatima ABI Thermal Cycler Verity i ABI 35000 Genetic Analyser (Applied Biosystems, California, SAD)(102). Takođe, amplifikovani produkti mogu biti analizirani i elektroforezom na agaroznom gelu sa sledstvenim bojenjem etidijum bromidom, pri čemu treba voditi računa o primeni individualnih setova (MRC-Holland) (101). Za softversku obradu podataka koristi se program Coffalyser (MRC-Holland) (101). Sledeći važan korak je interpretacija dobijenih rezultata koja se zasniva na upoređivanju dobijenih vrhova (pikova) u uzorku, u odnosu na referentne uzorke. Kod hemizigotnih delecija interpretacija je lakša jer su jasno vidljiva smanjnja visine vrha, dok se kod heterozigotnih duplikacija i delecija stvaraju pikovi različite visine što otežava njihovu interpretaciju. Zbog toga proizvođač preporučuje po tri kontrole za svaku seriju od 5 uzoraka.

Ograničenja MLPA metode ogledaju se u nemogućnosti otkrivanja tačkastih mutacija, većine inverzija, balansiranih translokacija, kao i promena koje leže izvan sekvence detektovane MLPA sandom. Lažno negativni ili lažno pozitivni rezultati mogu biti posledica kontaminacije uzorka, korišćenja nekvalitetnih preparata, nedovoljne količina DNK, upotrebe neadekvatnih uzoraka, i dr.

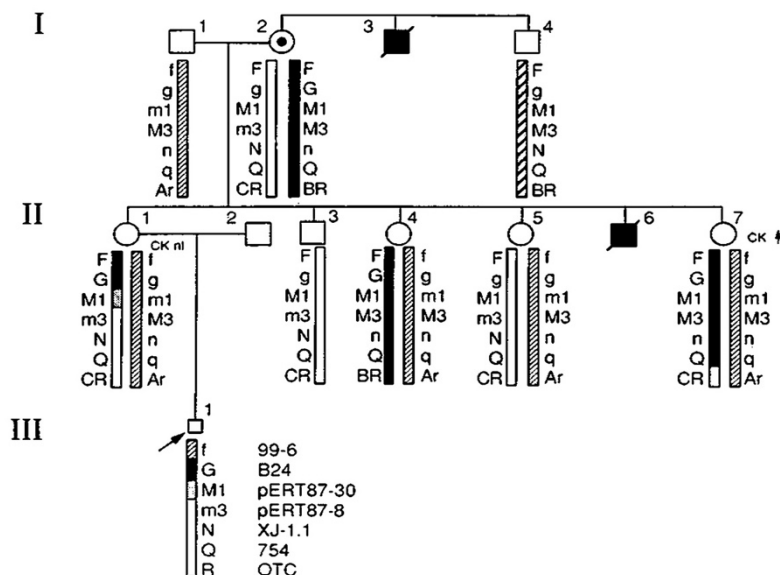
### *1.9.3. Analiza vezanosti (Linkage analiza)*

Ukoliko se standardnim metodama ne otkriju delecije i duplikacije u DMD genu, traga se za tačkastim mutacijama. Metoda izbora je sekvenciranje DNK kojom se određuje tačan redosled nukleotida u molekulu DNK, tj. njegova primarna struktura. Međutim, zbog izuzetne veličine DMD gena i slučajnog rasporeda tačkastih mutacija, kod sumnje na ovaj tip promena još uvek je aktuelna indirektna molekularno genetička dijagnostika. Analiza vezanosti (engl. linkage analysis) je indirektna dijagnostička metoda koja podrazumeva praćenje nasleđivanja određenih polimorfnih DNK markera koji se nalaze u okviru DMD gena, ili u njegovoj blizini (slika 10) (103). Genetički polimorfizam podrazumeva alelske varijante koje se javljaju stabilno u populaciji u učestalosti koja je dovoljno velika da se ne smatra samo proizvodom mutacionog procesa i generalno je veća od 1% (104). To su varijabilni regioni koji se nalaze i u genomu zdravih ljudi, a javljaju se u dve ili više različitih formi (i do 70). Polimorfni DNK markeri koji su međusobno blisko postavljeni na istom hromozomu, nasleđivaće se zajedno (engl.

genetic linkage). Ranije su kao DNK markeri korišćene varijabilne forme koje utiču na promenu restrikcionog mesta (ukida postojeće ili kreira novo restrikciono mesto), što rezultuje restrikcionim fragmenatima različite dužine (engl. restriction fragments length polymorphism, RFLPs). Danas su u upotrebi mnogo informativniji i pouzdaniji genetički markeri, tzv. mikrosateliti. Mikrosatelitnu DNK čine kratki tandemski ponovci koji su rasprostranjeni širom humanog genoma. Građeni su od uzastopno ponavljajućih sekvenci dužine 2-4 parova nukleotida (engl. short tandem repeats, STR) i pokazuju visok stepen polimorfizma dužine, što je moguće ispitati primenom PCR tehnike. Minisateliti su ponavljajuće sekvence dužine od 5 do nekoliko destina baznih parova (engl. variable number of tandem repeats, VNTRs). Savremeni tip DNK markera su i polimorfizmi u jednom nukleotidu (engl. single nucleotide polymorphism, SNP), do kojih se došlo na osnovu saznanja da je u genomu čoveka svaki hiljaditi nukleotid polimorfan, tj. da se razlikuje između dva lokusa na homologim hromozomima, kod različitih osoba, ali i kod jedne iste osobe.

U okviru DMD gena, kao i u njegovoj blizini, otkriveno je više dinukleotidnih mikrosatelitnih polimorfnih regiona, uglavnom CA ponovaka (engl. VNTR CA-repeats), koji se mogu analizirati PCR metodom (105;106). Npr. DXS1238 sa lokalizacijom u intronu 44 DMD gena, DXS1237 lokalizovan u intronu 45, i drugi (Leiden muscular Dystrophy pages, dostupno na [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) (107). Zbog čestih rekombinacija unutar DMD gena potrebno je kombinovanje više markera, kako bi se povećala pouzdanost zaključivanja. Prilikom indirektno analize, najpre se utvrdi koju formu markera ima obolela osoba, a zatim se praćenjem tog markera u porodici indirektno zaključuje da li je član porodice nasledio mutaciju u DMD genu ili nije. Alelski status datog markera određuje se nakon PCR amplifikacije i razdvajanja PCR produkata putem gel elektroforeze. Indirektna analiza se može primeniti i za određivanje statusa prenosioca mutacije. Takođe, mogu se otkriti žene prenosioci delecije na osnovu gubitka heterozigotnosti u deletiranom regionu. Indirektna analiza se koristi i u prenatalnoj dijagnozi, utvrđivanju očinstva, i prilikom isključivanja mogućnosti kontaminacije horiona majčinim tkivom. Prednost analize vezanosti je što ne zahteva poznavanje tipa mutacije, već je dovoljno znati odgovorni lokus. Ipak, ova analiza ima ograničenja zbog mogućih rekombinacija kojim dolazi do razdvajanja markera i gena sa kojim je blisko vezan, ili rekombinacije unutar analiziranog regiona,

ograničene informativnosti markera, a i zahteva veći broj članova porodice za analizu (103). Ipak, u cilju definisanja preciznog mesta i prirode mutacije, potrebno je izvršiti sekvenciranje regiona od interesa.



Slika 10. Prikaz praćenja nasleđivanja DNA markera kod DMD (modifikovano prema Darras i sar., 1987) (103)

### 1.10. Genetičko savetovanje i prenatalna dijagnoza

Davanje genetičkog saveta bazira se na postavljenoj genskoj dijagnozi i/ili tumačenju porodične istorije (rodoslov) ili medicinske dokumentacije, kako bi se procenio rizik ponovnog javljanja bolesti u porodici. Kod X vezanih recesivnih bolesti, kao što su DMD/BMD, značajna je primena molekularno-genetičkih testova u otkrivanju žena koje su fenotipski zdravi prenosioci mutacije. Osim informacija o načinu nasleđivanja bolesti i mogućim rizicima, genetički savet podrazumeva i davanje instrukcija u daljem testiranju i mogućnostima prevencije, kao što je prenatalna dijagnoza. Ovaj proces podrazumeva i psihološku podršku pojedincu ili porodicama u razumevanju i prihvatanju bolesti, mogućim izborima, kao i davanje smernica u daljem odlučivanju.

Pre nego što je omogućena DNK analiza, prenatalna dijagnoza kod Dišenove mišićne distrofije bazirala se isključivo na utvrđivanju pola kod ploda (108). Indirektna analiza praćenjem polimorfni markera omogućila je preciznije predviđanje rizika u prenošenju mutiranog gena i davanje genetičkog saveta. Međutim, čak i kada se utvrdi da fetalna

DNK poseduje isti haplotip kao proband, fetus ne mora biti pogođen ukoliko je mutacija kod probanda bila sporadična. Stoga je neophodno da se prisustvo mutacije prethodno ispita kod majke. Ako se kod majke ne utvrdi mutacija u somatskim ćelijama, rizik oboljevanja ploda je mali, ali i dalje ostaje mogućnost da majka ima gonadni mozaicizam (74;75). Majka koja nema potvrđenu somatsku mutaciju, a ima više od jednog zahvaćenog deteta, ima veći rizik za gonadni mozaicizam. U tom slučaju, u svakoj narednoj trudnoći treba predložiti prenatalno genetičko testiranje, s obzirom da je rizik kod gonadnog mozaicizma nepredvidiv i zavisi od veličine mutiranog klona. Svakako, najpouzdanija dijagnostička metoda je direktna genska analiza kod ploda. U prenatalnoj dijagnozi, prvi korak je utvrđivanje pola deteta (citogenetička analiza, FISH ili PCR-om) i ako je plod muški, sprovodi se direktna ili indirektna detekcija mutacije. Kod ženskog ploda direktna ili indirektna genska analiza može se vršiti u ciju utvrđivanja statusa nosioca.

Gen za distrofin, zbog svoje ekstremne veličine, pokazuje visoku stopu rekombinacija i spontanih mutacija, sa varijabilnošću u veličini, lokalizaciji i tipu mutacija. Iz tog razloga genska dijagnoza je veoma kompleksna. Kod sumnje na DMD/BMD, genetičko testiranje se savetuje kao metoda izbora jer je postupak minimalno invazivan, a omogućuje uspostavljanje dijagnoze i davanje genetičkog saveta. PCR metoda je važna kod detekcije parcijalnih delecija u predilekcionim regionima u DMD genu. MLPA metoda omogućuje otkrivanje delecija koje nisu u predilekcionim regionima, kao i otkrivanje duplikacija, ali i utvrđivanje statusa nosioca kod ženskih članova u porodici. Ukoliko se ovim metodama ne otkrije mutacija, pristupa se sekvenciranju gena. Ako se ni tada ne uspostavi genska dijagnoza, preuzima se biopsija mišića. Biopsija mišića, iako invazivna, primenjuje se kod nejasnih DMD/BMD slučajeva kada je potrebna imunohistohemijska analiza prisustva distrofina u ćelijama.

### ***1.11. Genska terapija kod DMD/BMD bolesnika***

Mutacije u DMD genu remete sintezu proteina distrofina. U zavisnosti od prirode, mutacije vode težoj DMD formi bolesti, koja pokazuje veoma male koncentracije nefunkcionalnog distrofina ili odsustvo distrofina u mišićima, ili srednje teškom BMD obliku kod koga je distrofin kvantitativno i/ili kvalitativno izmenjen (35;54). Većina dečaka sa DMD/BMD se retko dijagnostikuje u presimptomatskoj fazi, osim ukoliko ne

postoji pozitivna familijarna anamneza, pa se kod članova porodice ciljano traga za dijagnozom. Uz razvoj kliničke slike, vrednosti CPK su važan klinički parametar, međutim nivo CPK u serumu bolesnika nije uvek proporcionalan težini kliničke slike. Za sada nema uspešne terapije Dišenove i Bekerove mišićne distrofije, a kompleksna klinička slika ovih bolesnika zahteva multidisciplinarni pristup u lečenju (neurolog, ortoped, kardiolog, pulmolog, psihijatar, fizijatar, defektolog, nutricionist, socijalni radnik). Primenjuje se terapija kortikosteroidima, koje je najbolje uvesti između 4 i 6-te godine života, kada motorne funkcije deteta stagniraju. Međutim, sa napredovanjem bolesti slabost skeletne, respiratorne i kardijalne muskulature zahteva i druge, različite oblike terapije i podrške.

Molekularno-genetički pristup u lečenju DMD/BMD, odnosno genska terapija, podrazumeva više metoda. Jedna od njih jeste primena skraćenog, mikro-DMD gena, koji se unosi u ćeliju bolesnika putem vektora (plazmid ili adeno virus) tehnikom rekombinantne DNK, sa ciljem da ćelije domaćina počnu da proizvode skraćeni, ali delimično funkcionalni distrofin, kao što se viđa kod BMD bolesnika (109;110). Različite studije pokazuju uspešnost ove terapije kod 25-52% mišićnih vlakana koji su pokazali ekspresiju distrofina nakon godinu dana (111;112). Novije studije govore u prilog ovakvom tipu terapije uz mogućnost sigurnije i preciznije isporuke mikro-gena, čime se smanjuju sistemski efekti (113). Takođe, eksperimentalne studije na miševima koje kombinuju dve terapije, mikro-DMD gen terapija i terapija folistatinom koji je inhibitor miostatina, za sada su pokazale poboljšanje u regeneraciji mišića, ali ipak nedovoljno za potpuno obnavljanje mišićne snage (114).

Transplantacija mioblasta u pojedine skeletne mišiće pokazala je ograničene rezultate zbog imunološkog odgovora domaćina i kratkog preživljavanja transplanitiranih ćelija (115). Terapija matičnim ćelijama pokazala je veću efikasnost nego transplantacija mioblastima. Nakon intra-arterijske inekcije matične ćelije se prenose u mišićno tkivo, imunološki su povlašćene, duže opstaju, pa se i očekuje da imaju ulogu u regeneraciji oštećenih mišićnih vlakana i stvaranju distrofina (116). Takođe, u mišiću je nedavno potvrđeno prisustvo adultnih matičnih ćelija (satelitne ćelije) koje mogu, sa različitim potencijalom, diferencirati u osteoblaste, adipocite i hondrocite. Drugi tip adultnih matičnih ćelija (engl. muscle-derived stem cells, MDSCs) takođe pokazuju veliki potencijal u regeneraciji mišića, kostiju i hrskavice. Dalji razvoj, u smislu određivanja



faktora koji regulišu proces proliferacije i diferencijacije matičnih ćelija u mišiću, omogućilo bi i veću iskoristivost ovih ćelija (116).

Egzon-skiping terapija se takođe pokazala uspešnom. U osnovi, cilj terapije je prevođenje DMD bolesnika u BMD bolesnika (117). Terapija preskakanjem egzona vodi ponovnom uspostavljanju okvira čitanja, i sintezi skraćenog, ali funkcionalnog distrofina, kako je uočeno kod BMD bolesnika. Za isključivanje segmenta koji sadrži prevremeni stop kodon na iRNK i preusmeravanje okvira čitanja, kako bi se ipak sintetisao funkcionalni distrofin, koriste se antisens oligonukleotidi (AO). AO se mogu koristiti za preskakanje svih pojedinačnih egzona osim prvog i poslednjeg egzona. Ipak, ova terapija još uvek ima ograničenja. AO nisu u mogućnosti da prođu plazmatsku membranu bez pomoći, nestabilni su zbog osetljivosti na dejstvo nukleaza, i ne pokazuju tkivnu specifičnost (118). Kako veliki broj pacijenata ima delecije lokalizovane u dvema vrućim tačkama u genu, to bi preskakanje malog broja egzona bilo primenjivo na veliki broj pacijenata. Na osnovu baze podataka o mutacijama koje su do sada otkrivene u DMD genu, terapija preskakanja jednog ili dva egzona bi se primenila kod 79% delecija, 91% malih mutacija i 73% duplikacija (119). Npr. preskakanje egzona 51 bi se primenjivalo kod 10% DMD bolesnika.

Ipak, najperspektivnijom se čini tehnologija uređivanja gena (engl. gene editing therapy) koja koristi sintetičke nukleaze za ciljanu modifikaciju u genskim lokusima, koristeći endogene mehanizme popravke ćelijskih DNK (120;121). Ovaj vid terapije primenjen je u eksperimentalnim uslovima u cilju rekonstrukcije okvira čitanja kod promena u DMD genu. Sistem za reparaciju gena čini (CRISPR)/Cas9 kombinovan sa usmerenom RNK, koji se uvodi u ćeliju putem vektora (adeno virus) gde RNK vodič prepoznaje ciljani egzon, a Cas9 ga iseca, preusmeravajući okvir čitanja genetičke šifre. Kao rezultat nastaje skraćeni, ali funkcionalni oblik distrofina, što je u eksperimentalnim uslovima dalo bolju funkciju skeletnih i srčanog mišića (122). Lattanzi i sar. (123), koristeći (CRISPR)/Cas9 sa specifičnom usmerenom RNK ukazuju da se ovaj princip terapije može primeniti i kod duplikacija jednog egzona, kao što je egzon 2, sa ciljanim uklanjanjem dupliranog regiona.

## ***2. Ciljevi rada***

---

U doktorskoj tezi postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Analizirati mutacije dobijene kod probanada.
2. U slučajevima sa dokazanim delecijama i duplikacijama kod probanda, analizirati status prenosioca kod majke, sestara i drugih ženskih srodnika.
3. Odrediti stopu novih mutacija, kao i stopu germinativnog mozaicizma za delecije i duplikacije u DMD genu u našoj populaciji.
4. U slučajevima bez dokazanih delecija i duplikacija kod probanda ispitati mogućnost indirektno genetičke analize za određivanje statusa prenosioca.
5. U indikovanim slučajevima izvršiti prenatalnu molekularno genetičku analizu DMD gena, primenom adekvatne metode za datu porodicu.
6. Na osnovu dobijenih podataka formirati preporuke za prenatalno i postnatalno genetičko testiranje DMD/BMD u našoj sredini.

### ***3. Materijal i metode***

---

### ***3.1. Ispitanici***

Istraživanje je obuhvatilo 72 DMD/BMD probanda, 69 ženskih članova iz 44 porodice probanada i 11 trudnica (15 trudnoća) u periodu 2000-2015. godine, a za koje je molekularno genetička analiza DMD gena kod probanda obavljena na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu i na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu. Izrada studije je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu.

Uzorak su činila 72 DMD/BMD probanda, i to 64 nesrodna bolesnika, dok su u 4 slučaja bila ispitana po dva rođena brata (N=8). Kriterijumi za odabir ispitanika bili su anamnestički podaci, klinička slika (progresivna mišićna slabost proksimalnog tipa), EMG nalaz, biohemijski profil (hiper CPK-emija) i eventualna prethodna genetička testiranja.

Radi utvrđivanja statusa ženskih nosioca mutacije u DMD genu, ispitivanje je bilo sprovedeno kod 69 ženskih članova u 44 porodice probanada. Ispitivanje je obuhvatilo 40 majki probanada, 17 sestara probanada (15 rođenih i 2 sestre po majci), 2 ćerke (gde je otac bio proband), 3 sestričine (gde je ujak bio proband), 4 tetke (majčine sestre) i jednu baku (po majci), a za 2 ženska člana podatak o srodstvu nije bio validan (kod porodice je rađena analiza vezanosti, ali je marker bio neinformativan).

Takođe, u 11 slučajeva (15 trudnoća) je bila indikovana prenatalna molekularno genetička DMD/BMD dijagnostika. Za 12 trudnoća urađena je direktna genska analiza, a kod tri trudnoće je primenjena indirektna analiza gena (linkage analiza).

Ukupno je bilo analizirano 156 uzoraka DNK.

### ***3.2. Primenjene metode***

Od metoda za detekciju delecija i duplikacija u DMD genu kod probanda primenjene su metoda lančane reakcije polimeraze (multipleks PCR) i metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (MLPA); za detekciju ženskih nosioca primenjena je MLPA metoda, kao i indirektna detekcija nosilaca mutacije analizom vezanosti (linkage analiza); za prenatalnu dijagnozu primenjene su PCR metoda, linkage analiza i MLPA metoda.

Genomska DNK za analizu je izolovana iz limfocita periferne (venske) krvi ispitanika metodom isoljavanja prema standardnoj proceduri (124), a određivanje koncentracije DNK je vršeno spektrofotometrijski na aparatu BioPhotometer. Za prenatalnu dijagnozu DNK je bila izolovana iz uzorka horionskih resica, plodove vode ili krvi pupčanika ploda, primenom komercijalnog kita (Qiagen DNA mini kit).

### 3.2.1. Izolacija DNK

Genomska DNK iz prikupljenih bioloških uzoraka izolovana je metodom isoljavanja prema sledećoj proceduri (modifikovano po Miller i sar.) (124):

1. Podeliti 10 ml pune krvi (u 10 mM EDTA, pH 8) u dve epruvete.
2. Dodati po 5 ml pufera za lizu (0.32 M saharoza, 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>).
3. Promešati i držati na ledu 10-15 minuta.
4. Centrifugirati na 3000 rpm, 15 minuta (uočava se ružičast talog).
5. Supernatant odliti i pomešati talog iz obe epruvete.
6. Isprati talog 2-3 puta fiziološkim puferom (0.075 M NaCl, 0.025 M EDTA pH 8), dok talog ne bude potpuno beo. Zatim: dodati 5 ml fiziološkog pufera, resuspendovati i centrifugirati na 3000 rpm, 10-15 minuta.
7. Supernatant odliti i talog resuspendovati u 3 ml pufera A (10 mM Tris HCl pH 8, 400 mL NaCl, 2 mM EDTA).
8. Dodati 200 µl 10% SDS.
9. Dodati 20 µl proteinaze K (1 mg/ml).
10. Inkubirati preko noći u termostatu na 37°C.
11. Dodati 1ml saturisanog 6M NaCl i mućkati 15 sekundi (zamuti se i pobeli).
12. Proteini se talože centrifugiranjem na 3000 rpm, 15 minuta.
13. Supernatant preneti u čiste epruvete i centrifugirati na 4000 rpm, 10 minuta.
14. Supernatant preneti u čiste epruvete i dodati jednu zapreminu izopropanola na sobnoj temperaturi.
15. DNK se taloži u vidu niti, koje bivaju zahvaćene zakrivljenom Paster-pipetom.
16. Potopiti niti DNK 30 sekundi u 1 ml 70% etanola (-20 °C).
17. Resuspendovati DNK u 500 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) i ostaviti da se rastvori preko noći.

### 3.2.2. Multipleks PCR analiza

Multipleks PCR metoda podrazumeva amplifikaciju više različitih sekvenci iz istog uzorka i u istoj reakciji. U našem uzorku, ovom metodom, analizirano je 26 egzona gena za distrofin u tri odvojene multipleks PCR reakcije, primenom tri seta prajmera: A, B i C (92). U reakciji A istovremeno se umnožava 10 egzona, egzoni 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48, 51, u reakciji B, 9 egzona, egzoni Pm, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60, a u reakciji C, 7 egzona, egzoni Pb, 16, 32, 34, 41, 42, 49. Primenom ova tri testa moguće je otkriti 98% delecija u genu za distrofin, a koje leže u predilekcionim regionima DMD gena.

Kod jedne grupe ispitanika prisustvo mutacije u DMD genu utvrđeno je multipleks PCR reakcijom, na PCR uređaju 2720 Thermal Cycler, a analiza PCR produkata izvršena je gel elektroforezom.

PCR reakcija se izvodi u finalnoj zapremini od 25 µl i sadrži:

- 3 µl 10x PCR pufera (500 mM KCl, 100 mM TRIS HCl pH 8.3 na sobnoj temperaturi, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% želatin)
- 0,5 µl dNTP
- 5 µl smeše prajmera
- 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>
- 0,75 µl Taq polimeraze (Recombinant Taq, Fermentas)
- 2 µl genomske DNK
- redestilovane vode do finalnog volumena od 25 µl

Temperaturni profil za PCR reakciju je sledeći:

1. Početna denaturacija – 3 minuta na 95°C
2. 25 ciklusa:
  - Denaturacija – 3 minuta na 95°C
  - Hibridizacija – 30 sekundi na 94°C
  - Ekstenzija – 4 minuta na 65°C
3. Finalna ekstenzija – 7 min na 65°C
4. Uzorci se čuvaju na 4°C do analize

### 3.2.3. Gel elektroforeza

Radi provere uspešnosti amplifikacije željenih produkata PCR metodom, amplifikati su proveravani elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza je vršena u 1x TBE puferu, pri konstantnom naponu od 230 V i jačini struje od 30mA, tokom sat vremena.

Sastav poliakrilamidnog gela:

- 2 ml 40 % rastvora smeše akrilamid – bisakrilamid
- 2 ml 5x TBE
- 6 ml H<sub>2</sub>O
- 70 µl amonijum persulfata (APS)
- 13 µl N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina (TEMED)

TBE (Tris, borna kiselina i EDTA) deluje kao pufer, APS (NH<sub>4</sub> persulfat) ima funkciju katalizatora, dok TEMED inicira polimerizaciju.

Za vizualizaciju PCR produkata na gelu je korišćen 1% rastvor etidijum bromida (EtBr), a gelovi su prosvetljivani na UV transiluminatoru i slikani fotoaparatom. Interkaliranjem molekula EtBr između baza DNK, polinukleotidni fragmenti postaju vidljivi pod UV transiluminatorom kao ljubičaste trake.

### 3.2.4. MLPA analiza

Za izvođenje MLPA analize korišćena su dva SALSA MLPA kita, P034 i P035 (MRC-Holland, Holandija) (101). Analiza je sprovedena na aparatima ABI Thermal Cycler Verity i ABI 3500 Genetic Analyser. Softverska obrada podataka obavljena je primenom programa Coffalyser.Net. (101).

SALSA MLPA kit sadrži:

1. SALSA MLPA Pufer (5×180 µl): KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, oligonukleotid.
2. SALSA Ligaza-65 (5×115 µl): Glicerol, EDTA, Beta-Merkaptoetanol, KCl, Tris-HCl, nejonski deterdžent, enzim Ligaza-65 (iz bakterije).
3. Ligaza Pufer A (5×360 µl): Koenzim NAD (iz bakterije).



4. Ligaza Pufer B (5×360 µl): Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, nejonski deterdžent.
5. SALSA PCR Prajmer Miks (5×240 µl): Sintetički oligonukleotidi sa fluorescentnom bojom (FAM ili Cy5), dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, nejonski deterdžent.
6. SALSA Polimeraza (5×65 µl): Glicerol, nejonski deterdženti, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCl, enzim polimeraza (iz bakterije).

Genomska DNK je izolovana metodom isolvavanja, na prethodno opisani način. Za analizu se koristi ukupna količina od 50-250 ng (poželjno 50-100 ng) genomske DNK u volumenu od 5 µl za svaku MLPA reakciju. Prilikom testiranja više od 21 uzorka potrebna su najmanje 3 referentna uzorka, tj. sekvence koje imaju normalni broj kopija, dobijena od zdravih osoba.

Izvođenje MLPA analize podrazumeva (protokol je dostupan na [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) (101):

1. Denaturacija DNK (prvi dan):
  - a. Označiti 0,2 ml na epruveti.
  - b. Dodati 5 µl uzorka DNK (50-250 ng, 50-100 ng je optimalano) u svaku epruvetu.
  - c. Postaviti epruvete u PCR uređaj i započeti MLPA program.
  - d. Denaturacija DNK uzoraka, 5 min na 98°C.
  - e. Hlađenje uzoraka do 25°C, pre uklanjanja epruveta iz PCR uređaja. Pauza.
2. Reakcija hibridizacije (drugi dan):
 

Vorteksovati MLPA pufer i MLPA smešu proba pre upotrebe.

  - a. Pripremiti glavnu mešavinu za hibridizaciju, za svaku reakciju: 1,5 µl pufera MLPA + 1,5 µl smeše proba. Smešu za hibridizaciju dobro promešati pipetiranjem ili vorteksom.
  - b. Nakon denaturacije DNK, dodajte 3 µl glavne mešavine za hibridizaciju u svaku epruvetu uzorka. Dobro izmešati pipetiranjem.
  - c. Nastaviti program inkubacijom 1 min na 95°C, a zatim 16-20 sati na 6°C. Pauza.
3. Reakcija ligacije sonde (drugi dan):
  - a. Vorteksovati dva Ligaza Pufera pre upotrebe.



svetlost, pa je potrebno čuvati PCR proizvode u tamnoj kutiji ili umotane u aluminijumsku foliju.

### 3.2.5. Kvantifikacija PCR produkata kapilarnom elektroforezom

Produkti nakon MLPA reakcije su razdvojeni kapilarnom elektroforezom na aparatu ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems International Inc., Foster City, Kalifornija, SAD) (102):

- a. 0.7 µl PCR produkta
- b. 0.3 µl (ROKS) ili 0,2 µl (LIZ) GS 500 standard
- c. 9 µl HiDi formamida
- d. Sipati u ležišta na ploči i zagrevati 3 min na 86°C, radi denaturacije, a zatim hladiti 2 min na 4°C (u ledu).

Analiza fragmenata u aparatu:

- a. Napon ubrizgavanja: 1.6 kV
- b. Vreme ubrizgavanja: 15 sek.
- c. Radni napon: 15 kV
- d. Vreme rada: 1800 s
- e. Temperatura pećnice: 60°C
- f. Polimer: POP4 ili POP7

Za softversku obradu podataka korišćen je program koji preporučuje proizvođač - Coffalyser (MRC – Holland, [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)) (101). Interpretacija dobijenih rezultata vršena je na bazi upoređivanja dobijenih fluorescentnih vrhova (pikova) unutar svakog uzorka, u odnosu na referentne uzorke. Kod hemizigotnih delecija interpretacija je lakša jer su jasno vidljiva smanjenja visine vrha, dok se kod heterozigotnih duplikacija i delecija stvaraju pikovi različite visine što otežava njihovu interpretaciju.

### 3.2.6. Linkage analiza

Za analizu vezanosti je korišćeno 6 mikrosatelitnih markera – 3'DYS (DXS1234), 5'DYS-II (DXS1242), STR44 (DXS1238), STR45 (DXS1237), STR49 (DXS1236), STR50 (DXS1235) i dva RFLPs markera pERT87-8taqI i pERT87-15taqI (Tabela 1).

Alelski status markera utvrđen je nakon PCR amplifikacije na aparatu ABI 9700 Thermal Cycler. Za umnožavanje izabranih STR markera korišćene su prajmeri čije su sekvence prikazane u Tabeli 1. Temperaturni profil za amplifikaciju STR markera je uključivao 5 minuta inicijalne denaturacije na 95°C, praćenu sa 40 ciklusa na 94°C 30sec, hibridizacije prajmera i elongacije koje su se odvijale na 50-60°C i 72°C u trajanju od po 30sec, redom. Razdvajanje PCR produkata je izvršeno vertikalnom gel elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu, pri jačini struje od 20mA i naponu 150V u trajanju od dva i po sata. Po završenoj elektroforezi, poliakrilamidni gel je bojen 1% rastvorom etidijum bromida i prosvetljavanjem gela na UV transiluminatoru. Amplifikovani STR markeri su vizualizovani prisustvom traka na poliakrilamidnom gelu odgovarajuće molekulske veličine, određene na osnovu poređenja sa DNK standardom (100bp Lader, Thermo Scientific, SAD).

Analiza RFLP markera je uključivala umnožavanje ciljanih regiona DMD gena korišćenjem prajmera odgovarajućih sekvenci (Tabela 1.), praćeno restrikcijom digestijom sa odgovarajućom restrikcijom endonukleazom. PCR reakcija se odvijala pri temperaturi od 95°C u trajanju od 5min u fazi inicijalne denaturacije, praćene sa 40 ciklusa na 94°C 30sec, hibridizacije prajmera na 60°C u trajanju od 30sec i elongacije na 72°C 30sec. Za restrikcijonu digestiju PCR amplifikata je pripremana smeša koja je sadržala 10µL PCR amplifikata, 2µl pufera, 18µl dH<sub>2</sub>O i 0.5 µl TaqI restrikcijonog enzima (Thermo Scientific, SAD). Inkubacija je vršena preko noći, u vodenom kupatilu na temperaturi od 65°C. Digestovani produkti su razdvajani prema veličini vertikalnom gel elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu, pri jačini struje 20mA i naponu 150V i u trajanju od sat i po vremena. Veličina restrikovanih fragmenata je utvrđivana na osnovu poređenja sa DNK standardom (100bp Lader, Thermo Scientific, SAD).

Tabela 1. Lokacija markera i sekvence prajmera korišćeni u analizi vezanosti  
(dostupno na [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) (107)

<i>Marker</i>	<i>Lokalizacija u DMD genu</i>	<i>Forward i reverse prajmeri</i>
STR44 (DXS 1238)	Intron 44	tccaacattggaaatcacatttcaa/ tcatcacaatagatgtttcacag
STR45 (DXS1237)	Intron 45	gaggctataattctttaactttggc/ ctctttccctctttattcatgttac
STR49 (DXS 1236)	Intron 49	cgtttaccagctcaaaatctcaac/ catatgatacgattcgtgtttgc
STR50 (DXS 1235)	Intron 50	aaggttcctccagtaacagatttg/ tatgctacatagtatgtcctcagac
5'DYS-II (DXS 1242)	5' Dp427c promotor	tcttgatatataggattattgtgtttgttatac/ attatgaaactataaggaataactcatttagc
3'DYS (DXS 1234)	Egzon 79	gttgtttataaaaaccctaaaaacaaaac/ ggatgcaaaacaatgcgctgcctca
pERT87-8/TaqI (DXS164)	Intron 13	gtcagttggcagtaaaagcc/ ccaattaaaccacagcag
pERT87-15/TaqI (DXS164)	Intron 16	gactttcgatgttgagattactttccc/ aagcttgagatgctctcacctttcc

Za crtanje rodoslovnih stabala je korišćen softver dostupan na [www.egat.de/en/for-physicians/pedigree-chart-designer/](http://www.egat.de/en/for-physicians/pedigree-chart-designer/) (125).

## ***4. Rezultati***

---

Od rezultata prikupljenih istraživanjem formirana je datoteka u Microsoft Excelu koja je zatim prenetu u statistički program IBM SPSS 20 uz pomoć kojeg su podaci i analizirani. Od deskriptivnih statističkih pokazatelja korišćene su frekvencije, procenti, srednje vrednosti i mere varijabiliteta. Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su Studentov t-test, pirsonov HI-kvadrat test, a u slučaju pojave malih očekivanih učestalosti Hi-kvadrat egzakti test. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

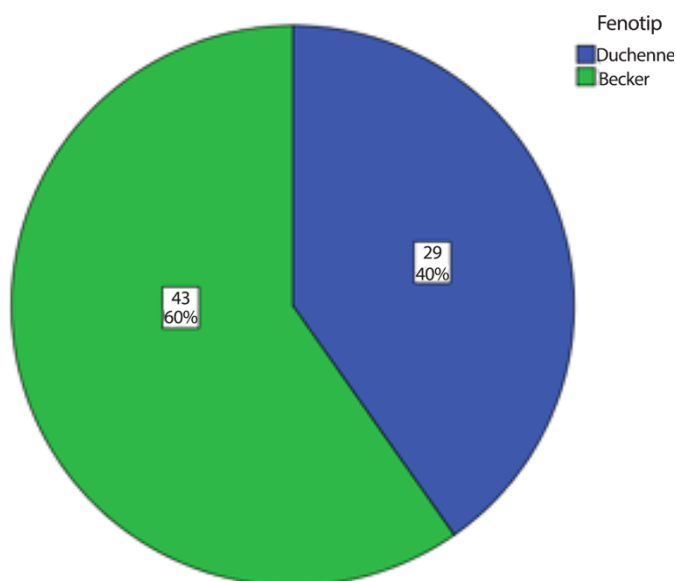
#### **4.1. Rezultati PCR i/ili MLPA analize kod probanda**

Uzorak je činilo 72 DMD/BMD probanda, od kojih je nesrodnih bolesnika bilo 64, a u 4 slučajima su bila ispitana po dva rođena brata (N=8). Od tog broja, 29 bolesnika je bilo sa DMD fenotipom (40,3%) i 43 sa BMD fenotipom (59,7%) (Tabela 1; Grafikon 1).

Tabela 1. Fenotip kod probanda

	N	%
Duchenne	29	40.3
Becker	43	59.7
Ukupno	72	100.0

Grafikon 1. Fenotip kod probanda



Godine starosti kada se javljaju simptomi bolesti čine važnu razliku između DMD i BMD. Kod naših ispitanika podatak o godinama života odnosi se na starost kada je rađena prva genetička analiza (Tabela 2).

Tabela 2. Godine starosti obolelih kada je rađena prva genetska analiza u odnosu na fenotip

		Godine starosti					
		N	AS	SD	Med	Min	Maks
Fenotip	Duchenne	24	7.79	5.52	6.00	1.00	21.00
	Becker	33	24.76	12.63	22.00	3.00	57.00
	Ukupno	57	17.61	13.24	14.00	1.00	57.00

Za 57 DMD/BMD bolesnika, za koje smo imali podatak o godinama života, nađena prosečna starost je bila  $17,61 \pm 13,24$  godine, a medijana je iznosila 14 godina. Najmlađi bolesnik imao je jednu godinu, a najstariji 57 godina.

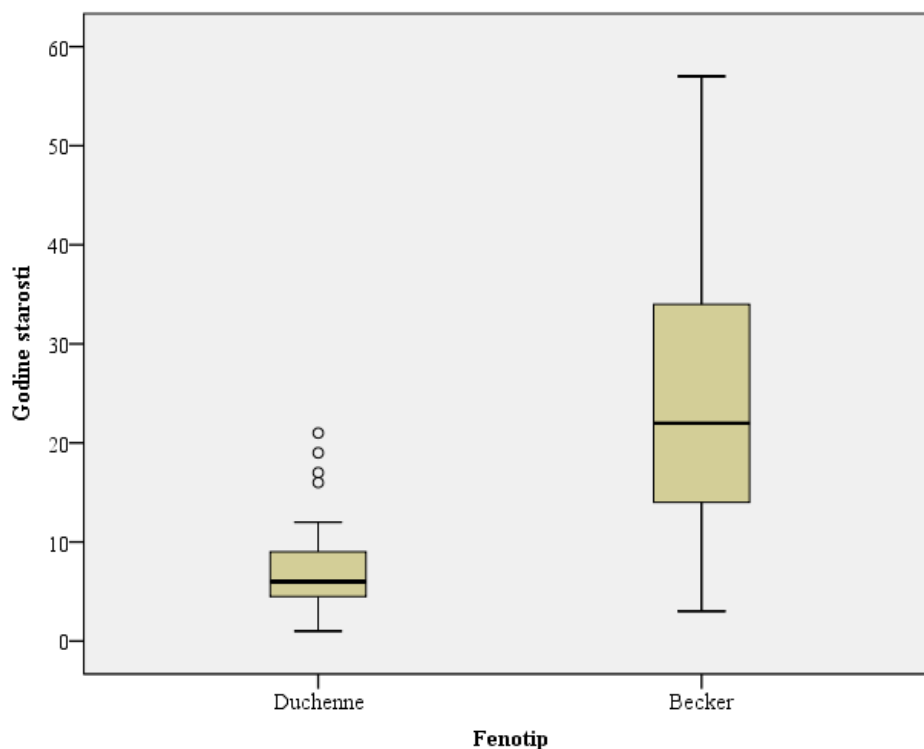
Prosečna starost bolesnika sa DMD fenotipom je bila  $7,79 \pm 5,52$  godine, a medijana je iznosila 6 godina. Najmlađi bolesnik imao je jednu godinu, a najstariji 21 godinu.

Prosečna starost bolesnika sa BMD fenotipom je bila  $24,76 \pm 12,63$  godine, a medijana je iznosila 22 godine. Najmlađi bolesnik imao je 3 godine a najstariji 57 godina.

Man-Vitni U testom dobijena je visoko statistički značajna razlika u starosti bolesnika u odnosu na fenotip ( $p < 0,001$ ), što je ilustrativno prikazano u Grafikonu 2.



Grafikon 2. Godine starosti obolelih kada je rađena prva genetska analiza u odnosu na fenotip

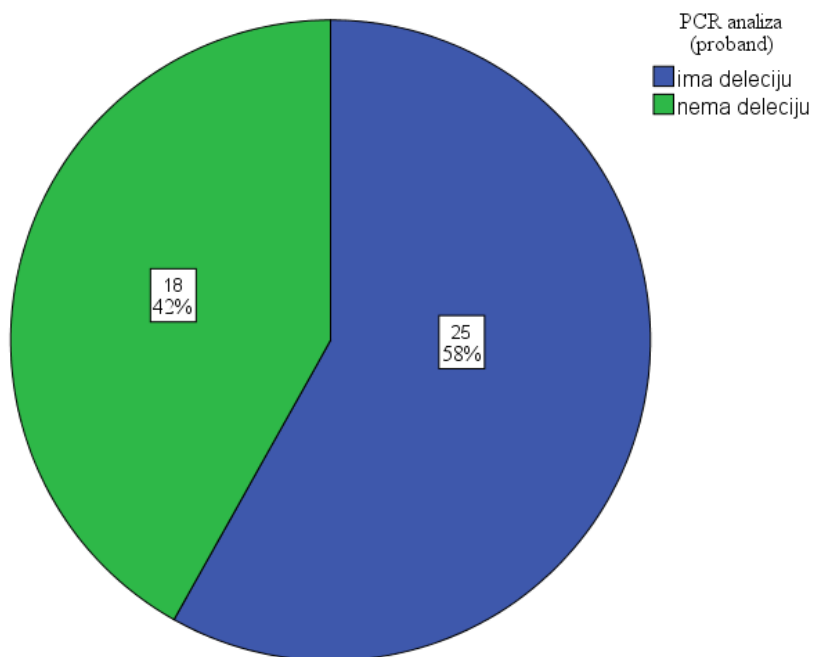


Multipleks PCR metoda detektuje oko 98% delecija u predilekcionim regionima DMD gena. Ovom metodom ispitano je ukupno 43 ispitanika, 29 DMD i 14 BMD bolesnika. Kod 25 (17 DMD i 8 BMD) bolesnika nađena je delecija, što iznosi 58,1% ispitanih ovom metodom, dok kod 18 (12 DMD i 6 BMD) probanada nisu bile nađene delecije - 41,9% (Tabela 3; Grafikon 3).

Tabela 3. PCR analiza kod probanda

	N	%
ima deleciju	25	58.1
nema deleciju	18	41.9
Ukupno	43	100.0

Grafikon 3. PCR analiza kod probanda



Granice delecija koje su dobijene PCR analizom kod probanada date su u Tabeli 4. U četiri slučaja (3 DMD i 1 BMD) u pitanju je bila delecija jednog egzona (egzoni 13, 44, 50), dok je njih 21 (14 DMD i 7 BMD) imalo deleciju više egzona, a najčešće su bili zahvaćeni egzoni u distalnom delu gena – egzoni 44-55, kod 14 ispitanika (8 DMD i 6 BMD).

Tabela 4. Delecije nađene kod probanda PCR metodom

Delecije	N	%
del 12-19	1	4.0
del 12-43	1	4.0
del 13	1	4.0
del 4-13	1	4.0
del 44	2	8.0
del 44-48	2	8.0
del 44-49	1	4.0
del 45-47	1	4.0
del 45-48	3	12.0
del 45-50	1	4.0
del 45-52	1	4.0
del 45-60	2	8.0
del 46-50	2	8.0
del 46-52	1	4.0
del 48-50	1	4.0
del 49,50	1	4.0
del 50	1	4.0
del 6-19	1	4.0
del DP427c	1	4.0
Ukupno	25	100.0

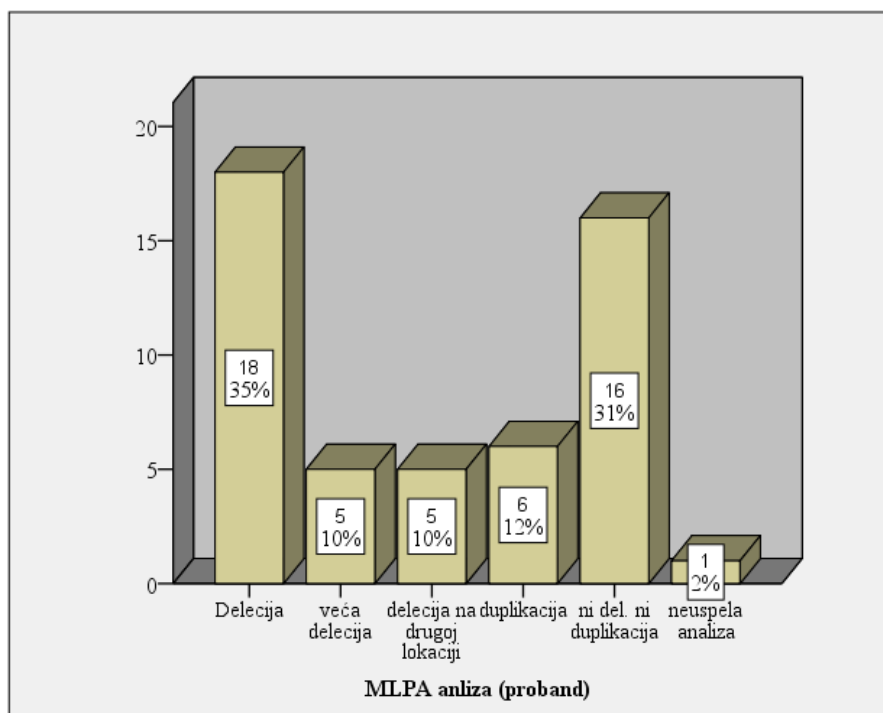
MLPA metoda omogućava kvantitativnu analizu svih 79 egzona DMD gena. Ovom metodom se mogu detektovati delecije i duplikacije u genu za distrofin kod probanda ili kod ženskih nosilaca. U našem istraživanju ovom metodom ispitan je 51 proband (analiza nije uspjela kod jednog probanda). Rezultati dobijeni MLPA metodom prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Rezultati MLPA analize kod probanda

	N	%
delecije	28	54,9
duplikacija	6	11,7
ni delecija ni duplikacija	16	31,4
neuspjela analiza	1	2,0
Ukupno	51	100,0

Grafikon 4. daje prikaz nađenih delecija MLPA metodom kod probanda, pri čemu su delecije razvrstane u odnosu na nalaz PCR metodom (za probande kod kojih su rađene obe metode), a o čemu će kasnije biti više reči.

Grafikon 4. Prikaz rezultata MLPA analize kod probanda



Od 51-og probanda koji je ispitan MLPA metodom, velike mutacije su nađene kod njih 34 (66,7%), od kojih su u 28 (54,9%) slučajeva bile delecije, 6 (11,7%) duplikacije, dok ni delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 16 (31,4%) ispitanika. Granice delecija i duplikacija koje su nađene MLPA metodom date su u Tabeli 6.

Tabela 6. Prikaz granica mutacija nađenih kod probanada MLPA metodom

Delecije ili duplikacije	N	%
del 1	1	2.9
del 1, DP427c	1	2.9
del 10-12	1	2.9
del 25-43	1	2.9
del 3-15	1	2.9
del 33,34	1	2.9
del 35-52	1	2.9
del 43	1	2.9
del 44	1	2.9
del 45-47	4	11.8
del 45-48	3	8.8
del 45-49	3	8.8
del 45-50	1	2.9
del 45-76	2	5.9
del 48	2	5.9
del 49,50	1	2.9
del 50	1	2.9
del 59	1	2.9

Delecije ili duplikacije	N	%
del 9-12	1	2.9
dupl 18-27	1	2.9
dupl 18-42 i 45-48	1	2.9
dupl 2	1	2.9
dupl 31-44	1	2.9
dupl 52-62	1	2.9
dupl 8-16	1	2.9
Ukupno	34	100.0

Od 51-og ispitanika, kod njih 29 je bila rađena samo MLPA metoda. Kod preostala 22 ispitanika, prvobitno je bio rađen PCR, a MLPA metoda je primenjena u cilju detektovanja delecija koje nisu u predilekcionim regionima DMD gena ili otkrivanje duplikacija, ili radi preciznijeg utvrđivanja granica delecija koje su bile nađene PCR metodom. Nalazi MLPA metodom kod probanada u odnosu na PCR metodu su dati u Tabeli 7 i Grafikonu 5.

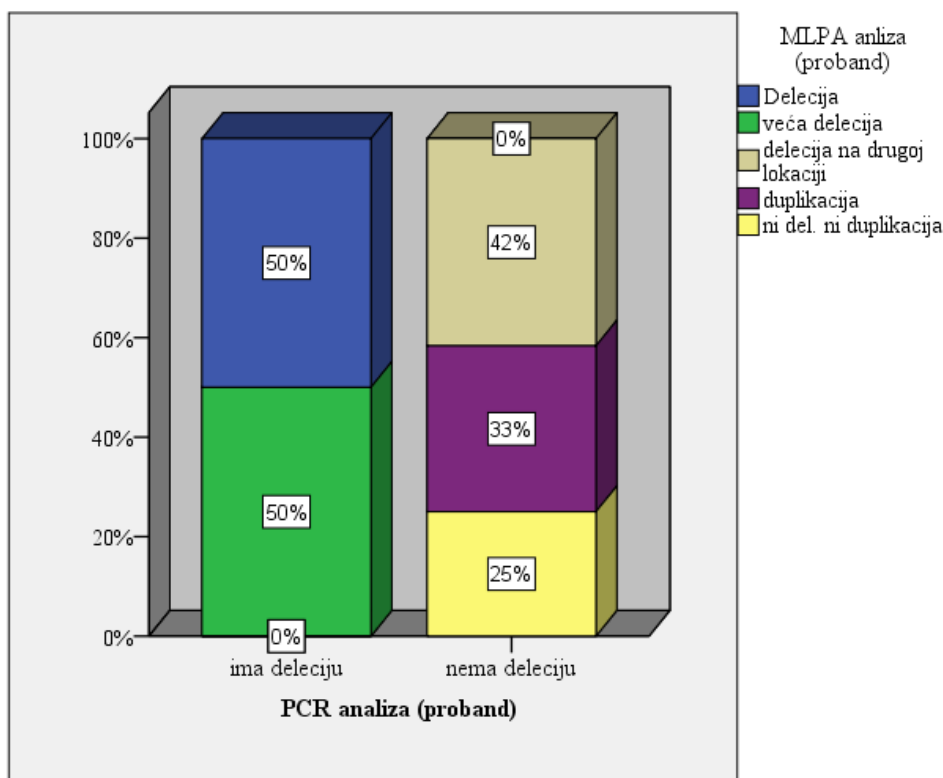
Tabela 7. Prikaz nalaza kod probanda MLPA analizom u odnosu na PCR analizu

			PCR analiza (proband)		Ukupno	
			ima deleciju	nema deleciju		
MLPA analiza (proband)	Delecija	N	5	0	5	
		%	50.0%	0.0%	22.7%	
	veća delecija	N	5	0	5	
		%	50.0%	0.0%	22.7%	
	delecija na drugoj lokaciji	N	0	5	5	
		%	0.0%	41.7%	22.7%	
	duplikacija	N	0	4	4	
		%	0.0%	33.3%	18.2%	
	ni del. ni duplikacija	N	0	3	3	
		%	0.0%	25.0%	13.6%	
	Svega		N	10	12	22
			%	100.0%	100.0%	100.0%

Od 10 bolesnika kod kojih je PCR analizom nađena delecija, kod njih 5 je MLPA analizom nađena ista delecija (50%), a kod 5 bolesnika veća delecija (50%). Kod 12 bolesnika kod kojih PCR analizom nije nađena delecija, kod njih 5 (41,7%) je MLPA analizom nađena delecija na drugoj lokaciji, a kod 4 duplikacija (33,3%), dok kod 3 (25%) ispitanika nije bila nađena ni delecija ni duplikacija.

Hi-kvadrat egzaktnim testom dobijena je visoko statistički značajna razlika u učestalosti nalaza dobijenih PCR i MLPA analizom (HI-kvadrat = 22,000;  $p < 0,001$ ). Odnosno, MLPA metodom potvrđene su sve delecije nađena PCR metodom, takođe je u 22,7% slučajeva nađena veća delecija, u 22,7% delecija na drugoj lokaciji, a kod 4 ispitanika otkrivena je duplikacija (18,2%).

Grafikon 5. Prikaz nalaza kod probanda MLPA analizom u odnosu na PCR analizu



Kod 72 probanda primenom obe metode, PCR i/ili MLPA, ukupno je otkriveno 49 velikih mutacija što iznosi 68,1% (od toga delecije 87,7%, a duplikacije 12,3%), dok delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 22 probanda, odnosno 30,1%, a kod jednog probanda MLPA analiza nije bila uspešna (1,4%). Delecije su nađene kod 22 (44,9%) DMD bolesnika i 21 (42,8%) BMD bolesnika, dok su duplikacije bile prisutne kod 4 (8,2%) DMD i 2 (4,1%) BMD bolesnika (Tabela 8). Ni delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 4 (18,2%) DMD bolesnika i 18 (81,8%) BMD bolesnika. U Tabeli 8a. prikazane su mutacije kod probanada (N=72) koje su bile nađene primenom obe metode, PCR i/ili MLPA.

Tabela 8. Prikaz nađenih velikih mutacija kod DMD i BMD probanada sa obe metode

Fenotip	Delecije	%	Duplikacije	%
DMD	22	44.9	4	8.2
BMD	21	42.8	2	4.1
Ukupno	43	87.7	6	12.3



Tabela 8a. Prikaz granica mutacija nađenih kod probanda PCR i/ili MLPA metodom

Fenotip kod probanda	Mutacioni status probanda	N	%
DMD	del 1	1	1.4
DMD	del 1, DP427c	1	1.4
BMD	del 10-12	1	1.4
DMD	del 12-19	1	1.4
BMD	del 12-43	1	1.4
BMD	del 13	1	1.4
DMD	del 25-43	1	1.4
DMD	del 3-15	1	1.4
DMD	del 33,34	1	1.4
DMD	del 35-52	1	1.4
BMD	del 43	1	1.4
DMD	del 44	2	2.8
BMD	del 44-48	1	1.4
BMD	del 44-49	1	1.4
BMD	del 45-47	4	5.5
BMD	del 45-48	6	8.3
BMD	del 45-49	3	4.1
DMD	del 45-50	1	1.4
DMD	del 45-52	1	1.4
DMD	del 45-76	2	2.8
DMD	del 46-50	2	2.8
DMD	del 46-52	1	1.4

Fenotip kod probanda	Mutacioni status probanda	N	%
BMD	del 48	2	2.8
DMD	del 48-50	1	1.4
DMD	del 49,50	1	1.4
DMD	del 50	1	1.4
DMD	del 59	1	1.4
DMD	del 6-19	1	1.4
BMD	del 9-12	1	1.4
BMD	dupl 18-27	1	1.4
DMD	dupl 18-42 i 45-48	1	1.4
DMD	dupl 2	1	1.4
BMD	dupl 31-44	1	1.4
DMD	dupl 52-62	1	1.4
DMD	dupl 8-16	1	1.4
BMD	neuspela MLPA analiza	1	1.4
2DMD/14BMD	nmf (ni del ni dupl.) (MLPA)	16	22.2
2DMD/4BMD	nisu nađene delecije (PCR)	6	8.3
Ukupno		72	100.0

Delecijama i duplikacijama najčešće je bio zahvaćen veći broj egzona, u 79,6% slučajeva, dok su mutacije jednog egzona bile prisutne kod 20,4% probanada (Tabela 9). Od delecija jednog egzona nađene su delecije egzona 1, 13, 43, 44, 48, 50, 59, a od duplikacija egzon 2. Najčešća delecija većeg broja egzona bila je delecija egzona 45-48 (6 slučajeva). Najveća delecija je obuhvatala egzone 12-43 (31 egzon), a najveća duplikacija obuhvatila je dve lokacije u genu, egzone 18-42 i egzone 45-48 (27 egzona).

Tabela 9. Broj zahvaćenih egzona kod probanda

	N	%
jedan egzon	10	20.4
više egzona	39	79.6
Ukupno	49	100.0

Strukturna i funkcionalna organizacija DMD gena podrazumeva 4 različita domena: N-terminalni domen, štapićasti domen, cisteinski domen i C-terminalni domen. Tabela 10. i Grafikon 6. prikazuju lokalizacije nađenih delecija i duplikacija u odnosu na domen u kome leže. Očekivano, najveći broj nađenih delecija i duplikacija su bile lokalizovane u štapićastom domenu (85,7%).

Tabela 10. Domen u kome se nalaze mutacije nađene kod probanda PCR i/ili MLPA metodom

Domen	N	%
I	3	6.1
I i II	2	4.1
II	42	85.7
II, III i IV	2	4.1
Ukupno	49	100.0

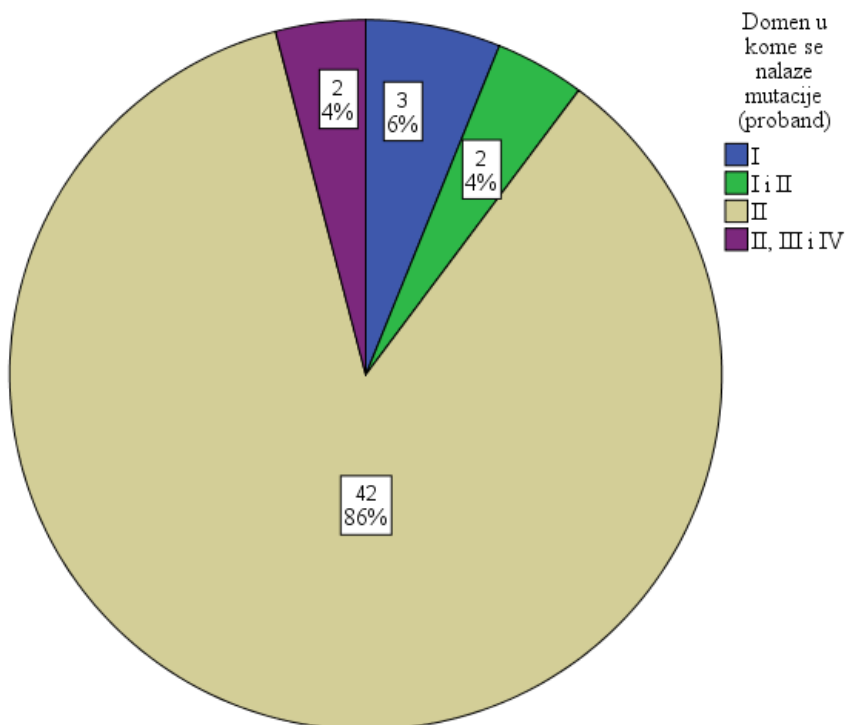
I : N-terminalni domen (egzoni 2-8)

II : Štapićasti domen (egzoni 9-62)

III : Cisteinski domen (egzoni 63-69)

IV: C-terminalni domen (egzoni 70-79)

Grafikon 6. Domen u kome se nalaze mutacije probanda nađene PCR i/ili MLPA metodom

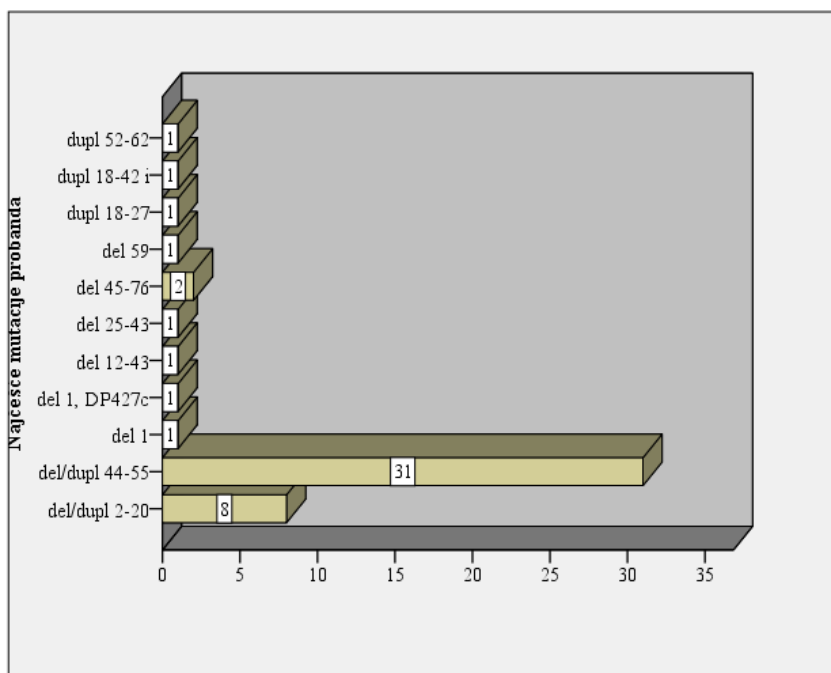


Najčešće mutacije kod DMD/BMD probanada koje su bile nađene sa obe metode obuhvatile su egzone 2-20 (16,3%) i egzone 44-55 (63,3%), što odgovara “vrućim tačkama” u DMD genu (Tabela 11; Grafikon 7).

Tabela 11. Najčešće mutacije kod probanda nađene sa obe metode

	N	%
del ili dupl 2-20	8	16.3
del ili dupl 44-55	31	63.3
del 1	1	2.0
del 1, DP427c	1	2.0
del 12-43	1	2.0
del 25-43	1	2.0
del 45-76	2	4.1
del 59	1	2.0
dupl 18-27	1	2.0
dupl 18-42 i	1	2.0
dupl 52-62	1	2.0
Ukupno	49	100.0

Grafikon 7. Najčešće mutacije kod probanda nađene sa obe metode



Delecije i duplikacije nađene kod probanada analizirali smo pomoću Reading frame checker-a (version 1.9). Utvrdili smo da su kod 46,8% bolesnika bile prisutne in-frame mutacije, dok su kod 53,2% bile out-of frame mutacije (Tabela 12). Takođe smo utvrdili i povezanost ovih mutacija sa fenotipom kod probanda. Nađeno je da 91,3% DMD probanada ima out-of frame mutaciju, odnosno da 8,7% ima in-frame mutaciju. Kod BMD probanada 83,3% je imalo in-frame mutaciju, a 16,7% out-of frame mutaciju (Tabela 13; Grafikon 8).

Tabela 12. Analiza mutacije kod probanda (Reading frame-checker)

	N	%
in frame	22	46.8
out of frame	25	53.2
Ukupno	47	100.0

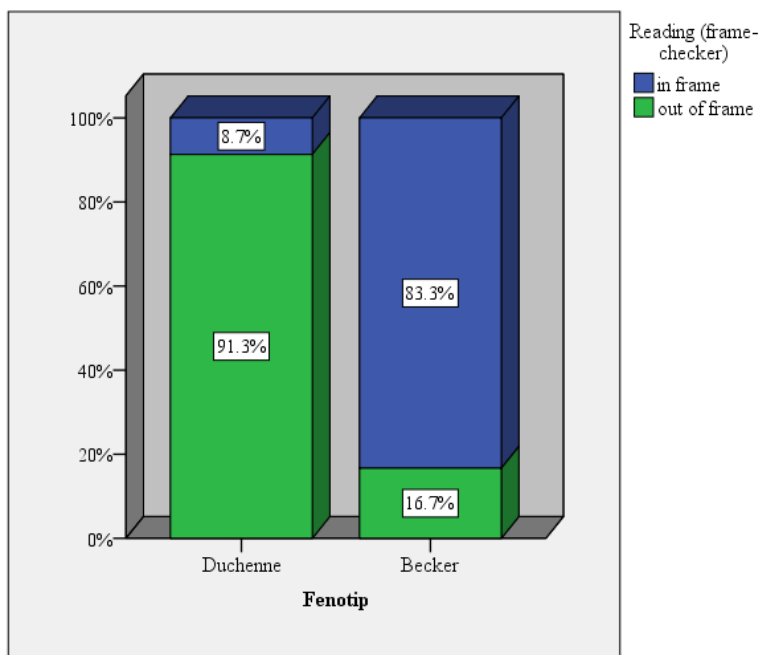
Tabela 13. Povezanost nađenih mutacija sa fenotipom kod probanda

			Reading (frame-checker)		Ukupno
			in frame	out of frame	
Fenotip	Duchenne	N	2	21	23
		%	8.7%	91.3%	100.0%
	Becker	N	20	4	24
		%	83.3%	16.7%	100.0%
Ukupno		N	22	25	47
		%	46.8%	53.2%	100.0%

Kod obolelih sa fenotipom Duchenne 21 ima out-of frame mutaciju, a 2 in-frame mutaciju. Dok je kod obolelih sa fenotipom Becker obrnuto, 20 ima in-frame mutaciju, a 4 out-of frame mutaciju.

Pirsonovim Hi-kvadrat testom dobijena je visoko statistički značajna razlika (Hi-kvadrat = 26,278;  $p < 0,001$ ).

Grafikon 8. Povezanost nađenih mutacija sa fenotipom kod probanda



#### ***4.2. Rezultati MLPA analize kod ženskih srodnika probanada***

U cilju utvrđivanja statusa nosioca kod žena, MLPA metodom smo ispitali 58 ženskih članova iz 41 porodice DMD/BMD probanada (MLPA nalaz je dat u prilogu). Od toga, u 40 porodica je bio po jedan DMD/BMD slučaj, a kod jedne porodice su bila zahvaćena dva rođena brata. Ispitivanje je obuhvatilo 37 majki probanada, 14 sestara probanada (13 rođenih i jedna sestra po majci), 2 ćerke (gde je otac proband), 3 sestričine (gde je ujak proband), 1 tetku (majčina sestra) i jednu baku (po majci). U dva slučaja nije bio poznat mutacioni status kod probanda, pa je indikacija za MLPA analizu kod ženskih članova bila postavljena na osnovu anamnestičkih podataka o obolelom. Najpre je dat prikaz nalaza MLPA analize kod majki probanada (Tabela 14).

Tabela 14. Rezultati MLPA analze kod majke

	N	%
delecija	14	37,8
duplikacija	3	8,1
ni delecija ni duplikacija	19	51,4
neuspela analiza	1	2,7
Ukupno	37	100,0

Od 37 ispitivanih majki, kod njih 17 (45,9%) su bile nađene delecije ili duplikacije u DMD genu, čime je potvrđen status nosioca kod ovih majki. Od 17 velikih mutacija delecije su bile nađene kod 14 majki (82,4%), a duplikacije kod 3 majke (17,6%).

Tabela 15. prikazuje granice mutacije kod majki (nosioci) utvrđene MLPA metodom.

Tabela 15. Mutacije nađene kod majke MLPA metodom

	N	%
del 1, DP427c	1	5.9
del 3-15	1	5.9
del 33,34	1	5.9
del 35-52	1	5.9
del 45-47	2	11.8
del 45-48	3	17.6
del 45-52	1	5.9
del 46-55	1	5.9
del 48	1	5.9
del 49,50	1	5.9
del 59	1	5.9
dupl 18-42 i 45-48	1	5.9
dupl 2	1	5.9
dupl 52-62	1	5.9
Ukupno	17	100.0



Tabela 16. prikazuje fenotip kod probanda i MLPA nalaz kod njihovih majki koje su ovom analizom bile potvrđene kao nosioci; kao i majke koje nisu bile potvrđene kao nosioci; i dve majke kod koji nije rađena MLPA metoda, a koje imaju po dva obolela sina (sa dokazanom mutacijom) i svrstavaju se u verovatne nosioce (N=39).

Tabela 16. Nalaz kod majke u odnosu na fenotip kod probanda

			Fenotip		Ukupno	
			Duchenne	Becker		
Nalaz kod majke	delecija	N	8	6	14	
		%	36,4%	35,3%	35,9%	
	duplikacija	N	3	0	3	
		%	13,6%	0,0%	7,7%	
	ni delecija ni duplikacija	N	10	9	19	
		%	45,5%	52,9%	48,7%	
	neuspela analiza	N	0	1	1	
		%	0,0%	5,9%	2,6%	
	verovatni nosilac	N	1	1	2	
		%	4,5%	5,9%	5,1%	
	Ukupno		N	22	17	39
			%	100,0%	100,0%	100,0%

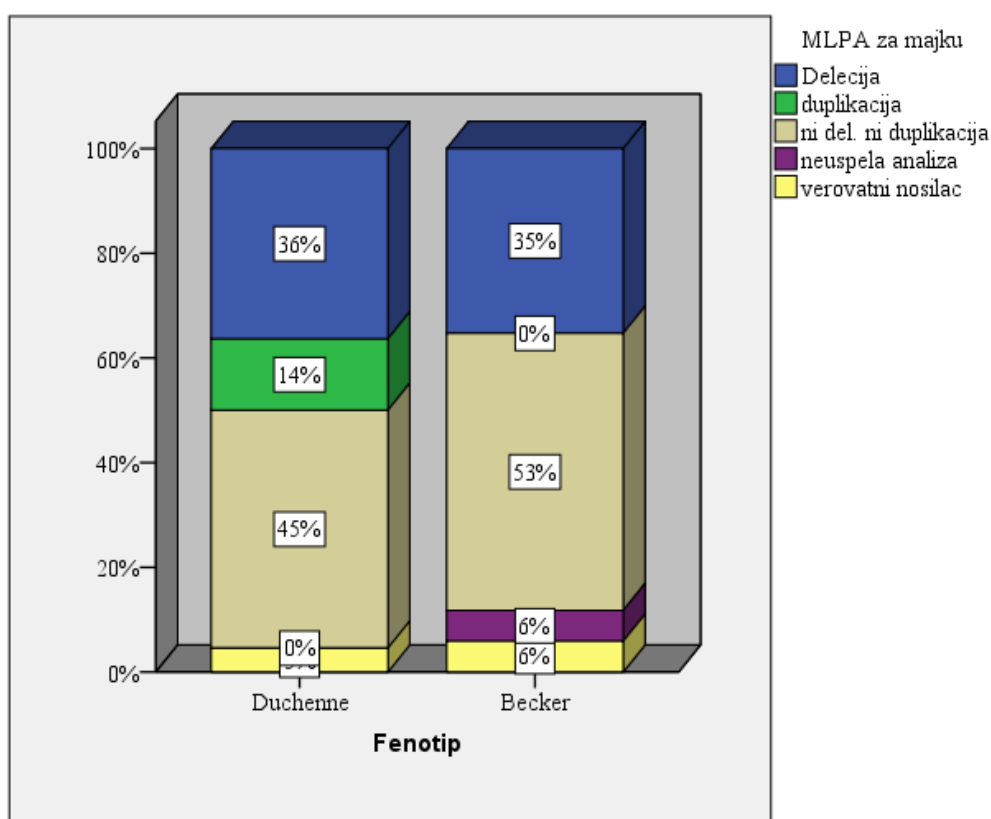
Od 37 majki kod kojih je rađena MLPA analiza, 21 (56,7%) obolelih sinova je imalo DMD fenotip, a njih 16 (43,3%) BMD fenotip. Od 21 probanda sa DMD fenotipom kod 8 majki je nađena delecija, kod 3 duplikacija, a kod 10 majki nisu bile nađene delecije ni duplikacije. Od 16 probanda sa BMD fenotipom, 6 majki je imalo deleciju, kod 9 majki nisu bile potvrđene delecija ni duplikacija, dok kod jedne majke nije uspela analiza. Od dve majke koje su označene kao verovatni nosioci, kod sinova je bio prisutan DMD fenotip, odnosno BMD fenotip.

Hi-kvadrat egzaktnim testom nije nađena statistički značajna razlika nalaza kod majke u odnosu na fenotip kod probanda (Hi-kvadrat = 3,120; p = 0,386).

Iz Tabele 16. se vidi da od 37 majki kod kojih je rađena MLPA analiza, njih 19 (51,4%) nema ni deleciju ni duplikaciju, a njihovi sinovi imaju mutaciju (probandi). Prema tome, stopa novih mutacija iznosi ukupno 51,4%, tj. za DMD bolesnike 45,5%, a za BMD bolesnike 60%.

Grafikon 9. daje ilustrativan prikaz podataka iz Tabele 16.

Grafikon 9. Nalaz kod majke u odnosu na fenotip kod probanda



U tabeli 17. su dati rezultati MLPA analize svih ispitivanih ženskih članova, zajedno sa nalazima kod probanada dobijenih primenom PCR i/ili MLPA metode. Od 58 ispitanih ženskih članova MLPA analiza nije uspjela kod njih 5 (četiri sestre i jedne majke). U tabeli su prikazane granice mutacija za sve ispitanike kod kojih su mutacije bile nađene; kod ispitanika kod kojih MLPA metodom nije bila nađena delecija ni duplikacija stoji skraćenica – nmf (engl. no mutation found); a oznaka “x” odnosi se na članove porodice kod kojih nam nije bio poznat mutacioni status.

Tabela 17. Usporedni prikaz nalaza kod probanda i svih ispitanih ženskih srodnika MLPA metodom

Red. broj	Fenotip kod probanda	Mutacija kod probanda (PCR i/ili MLPA)	Srodnik probanda	Mutacije kod srodnika probanda (MLPA)
1	BECKER	del 9-12	majka	nmf
2	DUCHENNE	del 1	majka	nmf
			sestra1	neuspela analiza
3	DUCHENNE	dupl 8-16	majka	nmf
4	DUCHENNE	del 25-43	majka	nmf
5	DUCHENNE	del 50	majka	nmf
6	DUCHENNE	del 49,50	majka	del 49,50
			baka	del 49,50
7	DUCHENNE	del 45-52	majka	del 45-52
8	DUCHENNE (brat po majci ima istu mutaciju)	del 1, DP427c	majka	del 1, DP427c
9	DUCHENNE	del 59	majka	del 59
10	DUCHENNE	del 35-52	majka	del 35-52
11	DUCHENNE	dupl 2	majka	dupl 2
			sestra1	nmf
			sestra2	nmf
12	DUCHENNE	nije nađena delecija	majka	nmf
13	DUCHENNE	del 45-50	majka	nmf
14	DUCHENNE	del 46-50	majka	nmf
15	DUCHENNE	del 44	majka	nmf
16	BECKER	nmf	majka	nmf
17	DUCHENNE	nmf	majka	nmf
18	DUCHENNE (brat blizanac ima hiper CPK-emiju)	del 33,34	majka	del 33,34
19	DUCHENNE	dupl 18-42 i 45-48	majka	dupl 18-42 i 45-48

Red. broj	Fenotip kod probanda	Mutacija kod probanda (PCR i/ili MLPA)	Srodnik probanda	Mutacije kod srodnika probanda (MLPA)
20	DUCHENNE	dupl 52-62	majka	dupl 52-62
21	DUCHENNE	del 12-19	majka	nmf
22	DUCHENNE	del 46-52	majka	del 46-55
23	DUCHENNE	del 3-15	majka	del 3-15
			sestra1	nmf
24	DUCHENNE (rođeni brat ima istu mutaciju)	del 45-76	majka	verovatni nosilac
25	BECKER	del 44-48	majka	x
			sestričina1	del 45-47
26	BECKER	del 44-49	majka	del 45-47
27	BECKER	neuspela analiza	majka	neuspela analiza
			sestra1	neuspela analiza
			sestra2	neuspela analiza
28	BECKER	del 12-43	majka	nmf
			sestra1	nmf
			sestra2	nmf
29	BECKER	del 45-47	majka	del 45-47
			sestra1	neuspela analiza
30	BECKER	del 45-49	majka	nmf
31	BECKER	del 45-48	majka	del 45-48
32	BECKER	nmf	majka	nmf
33	BECKER	del 13	ćerka1	del 13
			ćerka2	del 13
			ćerka3	x
34	BECKER	nmf	majka	nmf
35	BECKER	del 45-49	majka	nmf
36	BECKER	del 45-48	majka	del 45-48
37	BECKER	del 45-48	majka	del 45-48
38	BECKER	nmf	majka	nmf
			sestra	nmf

Red. broj	Fenotip kod probanda	Mutacija kod probanda (PCR i/ili MLPA)	Srodnik probanda	Mutacije kod srodnika probanda (MLPA)
			sestričina1	nmf
			sestričina2	nmf
39	BECKER	del 48	majka	del 48
40	BECKER	nmf	majka	x
			sestra	nmf
			tetka	nmf
41	BECKER	x	majka	nmf
			sestra 1	nmf
			sestra 2	nmf
42	DUCHENNE	x	majka	x
			sestra po majci	nmf
43	BECKER (rođeni brat ima istu mutaciju)	del 45-47	majka	verovatni nosilac

Od 53 uspele MLPA analize kod ženskih srodnika, kod njih 21 (39,6%) su bile nađene mutacije, dok u 32 (60,4%) slučaja nisu bile nađene delecije ni duplikacije. Mutacije su nađene kod 17 majki, 1 sestričine, 1 bake i kod dve ćerke čiji je otac proband. Od 14 ispitanih sestara probanada kod 10 sestara nisu bile nađene mutacije, dok kod 4 sestre analiza nije uspela. Od tri ispitivane sestričine čije je ujak proband, 2 nisu imale mutaciju. Jedna tetka (majčina sestra) takođe nije imala mutaciju.

Analizirajući mutacije koje su nađene kod majki, u odnosu na mutacije kod obolelih sinova, utvrdili smo da je mutacija kod jedne majke bila veća nego kod sina, i na istoj lokaciji, kod jedne majke mutacija je bila manja nego ona koja je nađena kod sina, takođe na istoj lokaciji, dok su sve ostale majke imale istu mutaciju koju ima oboleli sin.

Analizom ostalih mutacija zaključili smo da obe ćerke nose istu deleciju koju ima njihov otac (BMD), sestričina nosi istu deleciju kao oboleli ujak (BMD), a baka ima istu deleciju kao njena ćerka, odnosno njen unuk (DMD).

Za probande kod kojih se ne utvrdi prisustvo delecija ili duplikacija (PCR i/ili MLPA), mogućnosti su da ima tačkastu mutaciju u DMD genu ili da ima neku drugu miopatiju. Tačkaste mutacije otkrivaju se metodom sekvenciranja gena ili se do podataka o nasleđenoj mutaciji dolazi indirektnom analizom (linkage analiza). U Tabeli 18. prikazana su druga sprovedena ispitivanja.

Tabela 18. Druga ispitivanja kod probanda i njegovih pojedinih ženskih srodnika

	N	%
analiza vezanosti	6	27.3
analiza vezanosti - prenatalna dg	3	13.6
mlpa	1	4.6
Next generation Sequencing	7	31.8
prenatalna dg	5	22.7
Ukupno	22	100.0

Iz tabele se vidi da je kod 7 ispitanika (3 BMD probanda, 1 majka, 3 sestre) primenjena metoda sekvenciranja (Next generation Sequencing). Kod 2 probanda utvrđena je mutacija CAPN3 gena (oba su bila složeni heterozigoti, kalpainopatija), a kod jednog probanda rezultat primenjenog genskog panela za mišićnu distrofiju je bio negativan. Kod jedne sestre probanda nađena je mutacija u FHL1 genu (Emery-Dreifuss mišićna distrofija), dok su jedna majka i dve sestre istog probanda bile heterozigoti za tačkastu mutaciju u DMD genu. MLPA analiza kod jedne sestre pokazala je mutaciju u SMN1 genu (Spinalna mišićna atrofija tip 3).

#### ***4.3. Rezultati dobijeni analizom vezanosti (linkage analiza)***

Analizom vezanosti je ispitano ukupno 9 porodica. Kod 6 porodica analiza je rađena u cilju utvrđivanja statusa ženskih nosioca u porodici, a kod tri porodice i u cilju prenatalne dijagnoze. Ispitano je ukupno 37 članova iz porodica, od toga je ženskih članova bilo 20. Za analizu kod tri ploda muškog pola, jedan uzorak je dobijen iz horiona, a dva iz plodove vode. U linkage analizi korišćeni su sledeći mikrosatelitni

markeri - 3'DYS (DXS1234), 5'DYS-II (DXS1242), STR44 (DXS1238), STR45 (DXS1237), STR49 (DXS1236), STR50 (DXS1235) i dva RFLPs markera pERT87-8taqI i pERT87-15taqI. Kod 7 porodica primenjena su po dva markera od kojih je najmanje jedan bio informativan, kod dve porodice je kombinovano više markera, dok su kod jedne porodice (6 članova), oba ispitivana markera bila neinformativna (Tabela 19). U svim ispitivanim porodicama kod probanada je prvobitno urađena PCR analiza, a kod 7 porodica nakon analize vezanosti, ispitivanje je bilo dopunjeno MLPA analizom (kod probanda i/ili ženskih srodnika). MLPA metoda je rađena kod 5 probanada i 9 ženskih članova porodice (N=14), a rezultati za ove ispitanike prikazani su delu u kome su dati ukupni rezultati MLPA analize za probande i ženske srodnike. U daljem tekstu prikazaćemo svih 9 ispitanih porodica.

Tabela 19. Informativnost markera za porodice koje su ispitivane analizom vezanosti

Marker	Porodica									Informativan/ br. porodica %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Informativnost markera za porodicu									
DXS1237 (intron 45)	Da	Da	Da	Ne	Ne	Da	Da	Da	Da	7/9 (77,8%)
DXS1236 (intron 49)	-	-	-	-	-	-	Da	-	Da	2/2 (100%)
DXS1235 (intron 50)	Ne	Ne	Da	Da	Ne	-	Ne	Ne	Da	3/8 (37,5%)
DXS1238 (intron 44)	-	-	-	-	-	Da	Da	-	Da	3/3 (100%)
5'DYS-II (DXS1242)	-	-	-	-	-	-	Da	-	-	1/1 (100%)
3'DYS (DXS1234)	-	-	-	-	-	-	-	-	Ne	0/1
pERT87-15/taqI (intron 16)	-	-	-	-	-	-	-	-	Ne	0/1
pERT87-8/taqI (intron 13)	-	-	-	-	-	-	Da	-	Ne	1/2 (50%)

Analiza vezanosti je bila uspešna kod 8 porodica. Najčešće korišćeni markeri su bili DXS1237 i DXS1235. Marker DXS1237 je bio primenjen kod svih 9 porodica i informativan kod 7 porodica (77,8%); marker DXS1235 je bio primenjen kod 8 porodica, ali informativan kod svega tri porodice (37,5%). Ostali markeri koji su bili korišćeni su pokazali ili potpunu informativnost kod porodica, ili su bili informativni u 50% slučajeva ili nisu bili informativni, ali je broj porodica kod kojih su ovi markeri primenjeni bio mali (1, 2 ili 3 porodice).



#### *4.3.1. Prikaz porodica kod kojih je rađena analiza vezanosti*

##### Porodica br. 1: proband sa DMD fenotipom

Kod probanda je prethodno rađena PCR analiza (2007. godine) kojom nije bila nađena delecija, pa je ispitivanje nastavljeno analizom vezanosti. Marker DXS1237 je bio informativan i utvrđeni su genotipovi kod probanda, majke i njene rođene sestre. Analiza je pokazala da majka i tetka obolelog dečaka imaju iste genotipove, tj. da obe imaju isti X hromozom kao i oboleli dečak, pa se zaključuje da je majčina sestra mogući prenosilac mutacije.

Kod majke smo uradili MLPA analizu 2016. godine, kojom nisu bile nađene delecije ni duplikacije u genu za distrofin.

##### Porodica br. 2: proband sa DMD fenotipom

PCR analizom kod probanda (2007. godine) je nađena delecija egzona 45-50. U cilju utvrđivanja statusa nosioca analiza vezanosti je urađena kod majke probanda i majčine rođene sestre. Markeri DXS1235 i DXS1237 su bili informativni. Analiza je pokazala da majka i tetka obolelog dečaka imaju iste genotipove, tj. obe imaju isti X hromozom kao i oboleli dečak, pa se zaključuje da je majčina sestra mogući prenosilac mutacije.

Daljim ispitivanjem MLPA metodom, koju smo radili kod probanda i njegove majke 2016. godine, potvrdili smo deleciju kod probanda (egzoni 45-50), dok kod majke nisu bile nađene delecije ni duplikacije.

##### Porodica br. 3: proband sa DMD fenotipom

PCR analizom kod probanda (2007. godine) utvrđeno je da ima deleciju egzona 6-19. Za marker DXS1235 porodica je bila informativna. Utvrđeni su genotipovi kod probanda, oca, majke i dve sestre probanda i zaključeno je da je jedna ćerka (sestra probanda) nasledila isti X hromozom koji poseduje oboleli brat, što ukazuje da je prenosilac mutacije. Druga ćerka nije nasledila X hromozom koji ima oboleli brat.

##### Porodica br. 4: proband sa BMD fenotipom

PCR analizom kod probanda nije utvrđena delecija. Porodica nije bila informativna za analizu (primenjeni markeri DXS1235 i DXS1237).

#### Porodica br. 5: proband sa DMD fenotipom

Kod probanda je PCR metodom 2007. godine utvrđena delecija egzona 50. Analiza vezanosti je urađena u cilju utvrđivanja statusa nosioca kod majke, bake i tetke (majčine sestre) obolelog dečaka, kao i kod njegove sestre po majci. Za markere DXS1237 i DXS1238 porodica je bila informativna, osim polusestre probanda koja nije bila informativna za analizu. Analizom je utvrđeno da majčina sestra nosi isti X hromozom kao i proband, pa je mogući prenosilac DMD.

Dalje ispitivanje MLPA analizom kod probanda, majke i bake (majčina mama) – koje smo sprovedeli 2016. godine, utvrđeno je da proband ima deleciju egzona 49 i 50, i da njegova majka i baka nose istu deleciju.

#### Porodica br. 6: proband sa DMD fenotipom

Kod probanda je prethodno rađena PCR metoda koja nije pokazala delecije u DMD genu (2007. godine). Sprovedena je analiza vezanosti (marker DXS1237 je bio informativan), koja je pokazala da ni jedna od dve ćerke (sestre probanda) nema X hromozom koji ima proband, što ukazuje da nisu prenosioci mutacije.

Zatim je 2010. godine je rađena nova linkage analiza proširena sa još 4 markera – RFLP marker pERT87-8/taq i mikrosatelitni markeri 44, 49 i DysII, kod istih članova porodice. Ova analiza je pokazala da ćerke nisu nasledile X hromozom od majke koji poseduje proband, što je u saglasnosti sa prethodnom analizom.

Za istu porodicu uradili smo MLPA analizu kod probanda, majke i dve sestre obolelog dečaka (2016. godina). Kod probanda i njegove majke otkrivena je ista mutacija – duplikacija egzona 2, dok ovom metodom nisu bile nađene delecije ni duplikacije kod sestara probanda. U Tabeli 20. su prikazani genotipovi članova porodice za primenjene markere i rezultati MLPA analize kod ženskih članova.

Tabela 20. Prikaz našenih genotpova za date markere i MLPA nalaz (porodica br. 6)

	Intron 45	Intron 13	Intron 44	Intron 49	DYSII	MLPA analiza
Majka	heterozigot 1,2	heterozigot 1,2	heterozigot 1,2	heterozigot 1,2	heterozigot 1,3	duplikacija egzona 2
Ćerka 1	homozigot 1,1	heterozigot 1,2	heterozigot 1,3	homozigot 2,2	heterozigot 1,2	nisu našene del. ni dupl.
Ćerka 2	homozigot 1,1	heterozigot 1,2	heterozigot 1,3	homozigot 2,2	heterozigot 1,2	nisu našene del. ni dupl.
Sin- proband	hemizigot 2	hemizigot 2	hemizigot 2	hemizigot 1	hemizigot 3	duplikacija egzona 2
otac	hemizigot 1	hemizigot 2	hemizigot 3	hemizigot 2	hemizigot 2	

Kod ispitanih članova porodice predviđanja na osnovu analize vezanosti su bila potvrđena MLPA analizom.

Porodice br. 7: proband sa BMD fenotipom

PCR analiza kod probnda (2007. godine) nije utvrdila prisustvo delecije u DMD genu. U cilju detekcije nosioca i prenatalne dijagnoze urađena je analiza vezanosti. Za marker DXS1237 porodica je bila informativna. Utvrđeni su genotipovi kod probanda, njegove majke, sestre probanda po majci (trudnica) i njenog muškog ploda (horion). Na osnovu našenih genotipova, koji su bili isti kod probnda i njegove sestre po majci, zaključeno je da je ona mogući prenosioc mutacije.

Kako je i u uzorku horiona utvrđen isti haplotip kao kod probanda, urađena je MLPA metoda (u Sloveniji) na uzorku horiona koja nije pokazala delecije ni duplikacije u DMD genu kod ploda. Takođe, MLPA analiza koju smo uradili polusestri probanda 2016. godine, nije pokazala delecije ni duplikacije.

#### Porodica br. 8: proband sa DMD fenotipom

Ni jedna od primenjenih metoda, PCR (2011. godine) i MLPA (2016. godine), kod probanda nije otkrila delecije ni duplikacije u genu za distrofin. U cilju prenatalne dijagnoze kod majke probanda (trudnica) urađena je analiza vezanosti. Za marker DXS1237 porodica je bila informativna. Utvrđeni su genotipovi kod probanda, njegovog oca i majke (trudnica), kao i kod njegovog zdravog brata. Za analizu kod muškog ploda uzet je uzorak plodove vode (kultura amniocita). Linkage analizom je utvrđeno da je plod od majke nasledio isti X hromozom kao i zdrav brat, pa plod neće bolovati od DMD.

#### Porodica br. 9: proband sa DMD fenotipom

Kod probanada PCR metodom nije utvrđena delecija u DMD genu (2009. godine). U cilju prenatalne dijagnoze kod majke probanda (trudnica) urađena je analiza vezanosti. Utvrđeni su genotipovi kod probanda i njegove majke (trudnica) i njenog muškog ploda (kultura amniocita). Za markere 44, 45, 49 i 50 porodica je bila informativna. Zaključeno je da plod nije od majke nasledio X hromozom koji ima oboleli brat.

MLPA analiza koju smo radili kod probanda i njegove majke nije otkrila delecije ni duplikacije u genu za distrofin (2016. godine).

#### 4.4. Rezultati prenatalne dijagnoze

U Tabeli 21. su dati rezultati za direktnu prenatalnu molekularno genetičku DMD/BMD dijagnozu. Prenatalna dijagnoza je rađena kod 8 trudnica (12 trudnoća), koje su imale DMD/BMD indikaciju. Ispitivanje je rađeno kod 5 muških i 7 ženskih plodova. U 11 slučajeva je bila primenjena PCR metoda, a u jednom slučaju MLPA metoda.

Tabela 21. Prikaz nalaza kod prenatalne dijagnoze

Trudnica	Indikacija	Trudnoća po redu	Uzorak	Pol ploda	Analiza	Mutacija
1	Otac trudnice ima BMD (del 13) i ona nosi del 13	prva	horion	muški	PCR	del 13
		druga	horion	muški	PCR	nema del
		treća	horion	ženski	MLPA	del 13
2	Otac trudnice ima BMD (del 13)	prva	horion	ženski	PCR	nema del
3	Otac trudnice ima BMD (del 45-48)	prva	horion	ženski	PCR	nema del
4	Rođak trudnice ima BMD (del 45-48)	prva	horion	muški	PCR	del 45-48
		druga	horion	muški	PCR	del 45-48
5	Sin trudnice ima DMD (del 46-50)	prva	horion	ženski	PCR	nema del
6	Sin trudnice ima DMD (del 46-50)	prva	horion	ženski	PCR	nema del
7	Sin trudnice ima DMD (del 48-50)	prva	horion	muški	PCR	nema del
8	Rođeni brat trudnice imao DMD	prva	kordiocenteza	ženski	PCR	nema del
		druga	kordiocenteza	ženski	PCR	nema del

Iz ukupno 12 trudnoća (8 majki) 4 ploda su imala mutaciju, što iznosi 33,3%. Rezultati PCR metode su pokazali da je kod 3 ploda muškog pola bila prisutna delecija (25%), dok kod ostalih uzoraka koji su bili ispitani ovom metodom, nisu bile nađene delecije patognomonične za DMD. Kod jednog ploda ženskog pola MLPA metodom je utvrđeno da nosi deleciju (8,3%).

Od 8 majki kod kojih je rađena prenatalna dijagnoza kod dve majke (25%) je rezultat bio pozitivan. Kod jedne majke dva ploda (66,7%) iz tri trudnoće su imala deleciju, jedan muški i jedan ženski plod, a kod jedne majke oba muška ploda iz dve trudnoće su imala deleciju.

## ***5. Diskusija***

---

Dišenova i Bekerova mišićna distrofija nastaju kao posledica mutacija u genu za distrofin. Nasleđivanje je X-vezano recesivno, oboljevaju muški članovi porodice, dok su žene uglavnom zdravi prenosioci bolesti. Kako se radi o bolestima koje imaju progresivan tok, a uspešne terapije nema, to je otkrivanje mutacija u genu za distrofin i utvrđivanje statusa ženskih prenosioca, od velikog značaja.

Pre otkrića gena za distrofin, dijagnoza Dišenove i Bekerove mišićne distrofije je postavljana isključivo na osnovu anamneze i kliničkih parametara za ovu bolest. Kloniranje DMD gena i identifikacija kodiranog proteina omogućili su dijagnozu distrofinopatija analizom samog gena ili njegovog proteinskog produkta – distrofina. Takođe, DMD gen je zbog svoje ekstremne veličine često podložan promenama i već decenijama je u žiži interesovanja mnogih istraživača.

Na osnovu velikog broja iskustava prikazanih u literaturi, utvrđeni su koraci u traganju za DMD/BMD dijagnozom. Dijagnostičko genetičko testiranje izvodi se kod simptomatskih bolesnika ili kao prenatalna genetička dijagnostika, kao i u cilju određivanja statusa prenosioca kod žena. Najpre se traga za delecijama i duplikacijama u genu za distrofin. Multipleks PCR je metoda koja otkriva delecije u predilekcionim regionima u genu za distrofin u 98% slučajeva. Sa druge strane, MLPA metoda omogućuje kvantitativnu analizu svih 79 egzona DMD gena, otkriva delecije koje se nalaze i van predilekcionih regiona u DMD genu, kao i duplikacije, kako kod probanda tako i kod ženskih nosioca mutacije. Ukoliko se na ovaj način ne otkriju delecije i duplikacije, primenjuje se metoda sekvenciranja gena. Ako se, pak, ni tada ne dokaže prisustvo mutacije u genu, biopsija mišića i imunohistohemijska analiza mogu da potvrde prisustvo (ili odsustvo) distrofina u ćelijama. Takođe, važan metod indirektno genske dijagnoze, koji je i dalje aktuelan, jeste analiza vezanosti (linkage analiza), koja je primenljiva i u slučajevima kada nije poznat mutacioni status kod probanda. Postavljanje DMD/BMD dijagnoze kod probanda je od značaja za prognozu bolesti, dok je otkrivanje ženskih prenosioca bolesti od posebnog značaja za davanje genetskog saveta i prenatalnu dijagnozu.

Naše istraživanje je obuhvatilo 72 DMD/BMD probanda, 69 ženskih članova iz 44 porodice probanada i 11 trudnica kod kojih je bila indikovana DMD/BMD prenatalna dijagnoza, za period od 2000–2015. godine.



U uzorku od 72 DMD/BMD probanda, nesrodnih bolesnika je bilo 64, a u 4 slučaja su bila ispitana po dva rođena brata (N=8). Od tog broja, 29 bolesnika je bilo sa DMD fenotipom (40,3%) i 43 sa BMD fenotipom (59,7%). Za 57 DMD/BMD bolesnika imali smo podatak o starosti prilikom prve genetske analize. Prosečna starost bolesnika sa DMD fenotipom je iznosila 6 godina, pri čemu je najmlađi bolesnik imao jednu godinu, a najstariji 21 godinu. Kod BMD bolesnika prosečna starost je bila 22 godine, najmlađi bolesnik je imao 3 godine a najstariji 57 godina. Zajedno, za naše DMD i BMD ispitanike, prosečna starost je iznosila 14 godina, pri čemu je najmlađi bolesnik imao jednu godinu, a najstariji 57 godina. Dobijeni podaci o starosti bolesnika su u skladu sa činjenicom da simptomi bolesti kod Dišenove mišićne distrofije počinju oko treće godine života (nekad i ranije), a vezanost za kolica prisutna je do 12 godine života (4). Sa druge strane, Bekerovu mišićnu distrofiju karakteriše veoma varijabilna klinička slika, od praktično asimptomatskih oblika do one koja je slična DMD. Početak bolesti kod BMD je u proseku oko 10-te godine života i kod većine bolesnika simptomi se ispolje do 20 godine, tok bolesti je sporiji, a kod težih oblika bolesti vezanost za kolica nije prisutna pre 16 godine života. Saito i sar. (126) takođe, donju granicu pojave simptoma kod BMD bolesnika nalaze u uzrastu od 3 godine, dok je najstariji ispitanik imao 63 godine.

Multipleks PCR metoda je vrlo efikasna u otkrivanju hemizigotnih delecija u genu za distrofin, a pošto su to najčešće prisutne mutacije kod DMD/BMD bolesnika, primena ove metode je opravdana kao prvi korak u DMD/BMD dijagnozi. U našem istraživanju multipleks PCR metoda je bila primenjena kod 43 ispitanika – 29 DMD i 14 BMD probanada. Kod 25 probanada (17 DMD i 8 BMD) su bile nađene delecije jednog ili više egzona, što iznosi 58,1% ispitanih ovom metodom, dok kod 18 probanada (12 DMD i 6 BMD) nisu bile nađene delecije, tj. kod 41,9%. U četiri slučaja (3 DMD i 1 BMD) u pitanju je bila delecija jednog egzona (egzoni 13, 44, 50), dok je njih 21 (14 DMD i 7 BMD) imalo deleciju više egzona, a najčešće su bili zahvaćeni egzoni u distalnom delu gena egzoni 44-55, kod 14 ispitanika (8 DMD i 6 BMD), tj. u 66,7% slučajeva.

Za detekciju delecija i duplikacija u DMD genu, kod 51 probanda je bila primenjena MLPA metoda. Od tog broja, kod 29 probanada je bila rađena samo MLPA metoda. Kod 22 probanda je prvobitno bio rađen PCR, a zatim i MLPA metoda u cilju

detektovanja delecija koje nisu u predilekcionim regionima DMD gena ili otkrivanja duplikacija, za probande kod kojih PCR metodom nisu bile nađene delecije; ili, radi preciznijeg utvrđivanja granica delecija kod probanada koje su bile dobijene PCR metodom. MLPA metodom kod 34 (66,7%) probanada su bile nađene velike mutacije, od kojih su u 28 (54,9%) slučajeva bile delecije, u 6 (11,7%) duplikacije, dok delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 16 (31,4%) ispitanika.

Kod probanada kod koji su rađene obe metode (N=22) od njih 10, kod kojih je PCR analizom nađena delecija, MLPA analizom je kod 5 bolesnika nađena ista delecija (50%), a kod 5 bolesnika veća delecija (50%). Kod 12 bolesnika kod kojih PCR analizom nije nađena delecija, MLPA analiza je kod njih 5 (41,7%) otkrila deleciju na drugoj lokaciji, kod 4 duplikaciju (33,3%), dok kod 3 (25%) probanda nije bila nađena ni delecija ni duplikacija. Odnosno, MLPA metodom su bile potvrđene sve delecije nađene PCR metodom, takođe je u 22,7% slučajeva nađena veća delecija, u 22,7% slučajeva delecija na drugoj lokaciji (van „vrućih tačaka” u genu), a kod 4 ispitanika otkrivena je duplikacija (18,2%). Ovi nalazi su u skladu sa do sada iznetim iskustvima velikog broja autora o efikasnosti MLPA metode (100; 127; 128; 129; 130). Lalić i sar. (100) kod 133 DMD/BMD bolesnika MLPA metodom nalaze 13% više mutacija (7% duplikacija i 6% delecija). Murugan i sar. (127) kod 150 ispitanika nakon prime obe metode, MLPA metodom nalaze 35% više mutacija i takođe, preciznije definisanje granica delecija koje su bile nađene PCR metodom. Prashant i sar. (129) MLPA metodom nalaze 5,6% više delecija kod probanada i, takođe, otkrivaju status nosioca kod 8 žena od 10 ispitanih.

Udruženje Mediteranskih zemalja za mišićne bolesti (The Mediterranean Society of Myology - MSM) obuhvata sledeće zemlje: Francusku, Španiju, Maroko, Algeriju, Tunis, Libiju, Egipat, Jordan, Liban, Siriju, Izrael, Tursku, Kipar, Grčku, Maltu, Albaniju, Makedoniju, Bosnu, Srbiju, Hrvatsku, Sloveniju i Italiju (131). Najveći udeo među mišićnim distrofijama u skoro svim navedenim zemljama imaju Dišenova i Bekerova mišićna distrofija, sa najvećom prevalencom u Tunisu (132). Takođe, registar DMD pacijenata, TREAT-NMD (dostupan na [www.treat-nmd.eu/dmd/](http://www.treat-nmd.eu/dmd/)) (133), prvenstveno je bio ustanovljen u 5 evropskih zemalja (Nemačka, Engleska, Mađarska, Francuska i Italija) da bi se proširio na 31 evropsku zemlju. Prema TREAT-NMD bazi podataka iz 2015 godine, kod 7.149 ispitanika, Bladen i saradnici (42) nalaze velike

mutacije u 80% slučajeva, od toga su 86% bile delecije (jedan egzon ili više) i 14% duplikacije (jedan egzon ili više). Preostalih 20% činile su male mutacije (manje od jednog egzona). U literaturi nalazimo i veliku studiju za Azijsku populaciju (Kina) koja je obuhvatila 1053 DMD/BMD ispitanika, gde su velike mutacije nađene u 70,6% slučajeva, i to 59,4 % delecija i 11,2% duplikacija (134). U radu naših autora, Keckarević i sar. (135), nalaze delecije u 57% bolesnika (kod 16 od 28 ispitanih), sve su bile lokalizovane u distalnom delu DMD gena, a 2/3 slučajeva je bio zahvaćen veći broj egzona. Takođe, autori nalaze odstupanje od Monakovog pravila u 20 % slučajeva.

Za razliku od delecija, duplikacije se znatno ređe javljaju u DMD genu, i prisutne su kod 5-10% DMD bolesnika i kod 5-19% bolesnika sa BMD (38). Ipak, većina autora primenom MLPA metode ne nalazi duplikacije u više od 10-14% DMD/BMD bolesnika (45;42). Kao što je već rečeno, delecije uglavnom nastaju kao posledica nejednakog krosing-overa tokom oogeneze, dok duplikacije češće nastaju zbog događaja tokom spermatogeneze (grandpaternal germline), zastupljenije su u familijama, što povećava rizik rekurencije. U osnovi, duplikacije mogu nastati istim mehanizmom kao i delecije, ali je analiza tačaka prekida pokazala da verovatnije nastaju usled sintezis-zavisnog povezivanja nehomologih krajeva (41). Osim što se ređe javljaju, i sama distribucija duplikacija u DMD genu je veoma različita, a najčešće su lokalizovane u blizini 5' kraja DMD gena. Kao najučestalija duplikacija jednog egzona prisutna je duplikacija egzona 2 (41). Kada su u pitanju duplikacije većeg broja egzona, prema TREAT-NMD DMD Global database, najčešće su u literaturi opisivane duplikacije egzona 3-7; 8-9; 8-11; 8-12; 5-7; 56-62 (42).

U našem istraživanju kod 72 probanda primenom obe metode, PCR i/ili MLPA, otkriveno je 49 velikih mutacija što iznosi 68,1%, a od toga su delecije činile 87,7% (N=43), a duplikacije 12,3% (N=6). Delecije i duplikacije su obuhvatile veći broj egzona u 79,6% slučajeva, dok su mutacije jednog egzona bile prisutne kod 20,4% probanada. Ni delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 22 probanda, odnosno 30,1%, a kod jednog probanda MLPA analiza nije bila uspešna (1,4%). Sagledavajući fenotip probanda u odnosu na nađene mutacije, utvrdili smo da su delecije bile nađene kod 22 (44,9%) DMD bolesnika i 21 (42,8%) BMD bolesnika, dok su duplikacije bile prisutne kod 4 (8,2%) DMD i 2 (4,1%) BMD bolesnika. Ni delecije ni duplikacije nisu bile nađene kod 4 (18,2%) DMD bolesnika i 18 (81,8%) BMD bolesnika.

Distribucija nađenih velikih mutacija u našem uzorku je bila tipična tj. najveći broj njih je bio lokalizovan u „vrućim tačkama” DMD gena. Kod 8 ispitanika (16,3%) delecije i duplikacije su obuhvatile egzone 2-20, a kod 31 ispitanika (63,3%) egzone 44-55. Kod izolovanih DMD/BMD slučajeva, kao što su najvećim delom bili i naši ispitanici, zapaženo je da se delecije i duplikacije u 70% slučajeva javljaju u distalnom delu gena (39), što je približno bio slučaj i u našem istraživanju (63,3%). U odnosu na fenotip probanda, od 8 ispitanika kod kojih su velike mutacije zahvatile proksimalni deo DMD gena (egzoni 2-20), 5 bolesnika je bilo sa DMD fenotipom i 3 BMD fenotipom. Od 31 ispitanika kod kojih su velike mutacije bile lokalizovane u distalnom delu DMD gena (egzoni 44-55), značajno više je bilo bolesnika sa BMD fenotipom (20 BMD i 11 DMD). Takođe, najčešće je bila prisutna delecija egzona 45-48, kod 6 BMD bolesnika, što je tipična lokalizacija za Bekerovu mišićnu distrofiju umerenog toka, ali često sa varijabilnošću u kliničkoj slici (65;136;62;63). Naime, kod većine BMD bolesnika sa delecijom egzona 45-55 je prisutna blaža forma bolesti, ali su opisani i teži slučajevi sa razvijenom kardiomiopatijom što se objašnjava različitim tačkama prekida u genu (137). Od delecija jednog egzona u našem uzorku potvrđene su delecije egzona 1, 44, 50 i 59, kod 5 DMD bolesnika, i delecije egzona 13, 43 i 48 kod 4 BMD bolesnika. Kod jednog DMD bolesnika je bila prisutna duplikacija egzona 2.

Kao što je ranije navedeno, strukturna i funkcionalna organizacija DMD gena podrazumeva 4 različita domena: N-terminalni domen, štapićasti domen, cisteinski domen i C-terminalni domen. Parcijalne delecije ili duplikacije u genu za distrofin mogu obuhvatiti samo jedan domen ali, ne retko, ovakvi defekti zahvataju dva domena (ili više) a njihov fenotipski efekat može da bude različit. Najveći broj nađenih delecija i duplikacija u našem istraživanju su bile lokalizovane u štapićastom domenu u 85,7% slučajeva, i to kod 19 DMD i 23 BMD bolesnika. Pomenuto je da štapićasti domen distrofina čini najveći deo proteina (egzoni 9-62), sa 24 ponovaka sličnih spektrinu i četiri zglobna mesta bogata prolinom koja daju fleksibilnost proteinu. Takođe, u blizini središnjeg dela domena nalazi se drugo vezujuće mesto (ABD-2) kojim, zajedno sa ABD-1 N-terminalnog domena, protein gradi jaku bočnu vezu sa aktinskim filamentima, a sa druge strane preko cistein bogatog domena vezu sa C-terminalnim krajem (17). Smatra se da ovaj domen sadrži celine koje imaju različit funkcionalni značaj, pa je lokalizacija mutacije važna za nastanak fenotipa. U našem uzorku, 23

BMD bolesnika su imala mutaciju koja je obuhvatila proksimalni i središnji deo štapićastog domena. Prema Beggs i sar. (65) ova lokalizacija uglavnom daje BMD fenotip blage progresije. Osim toga, poznato je da velike mutacije u ovom domenu, ukoliko ne remete okvir čitanja i imaju očuvan N-terminalni i C-terminalni region, daju BMD fenotip u više od 60% slučajeva (60). Kod naših ispitanika najveća nađena delecija je bila prisutna kod jednog BMD bolesnika i obuhvatila je 31 egzon (egzoni 12-43) i bila je u okviru čitanja genetičke šifre. Takođe, kod dva rođena brata nađena je delecija egzona 45-76 (ukupno 31 egzon), a zahvatila je štapićasti, cisteinski i C-terminalni domen što, osim gubitka velikog broja egzona, značajno remeti i spregu sa proteinima sarkoleme i vodi DMD, što je i bio slučaj kod ova dva ispitanika. Najveću duplikaciju imao je jedan DMD bolesnik, sa lokalizacijom u štapićastom domenu, i obuhvatila je dve lokacije: egzone 18-42 i egzone 45-48 (27 egzona). U literaturi najveća opisana delecija, koja je bila u okviru čitanja, zahvatila je 46 egzona i dovela je do DMD (138), a od duplikacija ona koja je obuhvatila 40 egzona i takođe uslovlila težu kliničku sliku (45). Od otkrivenih delecija jednog egzona sve, osim za jednog bolesnika, su bile lokalizovane u štapićastom regionu (egzoni 13,43,44,48,50,59). Takođe, dva BMD probanda su imala deleciju egzona 48, koji uzrokuje veoma blagu, praktično asimptomatsku formu bolesti (66), dok je jedan BMD proband imao deleciju egzona 13, a jedan deleciju egzona 43. Ostale delecije jednog egzona dovele su do DMD fenotipa.

Delecije i duplikacije koje su obuhvatile samo N-terminalni domen bile su prisutne kod tri DMD bolesnika – delecija egzona 1, sa i bez zahvaćenog promotora, i duplikacija egzona 2. Za još dva DMD bolesnika delecije su zahvatile N-terminalni i štapićasti domen. N-terminalni domen (egzoni 1-8) sadrži tri aktin-vezujuća mesta preko kojih se protein distrofin vezuje sa citoskeletnim aktinom (16). Mutacije u ovom delu bitno remete stabilnost distrofinske sprege i smanjuju afinitet za povezivanje sa F-aktinom, što rezultuje težom kliničkom slikom (57). Procenjeno je da oko 7% DMD bolesnika ima mutaciju u ovom domenu (za naš uzorak 6,9%), i da su najčešće zahvaćeni egzoni 2-7, a kao duplikacija najčešće egzon 2 (123). Kod BMD bolesnika prisustvo mutacija u ovom domenu, dovodi do nižeg nivoa distrofina i takođe uslovljava težu kliničku sliku.

Prema Monakovom pravilu, out-of-frame mutacija korelira sa težom kliničkom slikom kod DMD bolesnika, dok in-frame mutacija daje blažu formu bolesti tj. BMD fenotip. Odstupanje od ovog pravila većina autora nalazi u 10% DMD/BMD slučajeva (55). Na

primer, Koenig i sar. (9), od 258 bolesnika očekivani fenotip nalaze kod 92% ispitanika. Međutim, novije studije ukazuju da duplikacije, koje su češće prisutne kod BMD, rezultuju odstupanjem od Monakovog pravila čak u preko 30% slučajeva (38;45).

Delecije i duplikacije koje su bile nađene kod naših bolesnika analizirali smo pomoću Reading frame checker-a (version 1.9) (139), i utvrdili njihovu povezanost sa fenotipom koji je imao proband. U 46,8% slučajeva su bile prisutne in-frame mutacije, dok su kod 53,2% bile prisutne out-of frame mutacije. Takođe, kod 21 (91,3%) DMD probanada bila je prisutna out-of frame mutacija, odnosno kod 2 (8,7%) DMD probanda in-frame mutacija (del 33,34 i del 3-15). Kod BMD probanada, njih 20 (83,3%) je imalo in-frame mutaciju, a 4 (16,7%) out-of frame mutaciju (delecije: 43,44-48, 44-49 i dupl 18-27). U literaturi nalazimo objašnjenja za ovakva odstupanja. Razlog nastanka BMD fenotipa kod bolesnika sa out-of frame mutacijom je u pojavi alternativnog splajsovanja koji, mehanizmom preskakanja egzona vodi ponovnom uspostavljanju okvira čitanja i stvaranju skraćenog, ali funkcionalnog distrofina (140;38). Sa druge strane, prisustvo in frame mutacije koja remeti 5' vezujuće mesto u genu vodi DMD, sa tipičnim početkom u 3 ili 4 egzonu pružajući se i u štapićasti domen (58;61), kao što je bio slučaj i kod našeg DMD bolesnika (del 3-15). Druga mogućnost je da velike in-frame mutacije, veće od 36 egzona, stvarajući isuviše mali protein da bi mogao biti funkcionalan, što takođe rezultuje težim DMD fenotipom. Očigledno da povezanost genotipa sa fenotipom, osim veličine, lokacije i stanja okvira čitanja, pokazuje i druge složene uticaje koji mogu menjati kliničku sliku kod bolesnika.

Od 22 ispitanika kod kojih nisu bile nađene delecije ni duplikacije, 18 je bilo sa fenotipom Beker. Mogući razlozi su, ili prisustvo tačkaste mutacije koja nije mogla biti detektovana primenjenim metodama, ili je kod ovih bolesnika bila u pitanju neka druga miopatija. Kako BMD pokazuje širok spektar u kliničkoj slici, od granične sa DMD - do veoma blagih miopatija, to ovakav fenotip može imati sličnosti sa drugim tipovima mišićne distrofije ili metaboličkim miopatijama. Posebna sličnost u kliničkoj slici je prisutna između Bekerove mišićne distrofije i udno pojasne mišićne distrofije (engl. Limb-girdle muscular dystrophy, LGMD). Ispitujući 33 pacijenta sa sumnjom na BMD, odnosno LGMD, Norman i sar. (141) nalaze delecije u DMD genu kod 72% pacijenata koji su imali BMD fenotip i 27% delecija kod onih za koje se mislilo da imaju LGMD. Autori zaključuju da svi muškarci sa progresivnom mišićnom distrofijom udno

pojasnog tipa, treba da budu rutinski testirani na mutacije u DMD genu (141). Diferencijalna dijagnoza između ova dva entiteta je od značaja za prognozu bolesti, ali i za genetičko savetovanje s obzirom da se BMD nasleđuje X-vezano recesivno, a LGMD autozomno recesivno/dominantno.

U našem uzorku za 4 BMD bolesnika je zaključeno da je bila u pitanju LGMD, dok je kod dva bolesnika sa sumnjom na LGMD to bilo i potvrđeno. Takođe, za tri BMD pacijenta dalja ispitivanja metodom sekvenciranja pokazala su da je kod dva pacijenta bila prisutna mutacija CAPN3 gena (oba su bili složeni heterozigoti), dok je kod jednog probanda rezultat primenjenog genskog panela za mišićnu distrofiju bio negativan. Takođe, MLPA analiza kod jednog BMD probanda je pokazala mutaciju u SMN1 genu (spinalna mišićna atrofija tip 3).

U DMD/BMD dijagnozi i predviđanju rizika kod potomstva, od velikog je značaja utvrđivanje ženskih nosioca mutacije. Kompleksnost otkrivanja ženskih nosioca leži u činjenici da su one uglavnom fenotipski zdrave, u 5- 8% slučajeva mogu biti manifestni nosioci mutacije, a svega polovina žena nosioca ima povišene vrednosti CPK u serumu. Multipleks PCR metoda koja kod probanada otkriva 98% delecija u genu za distrofin se ne može primeniti u detekciji žena nosioca jer, zbog prisustva dva X hromozoma u somatskim ćelijama kod žena, delecije kod nosioca bivaju maskirane amplifikacijom normalnog X hromozoma. Ranije je za utvrđivanje ženskih nosioca uglavnom korišćena analiza vezanosti primenom RFLPs markera koji su bili detektovani pomoću Southern blot analize (142). Novije metode za detekciju žena nosioca su kvantitativni PCR i MLPA metoda, pogotovu u slučajevima kada je kod probanda već utvrđena delecija ili duplikacija. Kvantitativni PCR (qPCR) odnosno real time PCR tj. PCR u realnom vremenu, utvrđuje da li je specifična sekvenca prisutna u uzorku i u kojoj količini (produkti amplifikacije se mere u realnom vremenu, nakon svakog PCR ciklusa), i može da otkrije delecije i duplikacije u DMD genu kod nosioca (143;144). Ipak, MLPA metoda se pokazala kao suverena u otkrivanju žena koje nose deleciju ili duplikaciju u genu za distrofin i jednostavnija je za primenu u svakodnevnoj praksi od qPCR (145;100;146). Kao što je napred rečeno, kada se delecije ili duplikacije ne otkriju u DMD genu, traga se za tačkastim mutacijama, a najpouzdanija je metoda sekvenciranja gena koja daje tačan raspored nukleotida, tj. primarnu strukturu ispitivanog regiona. Ipak, zbog izuzetne veličine DMD gena i slučajnog rasporeda promena u genu, i dalje je

aktuelna napred pomenuta indirektna molekularno genetička dijagnostika tj. analiza vezanosti (engl. linkage analysis). Danas se u analizi vezanosti primenjuju dinukleotidni mikrosatelitni markeri, odnosno STR markeri, koji su se pokazali veoma informativnim (147;53;148), a kombinovanje više intragenskih markera povećava preciznost u zaključivanju. Osim određivanja statusa prenosioca mutacije, ovom metodom se mogu otkriti žene prenosioci delecije na osnovu gubitka heterozigotnosti za polimorfni dinukleotid u deletiranom regionu. Takođe, analiza vezanosti može pružiti informacije o statusu nosioca i kada nije poznata mutacija kod probanda, kao i o drugim događajima u DMD genu kao što su rekombinacije i prisustvo gonadnog mozaicizma (149).

U cilju utvrđivanja statusa ženskih nosioca mutacije, u našem istraživanju su bile primenjene MLPA metoda i analiza vezanosti (linkage analiza). Uzorak je činilo 69 ženskih članova iz 44 porodice probanada. Ispitivanje je obuhvatilo 40 majki probanada, 17 sestara probanada (15 rođenih i 2 sestre po majci), 2 ćerke (gde je otac bio proband), 3 sestričine (gde je ujak bio proband), 4 tetke (majčine sestre) i jednu baku (po majci), a za 2 ženska člana podatak o srodstvu nije bio pouzdan (kod porodice je rađena analiza vezanosti, ali je marker bio neinformativan).

Samo MLPA metodom je bilo ispitano 58 ženskih članova iz 41 porodice DMD/BMD probanada. Od toga, u 40 porodica u pitanju je bio izolovan tj. sporadičan DMD/BMD slučaj, a kod jedne porodice su bila zahvaćena dva rođena brata. Kod svih DMD/BMD probanada, osim u dva slučaja, su bile detektovane delecije ili duplikacije. U ta dva slučaja, gde nam nije bio poznat mutacioni status kod probanda, indikacija za MLPA analizu kod ženskih srodnika je bila postavljena na osnovu anamnestičkih podataka o obolelom. Uglavnom je u porodicama bila testirana majka probanda, a kod 12 porodica probanada (4 DMD i 8 BMD) MLPA metodom je bilo ispitano više od jednog ženskog srodnika. Ispitivanje je obuhvatilo 37 majki probanada, 14 sestara probanada (13 rođenih i jedna sestra po majci), 2 ćerke (otac je bio proband), 3 sestričine (ujak je bio proband), 1 tetku (majčina sestra) i jednu baku (po majci).

Od 58 ispitanih ženskih članova MLPA analiza nije uspela kod njih 5 (četiri sestre i jedne majke). Od 53 uspele MLPA analize, kod njih 21 (39,6%) su bile nađene velike mutacije, dok u 32 (60,4%) slučaja nisu bile nađene delecije ni duplikacije. Mutacije su



nađene kod 17 majki probanada, 1 sestričine, 1 bake i obe ćerke gde je otac bio proband.

Ranije smo naveli da se kod izolovanih slučajeva Dišenove mišićne distrofije procenjuje da su 2/3 majki nosioci mutacije, da 5-10% ima gonadni mozaicizam, dok je u 25-30% slučajeva u pitanju nova mutacija (67). Takođe, zbog rane smrtnosti DMD bolesnika 1/3 mutacija biva eliminisana iz populacije, ali se taj broj kompenzuje pojavom novih mutacija u narednoj generaciji. Utvrđeno je da, *de novo* delecije najčešće vode poreklo iz oogeneze, dok duplikacije i tačkaste mutacije nastaju uglavnom tokom spermatogeneze (150). Međutim, ne mali broj autora nalazi da je učestalost majki nosioca manja od očekivane, što sugeriše da je procenat novonastalih mutacija u DMD genu veći. U izolovanim tj. sporadičnim DMD slučajevima Murugan i sar. (146) nalaze učestalost od 29% za žene koje su nosioci delecije, dok su novonastale mutacije činile 71%. Ovako nađena učestalost nosioca je u suprotnosti sa teoretskim podacima iz literature, ali u skladu sa činjenicom da su delecije uglavnom *de novo* promene u DMD genu. Takođe, autori zaključuju da je verovatnoća da će biti nosioci veća kod drugih tipova mutacija, duplikacija i tačkastih mutacija, i da iznosi 55-63% (146). Taylor i sar. (151), kod izolovanih DMD slučajeva u porodici, nalaze da su majke bile potvrđene kao nosioci u 40% slučajeva, što je takođe niže od procenjenih 2/3. Dastur i sar. (152) kod majki DMD/BMD probanada potvrđuju status nosioca kod 50%, odnosno 63,9% samo za delecije i duplikacije (153). Takođe, Siha i sar., (51), nalaze DMD/BMD majke kao nosioce u 38,7% slučajeva, odnosno nove mutacije u 61,3%.

U našem istraživanju, od 37 ispitanih majki probanada, njih 17 (45,9%) su bile potvrđene kao nosioci. Kod izolovanih DMD slučajeva majke su bile nosioci u 50%, a kod izolovanih BMD slučajeva u 37,5%. Takođe, od 17 majki koje su bile potvrđene kao nosioci, njih 14 (82,4%) su imale deleciju, od toga su kod 10 (71,4%) majki delecije obuhvatile distalni deo gena između egzona 45-55. Ovakv raspored nađenih delecija odgovara distribuciji delecija i kod probanada čije majke nisu bile potvrđene kao nosioci. Duplikacije su bile nađene kod 3 majke (17,6%), a njihova distribucija u genu je bila heterogena.

Ako sagledamo DMD/BMD slučajeve samo sa delecijom, onda su majke bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva (14 majki od 25), a u DMD/BMD slučajevima sa

duplikacijom majke su bile nosioci u 75% slučajeva (3 od 4 majke). Kod 19 (51,4%) majki probanada nisu bile nađene delecije ni duplikacije. Kod jedne majke (2,8%) nije uspela MLPA analiza.

Kod svih majki, analizirali smo fenotip njihovih sinova-probanada, i utvrdili da je kod 21 (56,7%) probanda bio prisutan DMD fenotip, a kod njih 16 (43,3%) BMD fenotip. Od 21 probanda sa DMD fenotipom kod 8 (38,1%) majki je nađena delecija, kod 3 (14,3%) duplikacija, a kod 10 (47,6%) majki nisu bile nađene delecije ni duplikacije. Od 16 probanda sa BMD fenotipom, 6 (37,5%) majki je imalo deleciju, kod 9 (56,2%) majki nisu bile potvrđene delecija ni duplikacija, a kod jedne majke nije uspela analiza. Stopa novih mutacija izračunata na ovom uzorku iznosi ukupno 51,4%, odnosno 45,5% za DMD bolesnike i 60% za BMD bolesnike.

Upoređujući mutacije koje su nađene kod majki i mutacije kod njihovih obolelih sinova, utvrdili smo da je delecija kod jedne majke bila veća nego kod sina, kod jedne majke delecija je bila manja nego ona koja je nađena kod sina, dok su sve ostale majke imale istu mutaciju koju je imao oboleli sin.

Na osnovu iznetog, možemo reći da su u našem uzorku, primenom MLPA metode, majke DMD/BMD probanada bile potvrđene kao nosioci u 45,9% slučajeva, što je u skladu sa nalazima autora koje smo prethodno naveli. U izolovanim DMD slučajevima majke su bile nosioci u 50% slučajeva, za razliku od predviđenog rizika od 67-76% (154), ali približno vrednosti od 57,6% koju nalaze i Lee i sar. (155). Razlog bi mogao biti u činjenici da je mogućnost postavljanja DMD dijagnoze kod nosioca i detekcija zahvaćenih plodova u prenatalnoj dijagnozi, dovela do smanjenja broja dece rođene od majki nosilaca (155;156). Za izolovane BMD slučajeve iz našeg uzorka, učestalost otkrivenih majki nosilaca je iznosila 37,5%, što je daleko niža vrednost od 89,5% koju nalaze Lee i sar. (155). Naime, očekivano veći procenat nosioca kod BMD majki je u skladu sa činjenicom da lakša klinička slika kod BMD omogućuje ovim bolesnicima da imaju potomstvo i prenesu X hromozom svojim ćerkama, čime se bolest prenosi u narednu generaciju. U našem uzorku 56,2% BMD probanada nije imalo deleciju ni duplikaciju, već moguće tačkastu mutaciju (koja nije mogla biti otkrivena primenjenim metodama ni kod probanada ni kod majki) ili neku drugu miopatiju, pa ni njihove majke nisu mogle biti potvrđene kao nosioci, čime bi se mogao objasniti dobijeni nalaz.

Kada govorimo o *de novo* mutaciji većina autora se slaže da je za predviđanje rizika nosioca od značaja koji je tip mutacije u pitanju. Već smo naveli da je verovatnoća da će biti nosioci veća za duplikacije i tačkaste mutacije, i da iznosi 55-63% (146), kao i da su delecije uglavnom *de novo* mutacije. Lee i sar. (155) nalaze sledeće učestalosti majki nosioca prema tipu mutacije kod probanda - 53,5% za delecije, 66,7% za duplikacije i 67,9% za tačkaste mutacije. U našem uzorku, kada su u pitanju delecije, majke su bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva, a kod duplikacija u 75% slučajeva. Ovi podaci su u skladu sa navedenim, tj. da je veći rizik da majka bude nosioc kod duplikacija nego u slučaju delecija, odnosno da su delecije češće *de novo* mutacije. Najčešća lokalizacija otkrivenih delecija kod majki bila je u distalnom delu DMD gena, kod 71,4% slučajeva, što nalaze i drugi autori - 72% (39), odnosno 76% (148).

Kada je bilo reči o našem ukupnom uzorku ispitivanih, navedeno je da je bilo 4 familijarna slučaja gde su bila zahvaćena po dva sina u porodici. U tim porodicama MLPA analiza je bila sprovedena samo kod jedne majke i kod nje je potvrđeno prisustvo delecije koju imaju i oba sina (DMD). Kod jedne porodice MLPA analiza koja je rađena samo sinovima nije pokazala prisustvo delecije ni duplikacije, a daljim ispitivanjem je utvrđeno da se radilo o drugom tipu miopatije (LGMD). Kod preostale dve porodice, MLPA analizom su bile otkrivene delecije kod sinova (braće) od kojih su dva imala DMD a dva BMD fenotip, dok njihovim majkama nije bila rađena MLPA analiza. Kako nam nije bio poznat mutacioni status ove dve majke, na osnovu činjenice da svaka ima po dva obolela sina, prema porodičnom modelu svrstavamo ih u verovatne prenosioce mutacije. Ukoliko se molekularnom analizom kod majki ne bi potvrdila konstitutivna mutacija prisutna i u somatskim ćelijama, razmatrala bi se mogućnost prisustva gonadnog mozaicizma kod majke. Prema ovim kriterijumima učestalost gonadnog mozaicizma kod majki u našem uzorku iznosi 5,1% (što je u skladu sa podacima iz literature).

Rezultati MLPA analize kod ostalih ženskih srodnika su pokazali prisustvo mutacije u 25% slučajeva. Status prenosioca je utvrđen kod 1 bake po majci obolelog dečaka, kao i kod obe ćerke gde je otac bio BMD proband. Od 14 ispitanih sestara probanada kod njih 10 nisu bile nađene mutacije, dok kod 4 sestre analiza nije uspela. Od tri ispitivane sestričine čije je ujak proband nađena je delecija kod 1 ispitanice. Jedna tetka (majčina sestra) takođe nije imala mutaciju. Analizom dobijenih mutacija zaključili smo da obe

ćerke nose istu deleciju koju ima njihov otac (BMD), sestričina nosi istu deleciju kao oboleli ujak (BMD), a baka ima istu deleciju kao njena ćerka i unuk (DMD).

Kada familijarna mutacija ne može biti identifikovana, za majku koja je obavezni prenosilac mutacije, rizik da njena ćerka bude prenosilac mutacije iznosi 50%. Ukoliko je, pak, kod ćerke MLPA nalaz negativan rizik da je ona nosilac iznosi 26,5%, a ako je kod ćerke negativan nalaz MLPA i sekvenciranja gena, onda taj rizik iznosi 3% (150).

Kod jedne grupe probanada i njihovih ženskih srodnika bila su sprovedena i druga ispitivanja. Tako, kod jednog BMD probanda, njegove majke i dve sestre gde MLPA analiza nije bila uspešna, daljim ispitivanjem metodom skvenciranja gena kod jedne sestre otkrivena mutacija u FHL1 genu (Emery-Dreifuss mišićna distrofija); u drugom slučaju, majka i dve sestre jednog BMD probanda su bile heterozigoti za tačkastu mutaciju u DMD genu, što je takođe otkriveno metodom sekvenciranja gena. Kod 6 porodica iz ove grupe probnada je bila sprovedena i analiza vezanosti, a još kod 1 porodice, gde je otac bio BMD proband, dalje je bila primenjena prenatalna dijagnoza kod njegove dve ćerke u trudnoći (o čemu će dalje biti reči).

Kao što je napred pomenuto, analiza vezanosti je indirektna metoda i podrazumeva praćenje nasleđivanja polimorfnih DNK markera koji se nalaze u okviru DMD gena ili u njegovoj blizini. Ova metoda je od značaja kada se kod probanda ne nađe delecija ni duplikacija, pa se na osnovu forme DNK markera koju ima proband indirektno prati nasleđivanje tog markera, odnosno X hromozoma sa mutacijom, u porodici.

Prema iskustvima mnogih autora analiza veznosti daje značajne informacije o statusu nosioca. Analizom pomoću 6 RFLPs markera Malayeri i sar. (157) nalaze da su isti bili informativni za Iranske porodice u više od 80% slučajeva, i da je metoda laka za izvođenje uz manje troškova. Takođe, analizom vezanosti pomoću RFLPs markera, González-Herrera i sar. (158) (Španija) otkrivaju 66,7% ženskih nosioca, a najinformativniji markeri su bili pERT 87-8/TaqI i MP1P. Ferrerio i sar. (149) nalaze da je STR analizom bilo moguće dijagnostikovati kao nosioce ili ne, 75% žena sa familajarnim slučajevima DMD/BMD, sa verovatnoćom od 95-100%, odnosno sa istom verovatnoćom isključiti kao rizične 32% žena iz sporadičnih DMD slučajeva. Za STR markere 5'DYS II, STR44, STR45, STR49, STR50 and 3'DYS MS, u detekciji ženskih DMD/BMD nosioca u istočnoj Indiji, informativnost se kretala – 80%, 57%, 57%, 71%,

73% i 43% (148). Delgado-Luengo i sar. (159) (Španija) ispitivanjem 68 ženskih članova iz porodica sa jednim ili više obolelih DMD/BMD članova, primenom STR markera - STR44, STR45, STR49, STR50, STR3'DYS, utvrđuju definitivnu dijagnozu kod 79% ispitanica. Autori nalaze 39,7% ženskih nosioca, 39,7% koje nisu bile potvrđene kao nosioci, dok u 20,58% nije bilo moguće utvrditi status nosioca. Takođe, za 3 slučaja nije mogao biti isključen gonadni mozaicizam (159). Analiza vezanosti odabirom četiri visoko informativna STR markera, koja leže unutar vrućih tačaka u distalnom delu DMD gena, može pokazati gubitak heterozigotnosti kod žena-nosilaca, pružajući direktne dokaze o njihovom statusu. U 14 od 15 (93%) porodica sa delecijama u distalnom delu gena, STR markeri su dali direktne informacije o statusu nosioca, a u nekim slučajevima i informacije o tačkama prekida u genu i rekombinaciji (160). Mukherjee i sar. (52) takođe zaključuju da je analiza vezanosti dinukleotidnim mikrosatelitnim markerima važna u dijagnozi *de novo* mutacija. Primenom četiri STR markera, odabrana na osnovu lokalizacije deletiranih regiona kod probanada (29 sporadičnih slučajeva), autori nalaze heterozigotnost u deletiranom regionu kod 18 majki, što sugeriše pojavu *de novo* mutacije. U 9 slučajeva, nije bio određen status nosioca, dok je u 2 slučaja pokazao gonadni mozaicizam (52).

Ipak, uprkos velikom broju intragenskih DNK polimorfizama, i iznetim pozitivnim iskustvima autora, kod analize vezanosti je prisutna doza neizvesnosti u predviđanju ishoda i prenatalnoj dijagnozi Dišenove i Bekerove mišićne distrofije. Razlozi leže u izuzetnoj veličini DMD gena, slučajnom rasporedu mutacija i visokoj stopi intragenskih rekombinacija (103). Tako Taylor i sar. (151) ispitivanjem 967 žena koje su bile u riziku za nosioca, zaključuju da se na osnovu standardne procedure, što uključuje - povišene vrednosti CPK, pedigree i analizu vezanosti, status nosioca može utvrditi kod 67% žena. Takođe, samo analizom vezanosti autori otkrivaju 47% žena koje su nosioci pri čemu je „...analiza vezanosti bila najproduktivnija među rođacima prvog i drugog stepena u porodicama u kojima je bilo nekoliko pogođenih pojedinaca, a najmanje efikasna u porodicama izolovanih slučajeva zbog mutacija koje nisu bile delecije...” (151). Takođe, autori su kao dodatne metode primenili MLPA metodu (ili qPCR) i metodu sekvenciranja gena, što je povećalo efikasnost detekcije ženskih nosioca za 33%, tj. 25% MLPA (ili qPCR) metodom i još za 8% metodom sekvenciranja.

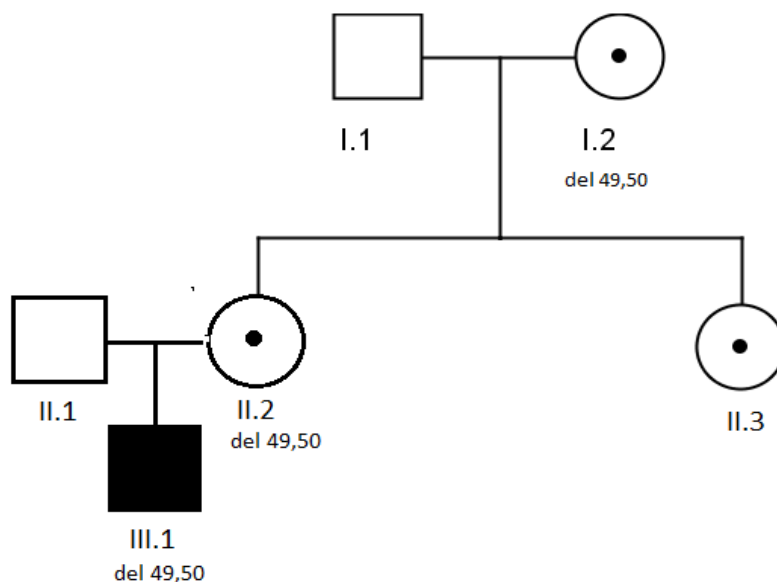
U našem istraživanju analizom vezanosti je bilo ispitano ukupno 37 članova iz 9 porodica sa izolovanim slučajevima probanada (8 DMD i 1BMD), od čega je ženskih članova bilo 20. Kod 6 porodica analiza je rađena u cilju utvrđivanja statusa ženskih nosioca, a kod tri porodice i u cilju prenatalne dijagnoze. Analiza je bila uspešna kod 8 porodica (za jednu porodicu primenjeni markeri nisu bili informativni).

U linkage analizi u našem istraživanju je korišćeno 6 mikrosatelitnih markera: 3'DYS (DXS1234), 5'DYS-II (DXS1242), STR44 (DXS1238), STR45 (DXS1237), STR49 (DXS1236), STR50 (DXS1235) i dva RFLPs markera, pERT87-8taqI i pERT87-15taqI. Marker DXS1237 je bio primenjen kod svih 9 porodica i informativan kod 7 porodica (77,8%); marker DXS1235 je bio primenjen kod 8 porodica, ali informativan kod svega tri porodice (37,5%). Ostali markeri koji su bili korišćeni su pokazali različit stepen informativnosti, ali je broj porodica kod kojih su ovi markeri primenjeni bio mali (1, 2 ili 3 porodice), pa je teško izvoditi šire zaključke. Kod svih probanada prethodno je bio rađen PCR i za tri probanda je bila potvrđena delecija. Takođe je za 7 porodica, nakon analize vezanosti, ispitivanje bilo dopunjeno MLPA metodom kod pojedinih članova.

Od 17 ispitanih ženskih članova (8 porodica) primenom analize vezanosti, za njih 14 (82,3%) je zaključeno da su mogući prenosiooci mutacije. U 7 porodica ispitivanje je bilo dopunjeno MLPA analizom, kod 5 probanada i 9 ženskih članova, što je omogućilo preciznije zaključivanje u svakom pojedinačnom slučaju. Nakon MLPA analize, predviđeni ishodi na osnovu analize vezanosti su bili potvrđeni kod dve majke i jedne bake (po majci), dok očekivani ishodi nisu bili potvrđeni kod 3 majke, ali se u njihovom slučaju ne isključuje mogućnost tačkaste mutacije s obzirom da ni kod njihovih sinova – probanada, nije bila potvrđena mutacija. Kod jedne majke i njene rođene sestre predviđen ishod da će biti nosioci, nije bio potvrđen MLPA analizom. Takođe, na osnovu MLPA analize je potvrđeno da dve sestre jednog probanda ne nose mutaciju, što je i bio očekivan ishod na osnovu analize vezanosti. Za sestru drugog probanda, predviđanje da je mogući prenosilac, nije bilo potvrđeno MLPA analizom, kao ni mutacija kod njenog muškog ploda, za koga je indirektnom metodom utvrđeno da ima isti haplotip kao i njegov oboleli ujak. Kako MLPA nije rađena kod probanda (ujaka), ostaje mogućnost prisustva tačkaste mutacije.

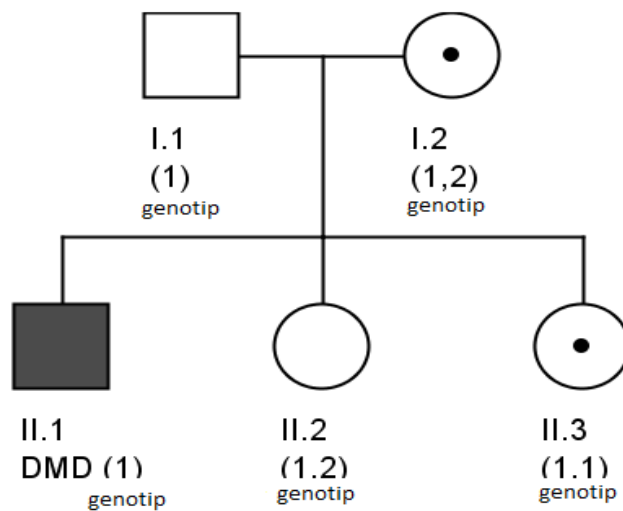
Prikazujemo četiri porodice iz našeg uzorka koje ilustruju primenjene metode:

1. Porodici br. 6 (Tabela 20. iz rezultata). PCR metodom nije bila nađena delecija kod probanda. Kod porodice je primenjena analiza vezanosti korišćenjem 5 polimorfnih markera, na osnovu kojih je zaključeno da dve sestre probanda nisu nasledile X hromozom od majke koji ima oboleo brat. Dalje ispitivanje MLPA analizom je otkrilo duplikaciju egzona 2 kod probanda i njegove majke, dok kod sestara nisu bile detektovane mutacije. U ovom slučaju u potpunosti su bila potvrđena predviđanja formirana na osnovu analize vezanosti, a veći broj primenjenih markera kod porodice je doprineo većoj preciznosti u zaključivanju.
2. Prikaz rodoslova porodice br. 5 (iz rezultata). PCR metodom je kod probanda utvrđena delecija egzona 50. Analizom vezanosti, na osnovu nađenih genotipova, je zaključeno da su baka, majka i tetka probanda nosioci mutacije. Dalje je MLPA analizom kod probanda, majke i bake bila potvrđena delecija egzona 49 i 50. Tetki probanda (majčina sestra) nije rađena MLPA analiza, pa je zaključak izveden samo na osnovu analize vezanosti - da majčina sestra nosi isti X hromozom kao i proband, i da je mogući prenosilac DMD.



Za dve porodice je bila rađena samo analiza vezanosti pa se zaključivanje o statusu nosioca i genetičko savetovanje zasnivalo na ovom nalazu. U jednoj porodici je bio poznat mutacioni status probanda, a u drugoj nije.

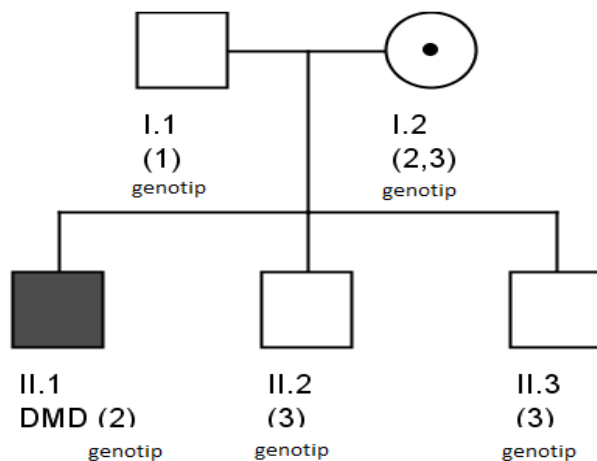
3. Prikaz rodoslova porodice br. 3. (iz rezultata). Proband ima deleciju egzona 6-19. Porodica je bila informativna za STR marker (intron 50) na osnovu koga su utvrđeni genotipovi kod probanda, oca, majke i dve sestre probanda:



Zaključak: Ćerka II.3 je nasledila isti X hromozom od majke koji poseduje oboleli brat, što ukazuje da je prenosilac mutacije. Takođe, ćerka II.2 nije nasledila od majke X hromozom koji ima oboleli brat pa nije prenosilac mutacije.



4. Prikaz rodoslova porodice br. 8. (iz rezultata). Porodici je rađena analiza vezanosti u cilju prenatalna dijagnoze. Mutacioni status probanda nije bio poznat. Porodica je bila informativna za STR marker (intron 45) na osnovu koga su utvrđeni genotipovi kod probanda, oca, majke, zdravog brata probanda i muškog ploda:



Zaključak: Muški plod (II.3) je od majke nasledio isti X hromozom kao i zdrav brat, pa neće bolovati od DMD.

Takođe, analiza vezanosti je bila sprovedena još u dva slučaja u cilju prenatalne dijagnoze kod dva muška ploda. U oba slučaja nije bio utvrđen mutacioni status kod probanada. Na osnovu utvrđenih genotipova za određeni marker, zaključeno je da jedan muški plod neće biti bolestan, dok je kod drugog ploda bio utvrđen rizični haplotip. Kao što je napred pomenuto, kod ploda je urađena dodatna MLPA analiza koja je bila negativna (kao i kod njegove majke), a kako MPLA nije rađena kod probanda ostaje mogućnost prisustva tačkaste mutacije. Napominjemo da u slučajevima negativnog nalaza prenatalne dijagnostike, kada su trudnoće nastavljene, nisu dobijene informacije o eventualnom kasnijem oboljevanju ispitanika.

Kada je u pitanju primena analize vezanosti u cilju prenatalne dijagnoze vrlo ilustrativnu studiju su dali Ward i sar. (161). Ova studija pruža prikaz DMD rizika kod 133 ploda, 60 ženskih i 73 muška ploda, primenom linkage analize (RFLPs markeri). Za ženske plodove procenjen je mogući rizik za nosioca, ali nije bilo prekida trudnoća iz tog razloga. Od 73 muška fetusa za njih 35, autori nalaze DMD rizik manji od 2% (nijedna trudnoća nije bila namerno prekinuta), a od 31 živorođenog dečaka, njih 20 je imalo normalan nivo CPK u serumu. Za 4 muška fetusa je bio predviđen rizik veći od 95%, sve četiri trudnoće su bile dobrovoljno prekinute, a dva fetusa su imala deleciju. 34 muška fetusa su bila sa procenjenim DMD rizikom od 3-95%. Za ovako širok raspon rizika, autori navode nedostupnost obolelog za analizu, neinformativnost markera, prisustvo rekombinacije ili nepoznatu lokalizacija mutacije. Devet trudnoća iz ove grupe je bilo dobrovoljno prekinuto na osnovu predviđenih rizika za datu trudnoću, dok je 25 dečaka bilo živorođeno, od kojih je 17 imalo normalan CPK, a troje povišene vrednosti CPK u serumu. Takođe, autori zaključuju da je veća preciznost predviđanja bila prisutna u porodicama sa više aficiranih članova, nego kod izolovanih DMD slučajeva (161). Shirota i Katayama (162) primenom 8 STR markera, nalaze 6 aficiranih muških plodova od 7 ispitanih, kao i 5 nosioca od 9 ispitanih ženskih srodnika. Takođe, Wang i sar. (163) kombinujući više konvencionalnih metoda i analizu vezanosti, nalaze 34 aficirana muška ploda od 91 ispitanih. Autori smataju da je porodicama sa DMD potrebno predložiti prenatalnu dijagnozu, bez obzira da li je majka potvrđena kao nosioc ili ne.

Veliki napredak u prenatalnoj dijagnozi je donelo otkrivanje ekstracelularne fetalne DNK (engl. cell-free fetal DNA, cffDNA) u plazmi majke tokom trudnoće i uvođenje neinvazivnih prenatalnih dijagnostičkih testova (engl. non-invasive prenatal diagnosis, NIPD). U pitanju je analiza relativnog doziranja haplotipa (engl. relative haplotype dosage analysis - RHDO) za promene na odabranim pojedinačnim genima, pomoću metode sekvenciranja sledeće generacije (engl. Next generation sequencing, NGS). U slučaju DMD/BMD, potrebna je DNK probanda za identifikovanje rizičnog haplotipa, dok je DNK majke potrebna za identifikaciju informativnih heterozigotnih SNP-ova (pojedinačni nukleotidni polimorfizmi), na osnovu kojih se utvrđuje koji je DMD alel nasledio muški fetus od majke (164).

Naše istraživanje je pokazalo da je u analizi vezanosti od primenjenih markera najinformativniji bio marker DXS1237 (77,8%). Takođe, na osnovu rezultata dobijenih samo analizom vezanosti za 8 porodica učestalost ženskih hetrozigota je iznosila 82,3%. Dodatna MLPA analiza koja je bila sprovedena u 7 porodica potvrdila je ishode na osnovu analize vezanosti kod 55,5% ispitanica, tj. nosioce u 33,3% slučajaja, odnosno da nisu nosioci u 22,2% slučajaja. Naime, kod dve porodice (28,6%) je bio potvrđen ishod za nosioce koji je bio predviđen na osnovu analize vezanosti; kod četiri porodice (57,1%) nije mogla biti isključena tačkasta mutacija, ali je u dve porodice na osnovu analize vezanosti bio predviđen povoljan ishod, s obzirom da muški plodovi nisu nasledili X hromozom koji imaju njihova obolela braća; a za jednu porodicu (14,3%), MLPA analizom kod majke nije bila potvrđena delecija koju ima njen oboleli sin, pa se zaključuje da ni ona ni njena rođena sestra nisu prenosiooci mutacije.

Sumirajući izneto, može se reći da analiza vezanosti daje važne informacije o nasleđivanju markera u porodici, za probanade sa poznatim mutacionim statusom, i posebno kod probanada kod kojih nam taj status nije poznat, pa je analiza vezanosti u tom slučaju metoda izbora. Praćenjem polimorfnog markera X-hromozoma aficiranog deteta, moguće je utvrditi prisustvo ili odsustvo rizičnog hromozoma kod majke i drugih braće i sestara, što je važan aspekt u pružanju genetskog saveta porodicama i prenatalnoj dijagnozi. Metoda se pokazala vrlo korisnom kod isključivanja statusa nosioca među ženskim članovima u porodici. Ipak, moraju se imati u vidu i ograničenja analize vezanosti kada su u pitanju neinformativni genotipovi, rekombinacije unutar DMD gena i prisustvo gonadnog mozaicizma kod majke. Preciznost u zaključivanju moguće je povećati primenom većeg broja polimorfnih markera kod porodice. Takođe, predviđanje ishoda analizom vezanosti daje pouzdanije rezultate kod familijarnih DMD/BMD slučajeva.

Ipak, zbog karakteristika samog DMD gena i promena koje u njemu mogu nastati, dodatne metode kao što su MLPA i metoda sekvenciranja gena, daju pouzdane podatke o mutaciji kod probanda i statusu nosioca kod žena, što je od značaja za davanje adekvatnog genetskog saveta i prenatalnu dijagnozu. Međutim, ako se kod majke probanda ni tada ne utvrdi mutacija u somatskim ćelijama, rizik oboljevanja muškog ploda u narednoj trudnoći je mali, ali i dalje ostaje mogućnost da majka ima gonadni mozaicizam. Kako je ranije navedeno, kada se u majčinim limfocitima ne utvrdi

mutacija, tada rizik rekurencije kod braće sporadičnih slučajeva sa istim haplotipom iznosi 14%, odnosno 7% ako je rizični haplotip nepoznat (75). Majka koja nema mutaciju, a ima više od jednog zahvaćenog deteta, ima rizik rekurencije od 25-30% (76). Kada postoji sumnja na gonadni mozaicizam kod majke, u svakoj narednoj trudnoći treba savetovati prenatalnu dijagnozu, s obzirom da je rizik kod gonadnog mozaicizma nepredvidiv i zavisi od veličine mutiranog klona.

Metode prenatalne dijagnoze omogućavaju otkrivanje oštećenja ili oboljenja ploda pre njegovog rođenja. Kako još uvek nema efikasne terapija za Dišenovu mišićnu distrofiju, to otkrivanje ženskih nosioca i prenatalna dijagnoza predstavljaju važan korak u prevenciji ove bolesti. Porodice sa DMD/BMD istorijom su pod većim rizikom, pa je utvrđivanje nosioca među ženskim članovima u porodici od velikog zanačaja, a time i davanje genetskog saveta. Kada su u pitanju izolovani slučajevi obolelih u porodici, za davanje adekvatnog genetskog saveta, potrebno je utvrditi da li majka probanda nosi mutaciju ili ne, s obzirom da je 1/3 mutacija kod probanda novonastala.

Prvi pokušaji prenatalne dijagnoze su se svodili na određivanje pola fetusa i na eliminaciju muških plodova, bez obzira da li bi oni bili bolesni ili ne. Drugi pristup, na osnovu određivanja biohemijskih markera kod ploda kao što su intracelularni kalcijum, fetalna karboanhidraza i keratin kinaza, nije dao pouzdane rezultate (165;166). Takođe, jedna od oprobanih metoda je biopsija mišića ploda i imunohistohemijska analiza prisustva distrofina u uzorku, mada je opisan mali broj slučajeva. Za ovu analizu je uziman uzorak iz glutealne regije kod ploda između 18-23 nedelje gestacije, a spontani pobačaj posle izvođenja biopsije je bio prisutan u 17% slučajeva (167). Prenatalna molekularno genetska dijagnoza, direktna ili indirektna, omogućila je pouzdanije utvrđivanje promena u DMD genu i statusa ženskih nosioca, a samim tim i genetsko savetovanje. Ipak, za svaku porodicu je potrebno odrediti adekvatan tip analize DMD gena u zavisnosti od prethodno utvrđenog mutacionog statusa probanda i majke. Standardni uzorci za prenatalnu dijagnozu kod ploda podrazumevaju uzorak horionskih resica, plodove vode ili uzorak krvi ploda iz pupčanika.

Naše istraživanje je obuhvatilo 11 slučajeva (15 trudnoća) kod kojih je bila indikovana prenatalna molekularno genetska DMD/BMD dijagnostika. Za 12 trudnoća (8 trudnica)

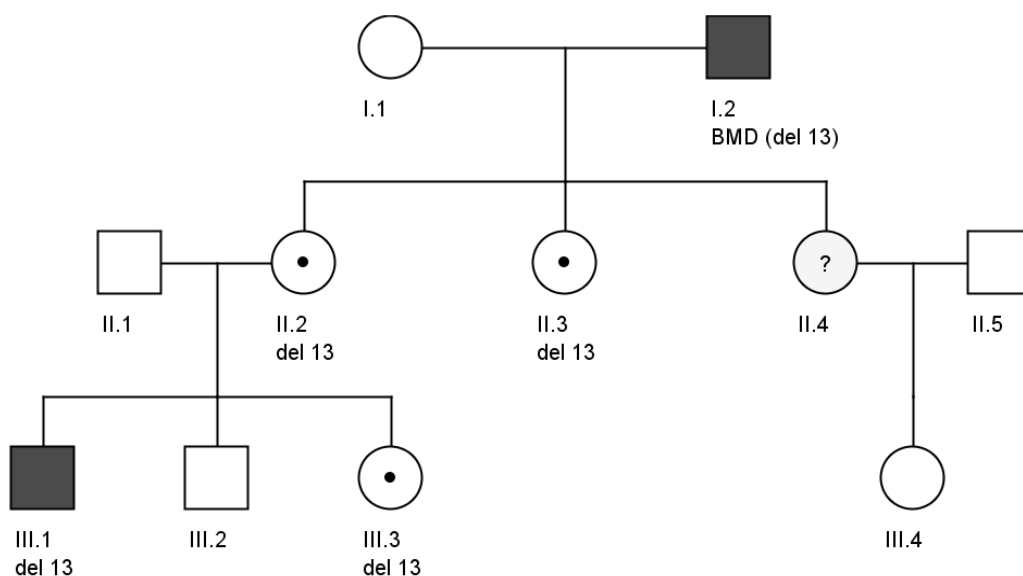
je urađena direktna molekularno genetička analiza, a kod tri trudnice je bila primenjena indirektna genska analiza, što je opisano u prethodnom delu.

Razlog za prenatalnu dijagnozu kod 8 trudnica su bili izolovani slučajevi obolelih muških srodnika. U tri slučaja u pitanju je bio oboleli otac (BMD) trudnice, u tri slučaja majke su imale obolelog sina (DMD), u jednom slučaju je bio bolestan rođeni brat (DMD) trudnice, a u jednom rođak (BMD). Svi probandi su imali deleciju lokalizovanu u distalnom delu DMD gena, osim kod jednog BMD probanda sa delecijom egzona 13, u čijem slučaju je i njegova ćerka (trudnica) bila potvrđena kao nosilac. Kako su navedeni probandi imali deleciju patognomoničnu za distrofinopatiju, za gensku analizu kod plodova (muških i ženskih), izbor je bila multipleks PCR metoda, zbog brzine izvođenja i mogućnosti otkrivanja delecija u predilekcionim regionima u DMD genu kod muških plodova. Kod ženskih plodova se dijagnoza zasnivala na odsustvu homozigotne delecije koja je patognomonična za distrofinopatiju. Ipak, na ovaj način se ne isključuje mogućnost da je ženski plod heterozigotni prenosilac delecije (143). Kod jednog ženskog ploda je bila primenjena MLPA metoda.

Naše ispitivanje je obuhvatilo 5 muških i 7 ženskih plodova iz 12 trudnoća (8 trudnica), a nalaz kod plodova je bio pozitivan za dve majke. Kod jedne majke (dve trudnoće) čiji je rođak oboleo od BMD, oba ploda muškog pola su bila zahvaćena. Kod druge majke (tri trudnoće), čiji je otac oboleo od BMD, a i sama je bila potvrđena kao nosilac, jedan muški plod je imao deleciju, kao i jedan ženski plod (nosilac), dok je treći plod – muški, bio zdrav. Plodovi su imali iste mutacije kao i njihovi oboleli muški srodnici.

Prikazaćemo pomenutu porodicu u kojoj je otac oboleo od BMD (del 13) i gde je genetičko testiranje bilo sprovedeno kod tri generacije.

Prikaz porodice – BMD otac i tri ćerke (slučaj br. 33, Tabela 17.; slučaj 1 i 2, Tabela 21., iz rezultata). Kod članova porodice je bila primenjena direktna molekularno genetička analiza (kod probanda - oca, testiranje nosioca - ćerki, kao i u prenatalnoj dijagnozi):



S obzirom da otac boluje od BMD (delecija egzona 13), prema porodičnom stablu, njegove tri ćerke su obavezni prenosiooci mutacije. Kod dve ćerke MLPA metodom smo utvrdili da nose deleciju egzona 13, za treću ćerku nismo imali potvrđen mutacioni status, ali se takođe smatra obaveznim preosiocem. Kod svih ćerki, prisutan rizik za oboljevanje muškog ploda iznosi 50%, a 50% je verovatnoća da će biti zdrav. Za ženski plod verovatnoća da bude zdrav ili prenosilac mutacije kao i majka iznosi 50%:50%. Kod jedne ćerke, iz tri trudnoće, jedan muški plod je imao deleciju 13, što znači da će biti bolestan; jedan muški plod nije imao deleciju i biće zdrav; dok je kod ženskog ploda MLPA metodom utvrđeno da nosi deleciju 13, što znači da će biti prenosilac mutacije kao njena majka. Kod ćerke za koju nam nije bio poznat mutacioni status, nije bila utvrđena delecija kod njenog ženskog ploda. I ovde napominjemo da nemamo informacije o ishodima ovih trudnoća i eventualnom kasnijem oboljevanju ispitanika.

Možemo zaključiti da su za ženu koja je nosilac mutacije, prema modelu nasleđivanja X-vezanih recesivnih bolesti, jasni rizici kako za oboljevanje njenog muškog ploda, tako i da njen ženski plod bude nosilac. To ukazuje na važnost utvrđivanja statusa ženskih nosioca mutacije kako kod familijarnih, tako i kod izolovanih DMD/BMD slučajeva. Ukoliko se kod majke ne utvrdi prisustvo mutacije, to još uvek ne isključuje mogućnost promene u DMD genu ili prisustva gonadnog mozaicizma, pa se u krajnjem slučaju od strane nekih autora preporučuje biopsija mišića kod fetusa i imunohistohemijska analiza distrofina u ćelijama (168).

## ***6. Zaključci***

---



1. a) Kod 72 DMD/BMD probanada primenom PCR i/ili MLPA metode je otkriveno 68,1% velikih mutacija, a od tog broja delecije su činile 87,7%, a duplikacije 12,3%.
  - b) MLPA metoda je potvrdila sve delecije nađene kod probanda PCR metodom, takođe je u 22,7% slučajeva nađena veća delecija, u 22,7% slučajeva delecija na drugoj lokaciji, a kod 4 ispitanika otkrivena je duplikacija (18,2%).
  - c) Velike mutacije su obuhvatile egzone 2-20 u 16,3% slučajeva, odnosno egzone 44-55 u 63,3%. Značajno veći broj BMD bolesnika (N=20) je imao mutacije u distalnom delu gena.
  - d) Velike mutacije su zahvatile veći broj egzona u 79,6% slučajeva, a najčešća lokalizacija je bila u štapićastom domenu gena, u 85,7%.
  - e) Odstupanje od Monakovog pravila je bilo prisutno kod 8,7% DMD bolesnika i 16,7% BMD bolesnika.
  - f) U grupi probanda bez potvrđenih delecija i duplikacija bilo je 82% sa BMD fenotipom.
2. a) Od 53 uspele MLPA analize kod ženskih srodnika probanada, velike mutacije su bile nađene u 39,6% slučajeva.
  - b) Od 37 ispitanih majki probanada (21 DMD i 16 BMD), potvrđenih nosioca je bilo 45,9%. Kod izolovanih DMD slučajeva je nađeno 50% majki nosioca, odnosno 37,5% kod BMD.
  - c) Od 17 majki nosilaca, njih 14 (82,4%) su imale deleciju, od toga su kod 10 (71,4%) majki delecije obuhvatile distalni deo gena između egzona 45-55. Duplikacije su bile nađene kod 3 majke (17,6%).
  - d) Među DMD/BMD slučajevima sa delecijom, majke su bile potvrđene kao nosioci u 56% slučajeva (14 majki od 25), a u DMD/BMD slučajevima sa duplikacijom majke su bile nosioci u 75% slučajeva (3 od 4 majke).
  - e) Mutacije nađene kod majki nosilaca su bile iste kao kod sinova probanada, osim kod dve majke.
  - f) Od 16 ženskih srodnika, kod 25% su bile nađene delecije koje ima i proband sa kojim su u srodstvu.

3. a) Stopa novih mutacija dobijena za naš uzorak iznosi ukupno 51,4%, odnosno 45,5% za DMD bolesnike i 60% za BMD bolesnike. Gonadni mozaicizam nije mogao biti isključen kod dve majke (5,1%).
4. a) U analizi vezanosti najinformativniji je bio marker DXS1237 (intron 45) u 77,8% slučajeva.  
b) Na osnovu samo analize vezanosti kod 8 porodica, učestalost ženskih heterozigota je iznosila 82,3%.  
c) Kod 7 porodica analiza vezanosti je bila dopunjena MLPA analizom kojom je predviđanje ishoda na osnovu analize vezanosti bilo potvrđeno za dve porodice, kod 4 porodice nije mogla biti isključena tačkasta mutacija, a za jednu porodicu je utvrđen suprotan ishod od predviđenog.
5. a) Indikacije za prenatalnu dijagnozu su bile delecije kod muških srodnika karakteristične za distrofinopatije.  
b) Kod 3 trudnice primenjena je indirektna molekularno genetička metoda. Za dva muška ploda očekivani ishod je da će biti zdravi. Kod trećeg ploda predviđeni ishod, da će biti bolestan, nije bio potvrđen MLPA analizom.  
c) Kod 8 trudnica (12 trudnoća) primenjena je direktna molekularno genetička metoda. Kod jedne majke dva od tri ploda (jedan muški, jedan ženski) su imala deleciju; kod druge majke oba muška ploda su imala deleciju u DMD genu.
6. a) Dijagnostičko genetičko testiranje se izvodi kod simptomatskih bolesnika ili kao prenatalna genetička dijagnostika, kao i u cilju određivanja statusa prenosioca kod žena. Genetičko testiranje kod osobe obolele od DMD/BMD daje mogućnost postavljanja konačne dijagnoze. Na tome se zasniva dalje praćenje bolesnika i davanje prognoze, kao i genetičko savetovanje obolelog i njegove porodice.  
b) Svaki genetički test ima svoj domen primene, ali i ograničenja. PCR metoda omogućuje detekciju 98% delecija u predilekcionim regionima DMD gena i predstavlja prvi korak u DMD/BMD dijagnozi. MLPA metoda, kao kvantitativna metoda, daje mogućnost otkrivanja delecija koje se nalaze van „vrućih mesta” u DMD genu, detekciju duplikacija, kao i utvrđivanje statusa ženskih prenosioca, pa se rutinski primenjuje u svakodnevnoj praksi.

c) Primenom direktne molekularno genetičke metode moguće je detektovati delecije i duplikacije u DMD genu kod 70 - 80% slučajeva, kako kod probanda tako i kod ženskih nosioca. Ukoliko se ne otkrije promena u ispitivanom materijalu, to još uvek ne isključuje prisustvo mutacije. Primenom indirektno metode moguće je utvrditi koji od članova porodice (muški ili ženski) je nasledio rizični hromozom, što je od značaja u 20 - 30% slučajeva nastalih kao posledica tačkastih mutacija. Sa druge strane, metoda skvenciranja gena daje informaciju o redosledu nukleotida, odnosno promeni unutar gena. U slučaju da nijedna od metoda ne pruži odgovor, imnohistohemijska analiza distrofina u mišićnom bioptatu omogućuje dijagnozu kod probanda, a korisna je i u otkrivanju žena nosioca.

d) Poznavanje mutacije kod probanda i statusa nosioca kod žena je od velikog značaja za davanje genetičkog saveta i prenatalnu dijagnozu, kao vid prevencije ove bolesti.

## ***7. Literatura***

---

1. Conte G, Gioja L. Scrofolo del sistema muscolare. *Annali Clinici dell'Ospedale degli Incurabili di Napoli* 1836; 2:66-79.
2. Meryon E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Medico-Chirurgical Trans.* 1852; 35:73-4.
3. Duchenne GBA. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. *Arch Gen Med.* 1868; 11:5-25.
4. Emery AE. Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. *Lancet.* 2001;357(9267):1529.
5. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50:509–517.
6. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731–740.
7. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; 82(2):291-329.
8. Hoffman EP, Brown RH. Jr, and Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 1987; 51:919-928.
9. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Müller CR, Lindlöf M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Récan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gailati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blonden LA, van Paassen MB, van Ommen GJ, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506.

10. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Bernald-Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 1990; 344:64-65.
11. D'Souza VN, Thi Man N, Morris GE, Karges W, Pillers DAM, and Ray PN (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4:837-842.
12. Lidov HGW, Selig S, and Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDA CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4:329-335.
13. Byers TJ, Lidov HGW, and Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* 1993; 4:77-81.
14. Rapaport D, Lederfein D, den Dunnen JT, Grootsholten PM, Van Ommen GJB, Fuchs O, Nudel U, and Yaffe D. Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* 1992; 49:187-194.
15. Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* 1996; 6(1):25-35.
16. Sutherland-Smith AJ, Moores CA, Norwood FL, Hatch V, Craig R, Kendrick-Jones J, Lehman W. An atomic model for actin binding by the CH domains and spectrin-repeat modules of utrophin and dystrophin. *J Mol Biol.* 2003;329(1):15–33.
17. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4560-6.
18. Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol.* 2000;7(8):634-8.
19. Ohlendieck K, Ervasti JM, Snook JB, and Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J. Cell Biol.* 1991; 112:135-148.
20. Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol.* 1997;10: 168–175.

21. Ervasti JM, and Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 1993; 122:809-823.
22. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, and Campbell KP. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet.* 1993; 2:1651-1657.
23. Adams ME, Mueller HA, Froehner SC. In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin. *J Cell Biol.* 2001; 155(1):113-22.
24. Campbell KP, and Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature (Lond.)* 1989;338:259-262.
25. Levine BA, Moir AJG, Patchell VB, and Perry SV. The interaction of actin with dystrophin. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* 1990; 263:159- 162.
26. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001;24(12):1575-94.
27. Hogan A, Shepherd L, Chabot J, Quenneville S, Prescott SM, Topham MK, Gee SH. Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem.* 2001;276(28):26526-33.
28. Emery AEH. The muscular dystrophies. *Lancet* 2002; 359:687-695.
29. Dalkilic I, Kunkel LM. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13:231–238.
30. Shiao T, Fond A, Deng B, Wehling-Henricks M, Adams ME, Froehner SC, Tidball JG. Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha- and beta1-syntrophins. *Hum Mol Genet.* 2004;13(17):1873-84.
31. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol.* 2012;189: 3669-3680.

32. Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol.* 2001;98: 235-243.
33. Cai B, Spencer MJ, Nakamura G, Tseng-Ong L, Tidball JG. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am J Pathol.* 2000;156: 1789-1796
34. Emery AEH, Muntoni F. Duchenne muscular dystrophy. 3rd ed. Oxford: *Oxford University Press*; 2003.
35. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, and Specht L. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's muscular dystrophy. *The New England Journal of Medicine* 1988;318(21):1363-1368.
36. Miller RG, Hoffman EP. Molecular diagnosis and modern management of Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Clin.* 1994; 12:699–725.
37. Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlation of deletion leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989;39: 465-474.
38. Kesari A, Pirra LN, Bremadesam L, McIntyre O, Gordon E, Dubrovsky AL, Viswanathan V, Hoffman EP. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Hum. Mutat.* 2008;29(5):728–737.
39. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers ALJ, Takata RI, Rapaport D, den Dunnen JT, Zatz M, van Ommen GJB. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am. J. Hum. Genet.* 1992;51: 1150-1155.
40. Hu X, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* 1990;46: 682-695.



41. White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers ALJ, Lalic T, Janson AA, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT. Duplications in the *DMD* gene. *Human Mutation* 2006;27(9):938-945.
42. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guerguelcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barišić N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Díaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloğlu H, El Sherif R, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Bérout C, Lochmüller H. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation* 2015; 36:395-402.
43. Kim UK, Chae JJ, Lee SH, Lee CC and Namkoong Y. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction and microsatellite analysis. *Mol Cells* 2002; 13:385–388.
44. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ. United Dystrophinopathy Project Consortium, Weiss RB. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat.* 2009;30(12):1657-66.
45. Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *Journal of Human Genetics* 2010; 55:379–388.

46. Helderma-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ, Kneppers AL, Ginjaar HB, Breuning MH, Bakker E. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet.*, 2009;75(5):465-72.
47. Buzin CH, Feng J, Yan J, Scaringe W, Liu Q, den Dunnen J, Mendell JR, Sommer SS. Mutation rates in the dystrophin gene: a hotspot of mutation at a CpG dinucleotide. *Hum Mutat.* 2005;25(2):177-88.
48. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet.* 1992;1(8):599–603.
49. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Thompson MW, J, Oss I, Bodrug SE, Klamut HJ, Ray PN, and Worton RG. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):507–520.
50. Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, and Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:22-33.
51. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. High frequency of new mutations in north Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin Genet.* 1996; 50:327-31.
52. Mukherjee M, Chaturvedi LS, Srivastava S, Mittal RD and Mittal B. De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Experimental and Molecular Medicine*, 2003; 35(2):113-117.
53. Carsana A, Frisso G, Tremolaterra MR, Ricci E, De Rasmio D, and Salvatore F. A Larger Spectrum of Intragenic Short Tandem Repeats Improves Linkage Analysis and Localization of Intragenic Recombination Detection in the Dystrophin Gene. An Analysis of 93 Families from Southern Italy. *J Mol Diagn.* 2007;9(1):64–69.
54. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2:90–95.

55. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; 34:135–44.
56. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodrug SE, Burghes AH, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988;242(4879):755-9.
57. Henderson M, Lee A, and Ervasti JM. Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(21):9632-9637.
58. Muntoni F, Gobbi P, C, T, Taylor J, Sandhu SK, Abbs S, Roberts R, SV, Bobrow M. Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. *J Med Genet.* 1994;31(11): 843–847.
59. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Howard MT, Sampson JB, Swoboda KJ, Bromberg MB, Mendell JR, Taylor LE, Anderson CB, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Wong B, Finkel RS, Bonnemann CG, Day JW, McDonald C, Weiss RB. Nonsense mutation-associated Becker muscular dystrophy: interplay between exon definition and splicing regulatory elements within the DMD gene. *Hum Mutat.* 2011; 32:299–308.
60. Matsumura, K., A. H. M. Burghes, M. Mora, F. M. S. Tome, L. Morandi, F. Cornello, F. Leturcq, M. Jeanpierre, J.-C. Kaplan, P. Reinert, M. Fardeau, J. R. Mendell, and K. P. Campbell. Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.* 1994; 93:99-105.
61. Nevo Y, Muntoni F, Sewry C, Legum C, Kutai M, Harel S, Dubowitz V. Large in-frame deletions of the rod-shaped domain of the dystrophin gene resulting in severe phenotype. *Isr Med Assoc J.* 2003;5(2):94-7.

62. Novaković I. Analiza gena za distrofin kod bolesnika sa Becker-ovom mišićnom distrofijom. *Doktorska disertacija*, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, 1998.
63. Tuffery-Giraud S, Béroud C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-Calemard L, Moizard MP, Bernard R, Cossée M, Boisseau P, Blayau M, Creveaux I, Guiochon-Mantel A, de Martinville B, Philippe C, Monnier N, Bieth E, Khau Van Kien P, Desmet FO, Humbertclaude V, Kaplan JC, Chelly J, Claustres M. Genotype-phenotype analysis in 2405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 2009; 30:934–945.
64. Elisabeth Le Rumeur. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(3): 14–20.
65. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:54–67.
66. Zimowski JG, Pilch J, Pawelec M, Purzycka JK, J, Ziora-Jakutowicz K, et al. A rare subclinical or mild type of Becker muscular dystrophy caused by a single exon 48 deletion of the dystrophin gene. *J Appl Genet.* 2017;58(3):343–347.
67. Chelly J, Marlhens F, Le Marec B, Jeanpierre M, Lambert M, Hamard G, Dutrillaux B, Kaplan JC. De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 1986;74(2):193-196.
68. Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1997;60(1):160-165.
69. Wenger SL, Steele MW, Hoffman EP, Barmada MA, Wessel HB. X inactivation and dystrophin studies in a t(X;12) female: evidence for biochemical normalization in Duchenne muscular dystrophy carriers. *Am J Med Genet.* 1992;43(6):1012-1015.

70. Passos-Bueno MR, Rapaport D, Love D, Flint T, Bortolini ER, Zatz M, Davies KE Screening of deletions in the dystrophin gene with the cDNA probes Cf23a, Cf56a, and Cf115. *J Med Genet.* 1990;27(3):145-50.
71. Tomoko L, Takeshima Y, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Matsuo M, and Iijima K. Differences in carrier frequency between mothers of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *J Hum Genet.* 2014;59(1):46–50.
72. Haldane JSB. The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935. *J Genet.* 2004;83(3):235-44.
73. Tiemo G, Wolfram K, Gerhard M, and Clemens RM. Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myologica* 2012;179-183.
74. Van Essen AJ, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, van Broeckhoven C, Bushby K, Clarke A, Claustres M, Covone AE. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet.* 1992; 88(3):249-57.
75. Bakker E, Veenema H, den Dunnen JT, van Broeckhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, van Ommen GJ, Pearson PL. Germinal mosaicism increases the recurrence risk for 'new' Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet.* 1989;26(9):553-9.
76. Hartl DL. Recurrence risks for germinal mosaics. *Am J Hum Genet.* 1971; 23:124-34
77. Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet.* 1990;84(6):522-6.
78. Helderma-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ, Kneppers AL, Ginjaar HB, Breuning MH, Bakker E. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2009;75(5):465-72.
79. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, et al. Diagnosis and management of

- Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol.* 2010;9(2):177–189.
80. Becker PE, Kiener F. A new x-chromosomal muscular dystrophy. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 1955;193(4):427-48.
  81. Melacini P, Fanin M, Danieli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation* 1996;94(12):3168-75.
  82. Agretto A, Politano L, Bossone E, Petretta VR, D'Isa S, Passamano L, Comi LI, Erbel R. Pulsed Doppler tissue imaging in dystrophinopathic cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002; 15:891–899.
  83. Kaspar RW, Allen HD, Ray WC, Alvarez CE, Kissel JT, Pestronk A, Weiss RB, Flanigan KM, Mendell JR, Montanaro F. Analysis of dystrophin deletion mutations predicts age of cardiomyopathy onset in becker muscular dystrophy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(6):544-51.
  84. Anderson JL, Head SI, Rae C, Morley JW. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain.* 2002;125(Pt 1):4-13.
  85. Moser H, Emery AE. The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet.* 1974;5(4):271-284.
  86. Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoor-Krakauer DF, Leschot NJ, Van Essen AJ, Brunner HG, van der Wouw PA, Wilde AA, de Visser M. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet* 1999;353(9170):2116-9.
  87. Griggs RC, Mendell JR, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, Province M, Moxley RT 3rd, Huntzinger D, Vaughn A, Cohen M. Clinical investigation in Duchenne dystrophy: V. Use of creatine kinase and pyruvate kinase in carrier detection. *Muscle Nerve.* 1985; 8(1):60-7.
  88. Politano L, Nigro V, Nigro G, Petretta VR, Passamano L, Papparella S, Di Somma S, Comi LI. Development of cardiomyopathy in female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *JAMA* 1996;275(17):1335-8.

89. Pegoraro E, Schimke RN, Garcia C, Stern H, Cadaldini M, Angelini C, Barbosa E, Carroll J, Marks WA, Neville HE, Marks H, Appleton S, Toriello H, Wessel HB, Donnelly J, Bernes SM, Taber JW, Weiss L, Hoffman EP. Genetic and biochemical normalization in female carriers of Duchenne muscular dystrophy: evidence for failure of dystrophin production in dystrophin-competent myonuclei. *Neurology* 1995;45(4):677-690.
90. Brioschi S, Gualandi F, Scotton C, Armaroli A, Bovolenta M, Falzarano MS, Sabatelli P, Selvatici R, D'Amico A, Pane M, Ricci G, Siciliano G, Tedeschi S, Pini A, Vercelli L, De Grandis D, Mercuri E, Bertini E, Merlini L, Mongini T, and Ferlini A. Genetic characterization in symptomatic female DMD carriers: lack of relationship between X-inactivation, transcriptional DMD allele balancing and phenotype. *BMC Med Genet.* 2012; 13:73.
91. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, and Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141–11156.
92. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press New York 1990; 272-281.
93. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98 % of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1990;86(1):45–48.
94. Singh R, Vijjaya, Kabra M. Multiplex PCR for rapid detection of exonal deletions in patients of duchenne muscular dystrophy. *Indian J Clin Biochem.* 2006;21(1):147-51.
95. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;519(1):263-73.
96. Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B. PCR u kliničkoj dijagnostici. Biološki fakultet u Beogradu, 1999.

97. Den Dunnen JT, Beggs A. Multiplex PCR for Identifying DMD Gene Deletions. *Curr Protoc Hum Genet.* 2006; Chapter 9:Unit 9.3.
98. White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, et al. Comprehensive Detection of Genomic Duplications and Deletions in the *DMD* Gene, by Use of Multiplex Amplifiable Probe Hybridization. *Am J Hum Genet.* 2002;71(2):365–374.
99. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, and Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
100. Lalić T, Vossen R HAM, Cofa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Đurišić M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen J. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13:1231-1234.
101. MRC-Holland – Start Page. MLPA protocols. <https://www.mlpa.com>; poslednja poseta 23. Januara, 2018.
102. Applied Biosystems Inc; 850 Lincoln Centre drive Foster City, CA 94404 USA. <http://www6.appliedbiosystems.com/about/diversity.cfm>; poslednja poseta 12. Februara 2018.
103. Darras BT, Harper JF, Francke U. Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 1987;316(16):985-92.
104. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet.* 2009;10(4):241-51.
105. Oudet C, Heilig R, Hanauer A, Mandel JL. Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):311-9.
106. King SC, Stapleton PM, Walker AP, and Love DR. Polymorphisms at the DMD locus. *Human Molecular Genetics*, 1994; 3(3):523.
107. Leiden muscular Dystrophy pages; Markers in and around the dystrophin gene (*last modified January 6, 2006*). <http://www.dmd.nl>; poslednja poseta 26. Februara 2018.



108. Golbus MS, Stephens JD, Mahoney MJ, Hobbins JC, Haseltine FP, Caskey CT, and Banker BQ. Failure of fetal creatine phosphokinase as a diagnostic indicator of Duchenne muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 1979; 300:860-861.
109. Scott JM, Li S, Harper SQ, Welikson R, Bourque D, DelloRusso C, Hauschka SD, Chamberlain JS. Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12(1):S23-9.
110. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 2004;10(8):828-834.
111. DelloRusso C, Scott JM, Hartigan-O'Connor D, Salvatori G, Barjot C, Robinson AS, Crawford RW, Brooks SV, Chamberlain JS. Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):12979-84.
112. Dudley RW, Lu Y, Gilbert R, Matecki S, Nalbantoglu J, Petrof BJ, Karpati G. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* 2004;15(2):145-56.
113. Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR, Mendell JR. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med.* 2007; 5:45.
114. Rodino-Klapac LR, Janssen PML, Shontz KM, Canan B, Montgomer CLy, Griffin D, Heller K, Schmelzer L, Handy C, Clark KR, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK. Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model. *Hum Mol Genet.* 2013;22(24):4929-4937.
115. Skuk D, Roy B, Goulet M, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Lachance JG, Deschênes L, Hélène S, Sylvain M, Tremblay JP. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following

- intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther.* 2004;9(3):475-82.
116. Peng H, Huard J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol.* 2004;12(3-4):311-9.
  117. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12(1):S71-7.
  118. Falzarano MS, Passarelli C, and Ferlini A. Nanoparticle Delivery of Antisense Oligonucleotides and Their Application in the Exon Skipping Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(1):87–100.
  119. Aartsma-Rus A, and van Ommen GJ. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(2):146–153.
  120. Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in Targeted Genome Editing. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16(3-4):268–277.
  121. Ousterout DG, Perez-Pinera P, Thakore PI, Kabadi AM, Brown MT, Qin X, Fedrigo O, Mouly V, Tremblay JP, and Gersbach CA. Reading Frame Correction by Targeted Genome Editing Restores Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol Ther.* 2013; 21(9):1718–1726.
  122. Wang L, Yang L, Guo Y, Du W, Yin Y, Zhang T, Lu H. Enhancing Targeted Genomic DNA Editing in Chicken Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169768.
  123. Lattanzi A, Duguez S, Moiani A, Izmiryan A, Barbon E, Martin S, Mamchaoui K, Mouly V, Bernard F, Mavilio F, Bovolenta M. Correction of the Exon 2 Duplication in DMD Myoblasts by a Single CRISPR/Cas9 System. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 7:11–19.
  124. Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16(3):1215.

125. Pedigree Chart Designer: [www.cegat.de/en/for-physicians/pedigree-chart-designer/](http://www.cegat.de/en/for-physicians/pedigree-chart-designer/); poslednja poseta: 20. Mart 2018.
126. Saito M, Kawai H, Akaike M, Adachi K, Nishida Y, Saito S. Cardiac dysfunction with Becker muscular dystrophy. *Am Heart J.* 1996; 132:642–647.
127. Murugan S, Chandramohan A, Lakshmi BR. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. *Indian J Med Res.* 2010; 132:303-11.
128. Kohli S, Saxena R, Tomas E, Singh J, Verma IC. Gene changes in Duchenne muscular dystrophy: Comparasion of multiplex PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification techniques. *Neurol India.* 2010; 58:852-856.
129. Prashant KV, Ashwin D, Balraj M, and Phadke R. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. *Indian J Hum Genet.* 2012; 18(1):91-94.
130. Sansović I, Barišić I, Dumić K. Improved detection of deletions and duplications in DMD gene using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method. *Biochem Genet.* 2013;51(3-4):189-201.
131. Nigro G. Editorial. *Acta Myol.* 2013; 32:1–6.
132. Topaloglu H. Epidemiology of muscular dystrophies in the Mediterranean area. *Acta Myol.* 2013;32(3):138–141.
133. TREAT-NMD Global Registries: [www.treat-nmd.eu/dmd/](http://www.treat-nmd.eu/dmd/); poslednja poseta: 15. Mart 2018.
134. Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, Zhan YX, Yu CS, Chen F, Li Y, Sun XF and Zhang C. MLPA-based genotype–phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Medical Genetics* 2013; 14:29.
135. Keckarević M, Savić D, Čuljković B, Zamurović N, Major T, Keckarević D, Todorović S, Romac S. Dišenova i Bekerova mišićna distrofija: analiza korelacije fenotip-genotip kod 28 bolesnika. *Srp Arh Celok Lek.* 2002;130(5-6):154-158.

136. Comi GP, Prella A, Bresolin N, Moggio M, Bardoni A, Gallanti A, et al. Clinical variability in Becker muscular dystrophy. Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates. *Brain* 1994;117(1):1-14.
137. Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, Takeda S, Ikeda S. Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45-55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet.* 2009;54(2):127-30.
138. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet.* 1989;45(6):835-47.
139. Leiden Muscular Dystrophy data pages: <http://www.dmd.nl> (DMD exonic deletions/duplications reading-frame checker 1.9, last updated on Mar 2009); poslednja poseta: 10. Marta, 2018.
140. Gualandi F, Neri M, Bovolenta M, Martoni E, Rimessi P, Fini S, Spitali P, Fabris M, Pane M, Angelini C, Mora M, Morandi L, Mongini T, Bertini E, Ricci E, Vattemi G, Mercuri E, Merlini L, Ferlini A. Transcriptional behavior of DMD gene duplications in DMD/BMD males. *Hum Mutat.* 2009;30(2): E310-9.
141. Norman A, Thomas N, Coakley J, Harper P. Distinction of Becker from limb-girdle muscular dystrophy by means of dystrophin cDNA probes. *Lancet* 1989;1(8636):466-8.
142. Bakker E, Hofker MH, Goor N, Mandel JL, Wrogemann K, Davies KE, Kunkel LM, Willard HF, Fenton WA, Sandkuyl L, et al. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet* 1985;1(8430):655-8.
143. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet* 1992; 29:191-196.

144. Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat.* 2004; 23:385–391.
145. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Uncini A, Stuppia L. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.* 2005;117(1):92-8.
146. Murugan SMS, Arthi C, Thilothammal N, and Lakshmi BR. Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy using molecular methods. *Indian J Med Res.* 2013;137(6):1102–1110.
147. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, de Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991;49(5):951-60.
148. Basak J, Dasgupta UB, Mukherjee SC, Das SK, Senapati AK, Banerjee TK. Deletional mutations of dystrophin gene and carrier detection in eastern India. *Indian J Pediatr.* 2009; 76:1007–12.
149. Ferreiro V, Giliberto F, Francipane L, Szijan I. The role of polymorphic short tandem (CA)<sub>n</sub> repeat loci segregation analysis in the detection of Duchenne muscular dystrophy carriers and prenatal diagnosis. *Mol Diagn.* 2005;9(2):67-80.
150. Grimm T, Kress W, Meng G, and Müller CR. Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2012;31(3):179–183.
151. Taylor PJ, Maroulis S, Mullan GL, Pedersen RL, Baumli A, Elakis G, Piras S, Walsh C, Prósper-Gutiérrez B, De La Puente-Alonso F, Bell CG, Mowat DR, Johnston HM, and Buckley MF. Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2007;44(6):368–372.
152. Dastur RS, Kachwala MY, Khadilkar SV, Hegde MR, Gaitonde PS. Identification of deletions and duplications in the Duchenne muscular

- dystrophy gene and female carrier status in western India using combined methods of multiplex polymerase chain reaction and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Neurol India*. 2011;59(6):803-9.
153. Kawamura J, Kato S, Ishihara T, Hiraishi Y, Kawashiro T. Difference of new mutation rates in dystrophin gene between deletion and duplication mutation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*. 1997;37(3):212-7.
  154. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Müller CR, and Müller B. On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet*. 1994;31(3):183–186.
  155. Lee T, Takeshima Y, Kusunoki N, Awano H, Yagi M, Matsuo M, and Iijima K. Differences in carrier frequency between mothers of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *J Hum Genet*. 2014;59(1):46–50.
  156. Helderman-van den Enden ATJM, Madan K, Breuning MH, van der Hout AH, Bakker E, de Die-Smulders CEM, and Ginjaar HB. An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(1):21–26.
  157. Malayeri FA, Panjehpour M, Movahedian A, Ghaffarpour M, Zamani GR, Tabrizi MH, and Zamani M. Detection of Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Carriers in a Group of Iranian Families by Linkage Analysis. *Acta Medica Iranica* 2011;49(3):142-148.
  158. González-Herrera L, Gamas-Trujillo PA, García-Escalante MG, Castillo-Zapata I, Pinto-Escalante D. Identifying deletions in the dystrophin gene and detecting carriers in families with Duchenne's/Becker's muscular dystrophy. *Rev Neurol*. 2009; 48:66-70.
  159. Delgado-Luengo WN, Borjas-Fuentes L, Zabala-Fernández W, Fernández-Salgado E, Solís-Añez E, Chávez C, Martínez-Basalo C, González-Ferrer S, Rojas-Atencio A, Morales-Machin A, Peña J, Pineda-Bernal L, González R, Miranda LE, Delgado-Luengo J, Hernández ML, Chacín JA, Quintero M. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy by analysis of

- STRs loci linked to the gene of dystrophin in Venezuelan families. *Invest Clin.* 2002;43(4):239-54.
160. Kruyer H, Miranda M, Volpini V, Estivill X. Carrier detection and microsatellite analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Spanish families. *Prenat Diagn.* 1994;14(2):123-30.
161. Ward PA, Hejtmancik JF, Witkowski JA, Baumbach LL, Gunnell S, Speer J, Hawley P, Umadevi Tantravahit U, Caskey CT. Prenatal Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy: Prospective Linkage Analysis and Retrospective Dystrophin cDNA Analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 44:270-281.
162. Shiroshita Y and Katayama S. Prenatal Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy in the Japanese Population by Fluorescent CA Repeat Polymorphisms Analysis. *The J of Obstet. and Gynaecol. Resear.*, 1997;23(5):453-461.
163. Wang H, Xu Y, Liu X, Wang L, Jiang W, Xiao B, Wei W, Chen Y, Ye W, Ji X. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in 131 Chinese families with dystrophinopathy. *Prenat Diagn.* 2017;37(4):356-364.
164. Parks M, Cour St, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, Williams D, Cole T, MacDonald F, Griffiths M, Allen S. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *Prenatal Diagnosis* 2016; 36(4):312-320.
165. Emery AE and Burt D. Intracellular calcium, pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Brit. Med. J.* 1980;280(12):355-357.
166. Edwards RR, Watts DC, Watts RL and Rodeck CH. Creatinine kinase estimation in pure fetal blood samples for prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Pre. Diag.* 1984; 4:267-277.

167. Evans MI, Hoffman EP, Cadrin C, Johnson MP, Quintero RA, Golbus MS. Fetal muscle biopsy: Collaborative experience with varied indications. *Obstet Gynecol.* 1994; 84:913-7.
168. Lee K MD. Prenatal Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2001;13(2):57-64.



## ***Biografija***

Dr Jasmina (Mitrović) Maksić je rođena 1969. godine u Leskovcu.

Osnovnu i srednju školu (Osma beogradska gimnazija) je završila sa odličnim uspehom (5,00). Medicinski fakultet u Beogradu je upisala 1988. godine, na kome je diplomirala 1994. godine sa prosečnom ocenom 9,32 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Državni ispit je uspešno položila 1996. godine. Volontersku specijalizaciju iz pedijatrije je upisala 1996. godine, a specijalistički ispit je položila 2002. godine sa odličnom ocenom. Magistarsku tezu pod nazivom "Studija Daunovog sindroma kod pobačenih plodova i novorođene dece" je uspešno odbranila 2010. godine, na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Dr Jasmina Maksić se oktobra 1998. godine zaposlila kao asistent pripravnik na Defektološkom fakultetu (sada Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju), na predmetu Medicinska genetika (sada Humana genetika). U zvanje asistenta na tom predmetu prvi put je izabrana 2011. godine, a reizabrana 2014. godine. Član je Sekcije za pedijatriju Srpskog lekarskog društva i Lekarske komore Srbije.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jasmina Maksić

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem


da je doktorska disertacija pod naslovom

Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.07.2018.



\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jasmina Maksić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada

Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije

Mentor prof.dr Ivana Novaković

Potpisani - Jasmina Maksić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.07.2018.

  
\_\_\_\_\_

### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.07.2018.

