

UNIVERZITET U BEOGRADU – FAKULTET ZA SPECIJALNU EDUKACIJU I REHABILITACIJU
UNIVERSITY OF BELGRADE – FACULTY OF SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION

10. MEĐUNARODNI NAUČNI SKUP

Specijalna edukacija
i rehabilitacija DANAS

Zbornik radova

10th INTERNATIONAL
SCIENTIFIC CONFERENCE

Special Education
and Rehabilitation TODAY

Proceedings

Beograd, 25–26. oktobar 2019. godine
Belgrade, October, 25–26th, 2019



UNIVERZITET U BEOGRADU – FAKULTET ZA
SPECIJALNU EDUKACIJU I REHABILITACIJU
UNIVERSITY OF BELGRADE – FACULTY OF
SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION

10. MEĐUNARODNI NAUČNI SKUP
SPECIJALNA EDUKACIJA I REHABILITACIJA DANAS
Beograd, 25–26. oktobar 2019. godine

ZBORNİK RADOVA

10th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION TODAY
Belgrade, October, 25–26th, 2019

PROCEEDINGS

Beograd, 2019.
Belgrade, 2019

10. MEĐUNARODNI NAUČNI SKUP
SPECIJALNA EDUKACIJA I REHABILITACIJA DANAS
BEOGRAD, 25–26. OKTOBAR 2019. GODINE
ZBORNİK RADOVA

10th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
SPECIAL EDUCATION AND REHABILITATION TODAY
BELGRADE, OCTOBER, 25–26th, 2019
PROCEEDINGS

IZDAVAČ / PUBLISHER

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju
University of Belgrade – Faculty of Special Education and Rehabilitation

ZA IZDAVAČA / FOR PUBLISHER

Prof. dr Snežana Nikolić, dekan

GLAVNI I ODGOVORNI UREDNIK / EDITOR-IN-CHIEF

Prof. dr Mile Vuković

UREDNICI / EDITORS

Prof. dr Vesna Žunić Pavlović

Prof. dr Aleksandra Grbović

Prof. dr Vesna Radovanović

RECENZENTI / REVIEWERS

Prof. dr Ranko Kovačević, prof. dr Vesna Bratovčić

Univerzitet u Tuzli – Edukacijsko-rehabilitacijski fakultet, Tuzla, BiH

Prof. dr Viviana Langher

Università Sapienza di Roma – Facoltà di Medicina e Psicologia, Roma, Italia

Prof. dr Branislava Popović Čitić, doc. dr Slobodan Banković, doc. dr Ljubica Isaković

*Univerzitet u Beogradu – Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju,
Beograd, Srbija*

LEKTURA I KOREKTURA / PROOFREADING AND CORRECTION

Maja Ivančević Otanjac, predavač

DIZAJN I PRIPREMA / DESIGN AND PROCESSING

Mr Boris Petrović

Biljana Krasić

Zbornik radova biće publikovan u elektronskom obliku CD

Proceedings will be published in electronic format CD

Tiraž / Circulation: 200

ISBN 978-86-6203-129-7

Objavlјivanje Zbornika radova podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i
tehnološkog razvoja Republike Srbije.

GENSKA DIJAGNOZA KOD DIŠENOVE I BEKEROVE MIŠIĆNE DISTROFIJE I DETEKCIJA PRENOSIOCA

Jasmina Maksić^{**a}, Ivana Novaković^b, Dragan Rapaić^a, Mirjana Mitrović^c

^aUniverzitet u Beogradu – Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju, Beograd, Srbija

^bUniverzitet u Beogradu – Medicinski fakultet, Institut za humanu genetiku, Beograd, Srbija

^cOčna ordinacija Mitrović, Beograd, Srbija

Dišenova i Bekerova mišićna distrofija (DMD i BMD) su progresivne mišićne bolesti koje nastaju usled mutacija u genu za distrofin. Gen za distrofin (DMD gen, Xp21.1) je veličine 2,4MB i podložan je promenama u strukturi. Najčešće su prisutne intragenske delecije (65-70%) jednog ili više egzona, sa specifičnom distribucijom u genu (egzoni 2-20 i egzoni 45-55) i duplikacije (5-15%), a ostatak čine male mutacije – tačkaste mutacije, mikroinsercije, mikrodelecije i splice-site mutacije. Procenjeno je da 1/3 DMD bolesnika ima de novo mutaciju, a da su u 2/3 slučajeva majke prenosioci mutacije. Genska dijagnoza DMD/BMD se može postaviti primenom direktne ili indirektno molekularno genetičke analize. Metoda lančane reakcije polimerizacije (PCR) je direktna metoda koja omogućuje detekciju oko 98% svih delecija otkrivenih u DMD genu. Ipak, ovom metodom se ne mogu otkriti delecije van predilekcionih regiona gena, kao ni duplikacije, i nije korisna kod detekcije žena prenosioca mutacije. Metoda višestrukog umnožavanja vezanih proba (MLPA) je omogućila kvantitativnu analizu gena i otkrivanje delecija i van predilekcionih regiona gena, kao i duplikacija, kako kod obolelih tako i kod žena prenosioca mutacije, pa je postala standard u DMD/BMD dijagnozi. Kada se ovim metodama ne otkriju delecije i duplikacije u genu za distrofin, u cilju traganja za tačkastim mutacijama, ispitivanje se nastavlja metodom sekvenciranja DNK. Ipak, zbog izuzetne veličine gena i slučajnog rasporeda tačkastih mutacija može se prvo primeniti analiza vezanosti kao indirektna dijagnostička metoda. Ona podrazumeva praćenje nasleđivanja rizičnog hromozoma kod ženskih i muških članova u porodici, putem praćenja polimorfnih DNK markera koji se nalaze u okviru DMD gena, ili u njegovoj blizini. Ograničenja metode su postojanje neinformativnih genotipova, rekombinacije u DMD genu, a zahteva i ispitivanje više članova u porodici. Postavljanje precizne dijagnoze kod obolelog i otkrivanje

** maxic164@eunet.rs

žena prenosioca mutacije je od značaja za davanje adekvatnog genetičkog saveta i sprovođenje prenatalne dijagnoze.

Ključne reči: distrofinopatije, dijagnoza distrofinopatija, detekcija prenosioca

Uvod

Distrofinopatije su progresivne mišićne bolesti koje nastaju usled mutacija u genu za citoskeletni protein distrofin. Dišenova mišićna distrofija (DMD) je zbog nedostatka distrofina najteži oblik iz ove grupe bolesti, dok njen alelni oblik, Bekeroва mišićna distrofija (BMD), ima blažu kliničku sliku usled kvantitativno ili kvalitativno izmenjenog distrofina. DMD/BMD su monogenske bolesti i nasleđuju se X vezano recesivno. Prema ovom modelu nasleđivanja tipično oboljevaju muškarci, dok su žene uglavnom fenotipski zdravi prenosioci bolesti. Gen za distrofin (DMD gen) je lociran na X hromozomu (Xp21.1) i najveći je humani gen (2,4MB). Njegovu strukturu čini 79 egzona, dok 99% gena čine nekodirajuće sekvence (Koenig, 1987). Zbog svoje izuzetne veličine, DMD gen je često podložan promenama u strukturi i pokazuje visoku stopu spontanih mutacija (1×10^{-4}) (Buzin et al., 2005; Haldane, 2004). Najčešće prisutne mutacije su intragenske delecije (65-70%) jednog ili više egzona, sa specifičnom distribucijom u genu (egzoni 2-20 i egzoni 45-55), i duplikacije (5-15%), dok ostatak (20%) čine mutacije manje od jednog egzona – tačkaste mutacije, mikroinsercije, mikrodelecije i *splice-site* mutacije (Bladen et al, 2015). Procena je da su 2/3 slučajeva familijarni, a da 1/3 DMD bolesnika ima *de novo* mutaciju. Ipak, prema podacima iz literature, a i našim rezultatima, prisutnost novih mutacija, uglavnom delecija, je veća od očekivane i iznosi 45,5% (Maksić, 2018), 60% (Taylor et al., 2007), do čak 71% (Murugan, Arthi, Thilothammal, & Lakshmi, 2013). Važno je pomenuti da u 20% izolovanih slučajeva postoji mogućnost da majka ima gonadni mozaicizam, što povećava rizik ponovnog rađanja bolesnog deteta.

Do kloniranja DMD gena i identifikacije kodiranog proteina (Hoffman, Brown, & Kunkel, 1987), dijagnoza distrofinopatija se zasnivala na kliničkim parametrima. Sa razvojem metoda molekularne biologije stvorena je mogućnost za postavljanje genske dijagnoze kod obolelih od DMD/BMD, što čini osnovu za dalje praćenje bolesnika, kao i genetičko savetovanje obolelog i ostalih članova u porodici.

Dijagnoza DMD/BMD se može postaviti analizom samog gena ili analizom proteina – mišićnog distrofina. Genska analiza nam omogućuje otkrivanje mutacija prisutnih u DMD genu, direktnim ili indirektnim putem, i neophodna je kod svih DMD/BMD bolesnika – pa i onih kojima je dijagnoza postavljena biopsijom mišića. Genetičko testiranje se sprovodi kod simptomatskih bolesnika kako bi se potvrdila klinička dijagnoza, ili radi diferencijalne dijagnoze; kod žena u cilju određivanja statusa prenosioca mutacije; i, kao prenatalna genetička dijagnostika. Na osnovu velikog broja iskustava koja su opisana u literaturi, ustanovljeni su koraci za uspostavljanje DMD/BMD dijagnoze.

PCR metoda i multipli PCR

Metoda lančane reakcije polimerizacije (engl. – *Polymerase chain reaction*, PCR) je razvijena početkom devedesetih godina XX veka. Upotreba ove tehnike se bazira na činjenici da se delecije kao najčešće mutacije u DMD genu grupišu u predilekcionim regionima gena, što olakšava njihovo otkrivanje. Tako je PCR metoda putem analize samo 19 egzona gena za distrofin omogućila otkrivanje oko 95% delecija opisanih u DMD genu (Beggs, Koenig, Boyce, & Kunkel, 1990; Chamberlain, Gibbs, Rainer, & Caskey, 1990). Pošto se u jednoj reakciji analizira više egzona, metoda je poznata kao multipli PCR. S obzirom na to da se obuhvatanjem većeg broja egzona mogu preciznije da odrede veličina i lokalizacija mutacije, usledila je kompletnija metoda. Zahvaljujući ovoj metodi, u tri komplementarne PCR reakcije se analizira 26 egzona DMD gena čime se detektuje oko 98% svih delecija, odnosno 65% svih mutacija otkrivenih u DMD genu (Singh, Vijjaya, & Kabra, 2006).

Kako su muškarci hemizigoti, to se delecije na jedinom X hromozomu lako mogu otkriti PCR metodom jer se egzoni koji leže u deletiranim regionima ne umnožavaju tokom PCR reakcije, što se utvrđuje gel elektroforezom. Međutim, kod žena, zbog prisustva dva X hromozoma delecije kod hetrozigotnih prenosioca bivaju maskirane umnožavanjem normalnog X hromozoma, pa ova metoda nije od koristi prilikom utvrđivanja statusa prenosioca. Takođe, opisanom PCR metodom se kod obolelog ne mogu otkriti delecije koje se nalaze van predilekcionih regiona DMD gena, niti duplikacije.

MLPA metoda

Metoda višestrukog umnožavanja vezanih proba (engl. *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) je prvi put opisana 2002. godine sa svrhom kvantitativne analize gena (Schouten et al., 2002). Ubrzo nakon toga je razvijen MLPA test koji je omogućio analizu svih 79 egzona DMD gena (Lalić et al., 2005) i otkrivanje delecija i duplikacija u DMD genu. Ova metoda je primenljiva i kod muškaraca obolelih od DMD/BMD i kod žena prenosioca mutacije. Takođe, MLPA metodom je moguće istovremeno analizirati do 96 različitih uzoraka, a rezultati se dobijaju za 24 sata.

Podaci dobijeni MLPA metodom se obrađuju softverski (Cofalayzer, MRC-Holland), a važan korak predstavlja interpretacija rezultata koja se zasniva na upoređivanju ispitivanog uzorka sa referentnim uzorcima. Kod hemizigotnih delecija obolelog interpretacija je lakša jer je jasno vidljiv izostanak signala, dok se kod heterozigotnih delecija i kod duplikacija stvaraju pikovi – signali različite visine. Ograničenja MLPA metode se ogledaju u nemogućnosti da se otkriju tačkaste mutacije, većina inverzija i balansiranih translokacija. Ipak, MLPA metoda je pojednostavila način detektovanja delecija i duplikacija u DMD genu, kao i otkrivanje žena prenosioca mutacije, pa je postala standard u DMD/BMD dijagnozi.

Naveli smo da delecije čine najveći procenat mutacija u DMD genu, pa je opravdano da se u DMD/BMD dijagnozi kod obolelog najpre primeni PCR metoda koja

je tehnički jednostavna za izvođenje. Ako se ovom metodom ne otkriju delecije u DMD genu, treba primeniti MLPA metodu. Takođe je navedeno da se MLPA metodom detektuju žene prenosioci mutacije. Međutim, ukoliko se MLPA metodom ne utvrdi prisustvo delecija/duplikacija u genu za distrofin, kod probanda ili žena prenosioca, a zbog sumnje na tačkaste mutacije, ispitivanje se može nastaviti metodom sekvenciranja DNK čime se određuje primarna struktura gena. Ipak, zbog izuzetne veličine DMD gena i slučajnog rasporeda tačkastih mutacija, kod sumnje na ovaj tip mutacije, može se prvo primeniti indirektna molekularno genetička dijagnostika tj. analiza vezanosti.

Analiza vezanosti

Ova metoda (engl. *linkage analysis*) podrazumeva da se kod članova porodice obolelog prati nasleđivanje rizičnog X hromozoma putem praćenja određenih polimorfnih DNK markera koji leže unutar gena, ili u njegovoj blizini. U osnovi, polimorfizam podrazumeva postojanje varijabilnih regiona u humanom genomu koji se javljaju u dve ili više različitih formi (i do 70). Zbog činjenice da se polimorfni DNK markeri koji su međusobno blisko postavljeni na istom hromozomu nasleđuju zajedno (engl. *genetic linkage*), to je moguće pratiti njihovo nasleđivanje kod svih članova u porodici. Polimorfni DNK markeri koji su danas najčešće u upotrebi su tzv. mikrosateliti - uzastopno ponavljajuće sekvence dužine 2-4 parova nukleotida (engl. *short tandem repeats*, STR) i pokazuju visok stepen polimorfizma dužine, što je moguće ispitati primenom PCR tehnike.

U okviru DMD gena, kao i u njegovoj blizini, je otkriveno više dinukleotidnih mikrosatelitnih polimorfnih regiona, uglavnom CA ponovaka (engl. VNTR CA-repeats; *Leiden muscular Dystrophy pages*) koji se koriste u analizi vezanosti. Princip analize je da se najpre utvrdi koju formu DNK markera ima obolela osoba, a zatim se praćenjem tog markera u porodici indirektno zaključuje da li je član porodice nasledio rizični X hromozom ili nije, tj. da li je nasledio mutaciju ili ne. Ovakav indirektna način zaključivanja nosi dozu neizvesnosti zbog čestih rekombinacija unutar DMD gena (10%), pa je potrebno kombinovanje većeg broja markera kako bi se povećala pouzdanost u zaključivanju.

Primena analize vezanosti je od značaja kod utvrđivanja statusa prenosioca, kao i u prenatalnoj dijagnozi, posebno ukoliko nije poznat mutacioni status obolelog. Pored toga, mogu se otkriti žene prenosioci delecije na osnovu gubitka heterozigotnosti u deletiranom regionu. Takođe, analiza se pokazala veoma korisnom kod isključivanja statusa prenosioica mutacije.

Kada govorimo o prenatalnoj dijagnozi, primena analize vezanosti podrazumeva utvrđivanje prisustva rizičnog haplotipa kod ploda. Čak i kada se utvrdi da fetalna DNK poseduje isti haplotip kao obolela osoba (proband), plod ne mora biti pogođen ukoliko je mutacija kod probanda bila sporadična. Zato je neophodno da se prisustvo mutacije prethodno ispita kod majke. Ukoliko se kod majke ne utvrdi mutacija u somatskim ćelijama, rizik oboljevanja ploda je mali, ali ostaje mogućnost da majka ima gonadni mozaicizam (Helderman-van den Enden, 2009). Ova činjenica otežava

davanje genetičkog saveta pa se prenatalna dijagnoza preporučuje u svakoj narednoj trudnoći. Pouzdana dijagnoza kod ploda se postavlja primenom direktne genetičke metode nakon što se utvrdi pol ploda.

Analiza vezanosti ima svoje prednosti, ali i ograničenja. Prednost ove analize je u tome što nije neophodno poznavati tip mutacije kod obolelog, već samo odgovorni lokus. Ograničenja metode su postojanje neinformativnih genotipova, rekombinacije u DMD genu koje vode razdvajanju DNK markera i gena, a zahteva i ispitivanje većeg broja članova u porodici. U cilju definisanja preciznog mesta i prirode mutacije, ukoliko je moguće, potrebno je izvršiti sekvenciranje određenog regiona.

Zaključak

Važnost postavljanja genske dijagnoze kod obolelog od DMD/BMD, kao i otkrivanje žena koje su fenotipski zdravi prenosioci mutacije, ogleda se u mogućnosti procene rizika za ponovno javljanje bolesti u porodici i davanje genetičkog saveta – u smislu daljeg testiranja i moguće prevencije kroz prenatalnu dijagnozu.

Literatura

- Beggs, A. H., Koenig, M., Boyce, F. M., & Kunkel, L. M. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human Genetics*, *86*, 45-48.
- Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., ... Lochmuller, H. (2015). The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human Mutation*, *36*, 395-402.
- Buzin, C. H., Feng, J., Yan, J., Scaringe, W., Liu, Q., den Dunnen, J., ... Sommer, S. S. (2005). Mutation rates in the dystrophin gene: a hotspot of mutation at a CpG dinucleotide. *Human Mutation*, *25*, 177-88.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., & Caskey, C. T. (1990). Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 272-281). New York: Academic Press New York.
- Haldane, J. S. B. (2004). The rate of spontaneous mutation of a human gene. *Journal of Genetics*, *83*, 235-244.
- Helderman-van den Eenden, A. T., de Jong, R., den Dunnen, J. T., Houwing-Duistermaat, J. J., Kneppers, A. L., Ginjaar, H. B., ... Bakker, E. (2009). Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clinical Genetics*, *75*, 465-472.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H. Jr., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, *51*, 919-928.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, *50*, 509-517.

- Lalić, T., Vossen, R., Cofa, J., Schouten, J. P., Guc-Scekic, M., Radivojevic, D., ... den Dunnen, J. (2005). Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *European Journal of Human Genetics*, *13*, 1231-1234.
- Leiden muscular dystrophy pages (2006). *Markers in and around the dystrophin gene*. Retrieved from <http://www.dmd.nl>
- Maksić, J. (2018). *Značaj određivanja statusa prenosioca kod Dišenove i Bekerove mišićne distrofije u populaciji Srbije*. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.
- MRC-Holland-Start Page (2019). *MLPA protocols*. Retrieved from <https://www.mlpa.com>
- Murugan, S. M. S., Arthi, C., Thilothammal, N., & Lakshmi, B. R. (2013). Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy using molecular methods. *Indian Journal of Medical Research*, *137*, 1102-1110.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, *30*, e57.
- Singh, R., Vijaya, & Kabra, M. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of exonal deletions in patients of duchenne muscular dystrophy. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *21*, 147-51.
- Taylor, P. J., Maroulis, S., Mullan, G. L., Pedersen, R. L., Baumli, A., Elakis, G., ... Buckley, M. F. (2007). Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, *44*, 368-372.

GENE DIAGNOSIS OF DUCHENNE AND BECKER MUSCULAR DYSTROPHY AND CARRIER DETECTION

Jasmina Maksić^a, Ivana Novaković^b, Dragan Rapaić^a, Mirjana Mitrović^c

^aUniversity of Belgrade – Faculty of Special Education and Rehabilitation, Belgrade, Serbia

^bUniversity of Belgrade – Faculty of Medicine, Institute of Human Genetics, Belgrade, Serbia

^cOphthalmology practice Mitrović, Belgrade, Serbia

Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD) are progressive muscle diseases that result from mutations in the dystrophin gene. The dystrophin gene (DMD gene, Xp21.1) is 2.4MB in size and subject to changes the structure. Most common are intragenous deletions (65-70%) of one or more exons, with specific distribution in the gene (exons 2-20 and exons 45-55) and duplication (5-15%), and the rest are small mutations - point mutations, microinsertions, microdeletions, and splice-site mutations. It is estimated that 1/3 of DMD patients have de novo mutation, while in 2/3 of cases the mother is a carrier. The gene diagnosis of DMD/BMD can be made using direct or indirect molecular genetic analysis. The polymerase chain reaction (PCR) method is a direct method that allows detection of

about 98% of all deletions detected in the DMD gene. However, this method cannot detect deletions outside the predilection regions of the gene, nor duplication, and is not useful in the detection of female carriers. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enabled quantitative gene analysis and detection of deletions outside the predilection regions of the gene as well as duplication, both in patients and in the female carrier of mutations, and became a standard in DMD/BMD diagnosis. When these methods do not find deletions and duplications in the dystrophin gene, in order to search for point mutations, the test continues with the DNA sequencing method. However, due to the exceptional size of the gene and the random arrangement of point mutations, the linkage analysis can be applied first as an indirect diagnostic method. It involves monitoring the inheritance of risky chromosomes in males and females in the family, by monitoring polymorphic DNA markers within the DMD gene, or in its surroundings. Method limitations are the existence of non-informative genotypes, recombination in the DMD gene, and it requires the analysis of more family members. The precise diagnosis of affected men and the detection of women who are carriers is important for giving adequate genetic advice and carrying out prenatal diagnosis.

Key words: dystrophinopathy, diagnosis of dystrophinopathy, carrier detection