

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jovan Z. Pešović

**Mitotička i mejotička nestabilnost *DMPK*  
ekspanzija sa varijantnim ponovcima kao  
genetički modifikator fenotipa miotonične  
distrofije tipa 1**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovan Z. Pešović

**Mitotic and meiotic instability of *DMPK*  
expansions with variant repeats as a genetic  
modifier of myotonic dystrophy type 1  
phenotype**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Vidosava Rakočević-Stojanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Vidosava Rakočević-Stojanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Goran Brajušković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Pavle Anđus, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

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

## **Zahvalnica**

Ova doktorska disertacija urađena je u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao deo projekta „Analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti” (OI 173016), pod neposrednim rukovodstvom prof. dr Dušanke Savić-Pavićević i prof. dr Vidosave Rakočević-Stojanović. Doktorska disertacija je rezultat saradnje Centra za humanu molekularnu genetiku i Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije.

Profesorki Duški dugujem najveću zahvalnost na pruženoj prilici da svoj naučno-istraživački rad otpočnem u Centru za humanu molekularnu genetiku. Neizmerno sam joj zahvalan na neprocenjivoj i konstantnoj podršci, posvećenosti i pomoći u svim fazama izrade ove disertacije - prilikom odabira teme, realizaciji i interpretaciji dobijenih rezultata, prevazilaženja i rešavanja brojnih eksperimentalnih poteškoća i izazova, a naročito tokom pisanja naučnih radova i uobličavanja teksta disertacije. Posebno sam joj zahvalan na neiscrpnom entuzijazmu, prenetom iskustvu i znanju i na tome što je imala puno poverenja u mene, značajno doprinevši mom razvoju kao mladog istraživača.

Ogromnu zahvalnost dugujem profesorki Vidi, koja me zajedno sa profesorkom Duškom vodila kroz ovu disertaciju i pružala veliku podršku. Posebno sam joj zahvalan na saradnji u prikupljanju uzoraka i neophodnih kliničkih podataka sa Klinike za neurologiju, bez kojih ova disertacija ne bi poprimila ovu formu i došla do realizacije. Neizmerno sam joj zahvalan na dragocenoj pomoći, ohrabrenjima i sugestijama prilikom konačne izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Goranu Brajuškoviću na pruženoj pomoći i razumevanju, kao i velikom znanju i iskustvu koje uvek nesebično prenosi, još od mojih studentskih dana. Posebno sam mu zahvalan na posvećenom vremenu, ukazanoj pomoći i korisnim savetima u svim segmentima izrade disertacije, kad god je to bilo neophodno.

Posebnu zahvalnost dugujem i prof. dr Pavlu Anđusu na velikom znanju i iskustvu, prenesenim tokom studiranja, kao i na zajedničkoj saradnji na međunarodnim projektima, koja je bila od izuzetnog značaja na početku mog bavljenja naučno-istraživačkim radom.

Neizmerno sam zahvalan dr Stojanu Periću na nesebičnoj pomoći i podršci, koje su bile ključne u svim fazama izrade ove disertacije.

Hvala mojim dragim kolegama iz Centra za humanu molekularnu genetiku, dr Milošu Brkušaninu, dr Zorani Dobrijević, dr Jeleni Karanović, Neveni Kotarac, Suzani Matijašević, Lani Radenković, Dunji Petrović, Milici Jeličić, Marku Dunjiću, Nemanji Vučiću, Stefanu Cidilku, Vladu Kovčiću, Srđanu Mašireviću, Milošu Mandiću, Saši Švikoviću i šefici Marini Brusać, na ukazanom prijateljstvu, nesebičnoj pomoći, ali i neprestanim šalama i pozitivnoj atmosferi, zbog čega je rad u laboratoriji predstavljao pravo zadovoljstvo.

Osim toga, zahvalan sam i drugim članovima Instituta za fiziologiju i biohemiju, a posebno, dr Mileni Milošević, Dunji Bijelić, Mariji Adžić i Mini Perić, na nesebičnoj podršci i zajedničkom druženju tokom izrade ove disertacije.

Hvala Anji Santrač na prijateljstvu i neprestanoj podršci još od prvih studentskih dana.

Najzad, najveću zahvalnost dugujem najužoj porodici, svojim roditeljima i sestri Jeleni, na razumevanju, strpljenju, безусловnoj ljubavi i što su uvek tu za mene.

**Naslov:** Mitotička i mejotička nestabilnost *DMPK* ekspanzija sa varijantnim ponovcima kao genetički modifikator fenotipa miotonične distrofije tipa 1

**Sažetak:**

Miotonična distrofija tip 1 (DM1) je najčešća nasledna mišićna distrofija odraslih osoba i praćena je multisistemskim simptomima. Uzrokovana je ekspanzijama (povećanjem broja) CTG ponovaka u genu *DMPK*, koje se odlikuju mejotičkom i mitotičkom nestabilnošću sa težnjom ka daljem povećanju broja ponovaka. DM1 je jedna od fenotipski najvarijabilnijih monogenских bolesti. Broj CTG ponovaka je glavni faktor koji utiče na uzrast početka bolesti i težinu kliničke slike, a pretpostavlja se da različiti genetički, epigenetički i/ili sredinski faktori modifikuju njegov efekat. Manje od 5% DM1 bolesnika poseduje varijantne ponovke (CCG, CTC, GGC ili CAG) rasute među CTG ponovcima, i može ispoljiti neobične i blaže simptome, nego što se očekuje na osnovu njihovog broja ponovaka. Predmet ove doktorske teze bila je genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih ponovaka kod DM1 bolesnika i njihov modifikujući efekat na fenotip.

Varijantni ponovci su detektovani samo na 3' kraju ekspanzija kod 9 od 243 DM1 bolesnika (3,7%) iz 5 od 174 porodice (2,9%), primenom *repeat-primed* PCR-a (RP-PCR). Sangerovim sekvenciranjem RP-PCR proizvoda, CCG ponovci, organizovani kao pojedinačni, kratki ili dugi perfektni nizovi, ili kao pojedinačni ili pravilni nizovi CCGCTG heksamera, identifikovani su kod osam bolesnika. Kod preostalog bolesnika, prvi put je opisana *DMPK* ekspanzija sa *de novo* nastalim CTC ponovkom. Praćenjem četiri međugeneracijska prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija, primenom *longe-range* PCR-a i Southern blota, zapažena su stabilna prenošenja ili kontrakcije (smanjenje broja ponovaka). Korišćenjem podataka iz ove i publikovanih studija, pokazano je da se varijantne *DMPK* ekspanzije, suprotno čistim (sastavljenim iz perfektnih CTG ponovaka), međugeneracijski češće stabilno prenose ili kontrahuju, posebno kada je prenosilac majka. Somatska nestabilnost *DMPK* ekspanzija kvantifikovana je *single-molecule small-pool* PCR-om. Umnoženo je ~5700 alela, sa preko 200 alela po analiziranom uzorku krvi i bukalnog brisa. Somatska nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija, slično čistim, odlikovala se tkivnom specifičnošću i težnjom ka povećanju broja ponovaka tokom života bolesnika. Međutim, matematičkim modelovanjem pokazano je da se varijantne *DMPK* ekspanzije karakterišu nižim nivoom somatske nestabilnosti, koja je praćena manjim povećanjem broja ponovaka tokom vremena. RP-PCR profili su ukazali na to da su

varijantni ponovci stabilni u ćelijama krvi tokom vremena i između ćelija krvi i bukalne sluznice. Navedeni rezultati pružaju dokaze da različiti tipovi i obrasci varijantnih ponovaka doprinose stabilnosti *DMPK* ekspanzija u somatskim i polnim ćelijama. Primenom metil-specifičnog RP-PCR-a na bisulfitno-konvertovanoj genomskoj DNK i klasičnog RP-PCR-a na genomskoj DNK digeriranoj enzimom *SsiI*, prvi put je pokazano da su sami CCG ponovci u *DMPK* ekspanzijama heterogeno metilovani. Bisulfitnim sekvenciranjem uočena je i heterogena metilacija CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od ponovaka. Na osnovu zapažanja da relativni stepen metilacije samih CCG ponovaka i okolnih CpG ostrvaca zavisi od zastupljenosti i obrasca CCG ponovaka, pretpostavljeno je da se metilacija inicira na samim CCG ponovcima i lokalno širi na okolna CpG ostrvca. Neki od bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se atipičnim simptomima, kliničkom prezentacijom koja je pre ukazivala na miotoničnu distrofiju tip 2, kao i relativno kasnim uzrastom početka bolesti u odnosu na očekivani prema broju ponovaka. Matematičko modelovanje je pokazalo da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti imaju veći uticaj na uzrast početka simptoma kod bolesnika sa varijantnim ekspanzijama u odnosu na one sa čistim. Posredno, ovaj rezultat ukazuje na to da je mehanizam kojim varijantni ponovci doprinose kasnijem ispoljavanju početka bolesti vezan za stabilizaciju *DMPK* lokusa u somatskim ćelijama.

Rezultati ove doktorske teze pružaju dokaze o ulozi varijantnih ponovaka kao modifikatora DM1 fenotipa, ističući njihovu kliničku relevantnost. Aplikativni značaj rezultata bi mogao da se ogleda u doprinosu oko postizanja konsenzusa vezanog za genetičko savetovanje porodica sa varijantnim ponovcima, adekvatnom regrutovanju bolesnika za kliničke studije i dizajnu novih terapeutika, koji bi efekat *DMPK* ekspanzija modifikovali kroz suprimiranje njihove somatske nestabilnosti. Sa druge strane, otkriće metilacije CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama otvara bazična pitanja vezana za ulogu epigenetičkih mehanizama u stabilizaciji *DMPK* lokusa.

**Ključne reči:** CTG, CCG, ekspanzija, *DMPK*, miotonična distrofija 1, metilacija DNK, mejotička nestabilnost, mitotička nestabilnost, uzrast početka bolesti, varijantni ponovci

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija

**Title:** Mitotic and meiotic instability of *DMPK* expansions with variant repeats as a genetic modifier of myotonic dystrophy type 1 phenotype

**Abstract:**

Mitonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common inherited muscular dystrophy in adults, characterized by multisystem features. It is caused by expansions (an increase in the number) of CTG repeats in the *DMPK* gene, which are meiotically and mitotically unstable and tend to expand further. DM1 is phenotypically one of the most variable monogenic diseases. The number of CTG repeats is the main factor influencing age at onset and severity of disease. The effect of the causing mutation is assumed to be modified by different genetic, epigenetic and/or environmental factors. Less than 5% of DM1 patients carry variant repeats (CCG, CTC, GGC or CAG) scattered among CTG repeats, and they can express some unusual and milder symptoms than expected based on their number of repeats. The subject of this doctoral thesis was the genetic and epigenetic characterization of variant repeats in DM1 patients and their modifying effect on the phenotype.

Variant repeats were detected only at the 3' end of expansions in 9 out of 243 DM1 patients (3,7%) from 5 out of 174 families (2,9%), by *repeat-primed* PCR (RP-PCR). Sanger sequencing of RP-PCR products identified the CCG repeats in 8 patients, which were present as individual repeats, short or long pure tracts, or individual or short tracts of CCGCTG hexamers. In the remaining patient, a *DMPK* expansion with a *de novo* CTC variant repeat has been described for the first time. The analysis of four intergenerational transmissions of variant *DMPK* expansions by *long-range* PCR and Southern blot showed stable transmissions or even contractions (a decrease in the number). By combining data from this and previously published studies, it was shown that variant *DMPK* expansions, in contrast to the pure ones (carrying only CTG repeats), were more often stably transmitted or contracted, particularly when the transmitting parent was mother. Somatic instability of *DMPK* expansions was quantified by *single-molecule small-pool* PCR. A total of ~5700 alleles were amplified, with more than 200 alleles per analyzed blood and buccal swab sample. The somatic instability of variant *DMPK* expansions had characteristics similar to expansions consisting of pure CTG repeats: tissue specificity and a bias toward further expansions throughout the patient's life. However, mathematical modeling demonstrated that variant *DMPK* expansions were characterized by a lower level of somatic instability, which was accompanied by the lower expansion size increment in blood cells over time.



RP-PCR profiles indicated that variant repeats were stable at the 3' end of *DMPK* expansions in blood and buccal cells, and in blood cells over time. These results provide evidence that different types and patterns of variant repeats contribute to the stability of *DMPK* expansions in somatic and germ cells. Using methyl-specific RP-PCR on a bisulfite-converted genomic DNA and classical RP-PCR on genomic DNA digested by *SsiI* enzyme, it was discovered that variant CCG repeats were heterogeneously methylated within *DMPK* expansions. Bisulfite sequencing revealed heterogenic methylation of CpG islands upstream and downstream of repeat tract. Based on the observation that the relative degree of methylation of CCG repeats and CpG islands depends on quantity and patterns of CCG repeats, it is hypothesized that methylation is initiated on CCG repeats and spreads locally on the surrounding CpG islands. Some patients with variant *DMPK* expansions were characterized by atypical symptoms, e.g. clinical presentation indicative of myotonic dystrophy type 2, as well as relatively later age at onset than expected based on the number of repeats. Mathematical modeling demonstrated that individual specific differences in the level of somatic instability had a greater impact on age at onset in patients with variant expansions compared to those with pure expansions. Indirectly, this result implies that variant repeats contribute to the later age at onset by the mechanism related to stabilization of *DMPK* locus in somatic cells.

Results of this doctoral thesis provide evidence for the role of variant repeats as modifiers of DM1 phenotype, emphasizing their clinical relevance. The applicative significance of the results could be reflected in the contribution to reaching a consensus on genetic counseling for families with variant repeats, adequate recruitment of patients for clinical studies and the design of new therapies, which would modify the effect of *DMPK* expansions by suppressing their somatic instability. On the other hand, the discovery of methylation of CCG repeats in *DMPK* expansions opens questions about the role of epigenetic mechanisms in the stabilization of *DMPK* locus.

**Key words:** CTG, CCG, expansion, *DMPK*, myotonic dystrophy 1, DNA methylation, meiotic instability, mitotic instability, age at onset, variant repeats

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Molecular Biology

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kliničke karakteristike miotonične distrofije tip 1 .....	2
1.2. Molekularno-genetička osnova miotonične distrofije tip 1 .....	5
1.2.1. Mejotička nestabilnost DMPK ekspanzija.....	6
1.2.2. Mitotička nestabilnost DMPK ekspanzija .....	8
1.3. Korelacija genotipa i fenotipa kod miotonične distrofije tip 1 .....	10
1.3.1. Varijantni ponovci u DMPK ekspanzijama.....	12
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1. Ispitanici .....	15
3.2. Izolovanje, provera kvaliteta i kvantifikacija genomske DNK .....	17
3.2.1. Protokol za izolovanje DNK iz krvi korišćenjem seta QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka).....	17
3.2.2. Protokol za pripremu agaroznog gela i gel elektroforezu.....	18
3.2.3. Protokol za kvantifikaciju genomske DNK korišćenjem seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, SAD).....	19
3.3. Ispitivanje prisustva varijantnih ponovaka na 5' i 3' krajevima DMPK ekspanzija korišćenjem repeat-primed PCR-a.....	20
3.3.1. Protokol za fragment analizu .....	22
3.4. Određivanje tipa i obrazaca varijantnih ponovaka u DMPK ekspanzijama primenom repeat-primed PCR-a i sekvenciranja.....	24
3.4.1. Protokol za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćenjem seta Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, SAD).....	26
3.4.2. Protokol za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćenjem seta QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka).....	27
3.4.3. Protokol za prečišćavanje reakcije sekvenciranja korišćenjem precipitacije sa etanolom i EDTA.....	28
3.5. Određivanje veličine varijantnih DMPK ekspanzija primenom long-range PCR-a i Southern blota.....	29
3.5.1. Protokol za pripremu agaroznog gela i gel elektroforezu za Southern blot.....	31
3.5.2. Protokol za denaturaciju, neutralizaciju i reverzni kapilarni transfer .....	32
3.5.3. Protokol za hibridizaciju sa (CAG) <sub>12</sub> probom.....	33

3.5.4.	<i>Protokol za hemiluminiscentnu detekciju.....</i>	34
3.5.5.	<i>Protokol za alkalno stripovanje probe sa najlonske membrane.....</i>	35
3.5.6.	<i>Protokol za 3'obeležavanje (CAG)<sub>12</sub> probe sa digoksigenin-11-ddUTP-om.....</i>	35
3.5.7.	<i>Protokol za 3'obeležavanje DNK standarda za veličinu sa digoksigenin-11-ddUTP-om.....</i>	36
3.6.	Ispitivanje prisustva varijantnih ponovaka uzvodno od 3' kraja <i>DMPK</i> ekspanzija digestijom <i>long-range</i> PCR proizvoda enzimom <i>SsiI</i> .....	37
3.7.	Određivanje strukture varijantnih ponovaka uzvodno od 3' kraja <i>DMPK</i> ekspanzija sekvenciranjem i <i>repeat-primed</i> PCR-om za detekciju perfektnih CCG nizova .....	38
3.8.	Kvantifikacija somatske nestabilnosti <i>DMPK</i> ekspanzija primenom <i>single-molecule small-pool</i> PCR-a.....	39
3.9.	Ispitivanje metilacije CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od (CTG) <sub>n</sub> niza u genu <i>DMPK</i> primenom bisulfitnog sekvenciranja .....	40
3.9.1.	<i>Protokol za bisulfitnu konverziju genomske DNK korišćenjem seta EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, SAD).....</i>	44
3.10.	Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u <i>DMPK</i> ekspanzijama primenom metil-specifičnog <i>repeat-primed</i> PCR-a .....	46
3.11.	Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u <i>DMPK</i> ekspanzijama primenom <i>repeat primed</i> PCR-a i genomske DNK digerirane enzimom <i>SsiI</i> kao matrice .....	50
3.12.	Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u ponovljenim nizovima gena <i>FMRI</i> i <i>HTT</i> primenom metil-specifičnog <i>repeat primed</i> PCR-a.....	51
3.13.	Statistička obrada rezultata.....	54
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>58</b>
4.1.	Strukture varijantnih ponovaka na 3' kraju <i>DMPK</i> ekspanzija i opšte kliničke karakteristike bolesnika .....	58
4.1.1.	<i>Porodica DF1</i> .....	58
4.1.2.	<i>Porodica DF2</i> .....	60
4.1.3.	<i>Porodica DF3</i> .....	63
4.1.4.	<i>Bolesnik DF4-1</i> .....	63
4.1.5.	<i>Porodica DF5</i> .....	64
4.2.	Strukture varijantnih CCG ponovaka uzvodno od 3' kraja <i>DMPK</i> ekspanzija .....	66
4.3.	Mejotička nestabilnost varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija .....	68
4.3.1.	<i>Međugeneracijske promene veličine varijantnih DMPK ekspanzija u ispitivanim porodicama</i> .....	68

4.3.2.	<i>Povezanost varijantnih ponovaka sa međugeneracijskom nestabilnošću DMPK ekspanzija</i> .....	68
4.3.3.	<i>Povezanost pola roditelja prenosioca i međugeneracijske nestabilnosti varijantnih DMPK ekspanzija</i> .....	70
4.4.	Mitotička nestabilnost varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija .....	72
4.4.1.	<i>Kvantifikacija somatske nestabilnosti varijantnih DMPK ekspanzija</i> .....	72
4.4.2.	<i>Tkivna specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih DMPK ekspanzija</i> .....	75
4.4.3.	<i>Povezanost varijantnih ponovaka sa somatskom nestabilnošću DMPK ekspanzija</i> ..	76
4.4.4.	<i>Somatska nestabilnost varijantnih DMPK ekspanzija tokom vremena</i> .....	79
4.4.5.	<i>Mutaciona dinamika 3' i 5' krajeva varijantnih DMPK ekspanzija u somatskim ćelijama</i> .....	82
4.5.	Metilacioni status varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija .....	86
4.5.1.	<i>Metilacioni status CpG ostrvaca u regionima uzvodno i nizvodno od varijantne DMPK ekspanzije</i> .....	86
4.5.2.	<i>Metilacioni status varijantnih CCG ponovaka u DMPK ekspanzijama</i> .....	90
4.5.3.	<i>Povezanost metilacije varijantnih ponovaka na 3' kraju ekspanzije i metilacije CpG ostrvaca u regionima nizvodno i uzodno od ponovaka u genu DMPK</i> .....	98
4.5.4.	<i>Validacija metil-specifičnog RP-PCR-a dizajniranog za ispitivanje metilacionog statusa varijantnih CCG ponovaka u DMPK ekspanzijama</i> .....	100
4.6.	Korelacija genotipa i fenotipa kod bolesnika sa varijantnim <i>DMPK</i> ekspanzijama.....	103
4.6.1.	<i>Povezanost varijantnih ponovaka sa mišićnom zahvaćenošću i stepenom miotonije kod DMI bolesnika</i> .....	103
4.6.2.	<i>Uticaj varijantnih ponovaka na uzrast početka bolesti kod DMI bolesnika</i> .....	106
4.6.3.	<i>Uticaj somatske nestabilnosti varijantnih DMPK ekspanzija na međuindividualne razlike u uzrastu početka bolesti kod DMI bolesnika</i> .....	108
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>113</b>
5.1.	Tipovi, obrasci i lokacija varijantnih ponovaka u <i>DMPK</i> ekspanzijama .....	114
5.2.	Mejotička nestabilnost varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija i uticaj pola.....	116
5.3.	Mitotička nestabilnost varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija: tkivna specifičnost, stepen nestabilnosti i progresija tokom vremena.....	118
5.4.	Efekat varijantnih ponovaka na stabilizaciju i metilaciju <i>DMPK</i> ekspanzija u somatskim ćelijama .....	122
5.5.	Uticaj varijantnih ponovaka na kliničku prezentaciju miotonične distrofije tip 1.....	127
5.6.	Aplikativan značaj studije .....	130

<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>133</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>135</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>148</b>
8.1. Prilog 1 – Dozvola Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije .....	148
8.2. Prilog 2 .....	149

# 1. Uvod

Miotonična distrofija tip 1 (DM1, MIM #160900) predstavlja najčešću mišićnu distrofiju kod odraslih osoba sa procenjenom kliničkom prevalencijom od 1 do 20 obolelih na 100 000 stanovnika u populaciji belaca (P. Harper, 2001). To je autozomno dominantno oboljenje, multisistemskog karaktera sa simptomima koji uključuju: mišićnu slabost, miotoniju, kataraktu, poremećaje srčanog sprovođenja i ritma, endokrinopatije, kao i zahvaćenost centralnog i perifernog nervnog sistema (P. Harper, 2001; Meola & Cardani, 2015). Upadljiva odlika bolesti je genetička anticipacija, fenomen da se bolest u sledećoj generaciji ispoljava ranije sa težom kliničkom prezentacijom (Howeler, Busch, Geraedts, Niermeijer, & Staal, 1989). DM1 je klinički opisana pre više od 100 godina (Steinert, 1909), genetička anticipacija je zapažena 1918. godine (Fleischer, 1918), dok je genetička osnova bolesti otkrivena tek 1992. godine. Uzročna mutacija je ekspanzija trinukleotidnih ponovaka CTG u 3' netranslatirajućem regionu gena *DMPK* (eng. *Dystrophia Myotonica Protein Kinase*, MIM \*605377), koji se nalazi na hromozomskom lokusu 19q13.3 (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). Dve godine kasnije opisano je autozomno-dominantno oboljenje koje odlikuju simptomi nalik DM1, ali bez mutacije u genu *DMPK* (Ricker et al., 1994; Thornton, Griggs, & Moxley, 1994). Originalno označena kao proksimalna miotonična miopatija ili proksimalna miotonična distrofija, nakon mapiranja uzročne mutacije na hromozomskom lokusu 3q21.5, ovo oboljenje je nazvano miotonična distrofija tip 2 (DM2, MIM #602668). DM2 je uzrokovana ekspanzijom tetranukleotidnih ponovaka CCTG u prvom intronu gena *CNBP* (eng. *CCHC-type Zinc Finger Nucleic Acid-Binding Protein*, MIM \*116955) (Liquori et al., 2001). Imajući u vidu prirodu uzročnih mutacija, oba oboljenja pripadaju „bolestima nestabilnih ekspanzija ponovaka” (Gatchel & Zoghbi, 2005). DM1 je prvo oboljenje kod kojeg je otkriveno da mutirani molekul RNK dobija novu, toksičnu funkciju (eng. *RNA gain-of-function*) (Mankodi et al., 2000; J. Wang et al., 1995), čime je postala paradigma za model toksičnosti molekula RNK u procesima molekularne patogeneze. Glavni mehanizam molekularne patogeneze DM1 vezuje se za zarobljavanje proteina MBNL na sekundarnim strukturama mutiranih *DMPK* RNK, formiranim od strane CUG ponovaka, što se uočava

kao prisustvo ribonukleoproteinskih fokusa u nukleusima ćelija DM1 bolesnika (Mankodi et al., 2000). S obzirom na to da su proteini MBNL tkivno-specifični regulatori metabolizma RNK, pre svega alternativnog splajsovanja, njihovo funkcionalno zarobljavanje na mutiranim *DMPK* RNK rezultuje poremećajem u obrascu alternativnog splajsovanja brojnih RNK, vodeći do opšteg poremećaja u metabolizmu RNK kod DM1 bolesnika.

### **1.1. Kliničke karakteristike miotonične distrofije tip 1**

DM1 je jedna od fenotipski najvarijabilnijih monogenских bolesti i u zavisnosti od uzrasta kada se javljaju prvi simptomi, težine simptoma i veličine *DMPK* ekspanzije razlikuju se kasna, juvenilno-adultna, dečja i kongenitalna forma (De Antonio et al., 2016; Harley et al., 1993; Udd & Krahe, 2012). Iako se svaka forma bolesti odlikuje specifičnom kliničkom prezentacijom, ne može se podvući apsolutno jasna granica između njih, tako da se pre može govoriti o fenotipskom kontinuumu DM1 (Savic Pavicevic et al., 2013).

Juvenilno-adultna forma predstavlja najčešću formu DM1 sa uzrastom početka bolesti u drugoj ili trećoj deceniji života i kliničkom prezentacijom tipičnom za DM1, zbog čega je poznata i kao „klasična” forma (P. Harper, 2001; Udd & Krahe, 2012). Tri glavna simptoma zbog kojih započinje dijagnostika kod ovih bolesnika su: mišićna slabost, miotonija i katarakta (Meola & Cardani, 2015; Udd & Krahe, 2012). Mišićni simptomi uključuju progresivnu degeneraciju mišića koja dovodi do slabosti pretežno distalnih mišića ekstremiteta. Ovi pacijenti imaju poteškoće u obavljanju zadataka koji zahtevaju preciznost i spretnost šaka, uz slabost stopala i saplitanje pri hodu. Slabost i atrofija mišića lica i vrata, zajedno sa ptozom (spuštenošću kapaka), daju karakterističan miopatski izgled lica. Miotonija, koja se definiše kao usporena relaksacija nakon normalne kontrakcije mišića, često je prisutna i prilikom kliničkog pregleda i na elektromiografskom zapisu. Najčešće se javljaju aktivna (usporeno opružanje prstiju šaka nakon prethodnog stiska šake u pesnicu) i perkusiona (perkusijom po tenaru dolazi do adukcije palca uz sporu relaksaciju) miotonija šaka. Miotonija može biti prisutna i kod drugih mišića kao što su bulbarni, mišići jezika i lica, što dovodi do otežanog govora i poteškoća u žvakanju i gutanju (P. Harper, 2001;

Meola & Cardani, 2015). Kod skoro svih bolesnika razvija se zadnja subkapsularna katarakta, koja se obično javlja u ranijem uzrastu, a može biti i jedini simptom bolesti. Prisustvo presenilne katarakte može biti dovoljan razlog za sumnju na miotoničnu distrofiju (Rakocevic-Stojanovic et al., 2017). Kardiološki simptomi najčešće uključuju poremećaje srčanog sprovođenja sa aritmijom i zastojima koji značajno doprinose mortalitetu ovih bolesnika (Groh et al., 2008; Peric et al., 2013). Iz tog razloga, adekvatno lečenje poremećaja u srčanom ritmu i sprovođenju je od izuzetnog značaja u sprečavanju naprasne smrti kod ovih osoba (Paunic et al., 2017). Kod DM1 bolesnika su često narušene i funkcije endokrinog sistema, usled čega se javlja insulinska rezistencija sa blažom formom dijabetesa tip 2, kao i hipogonadizam kod muškaraca koji je najčešće uzročnik steriliteta (P. Harper, 2001; Peric et al., 2013). Među simptomima koji zahvataju nervni sistem prisutna su oštećenja perifernih nerava, neurobihevirolne manifestacije, kao i kognitivno narušenje (Meola & Cardani, 2015; Udd & Krahe, 2012). Među domenima kognitivnih funkcija, najčešće su zastupljeni poremećaji vizuoprostornih i egzekutivnih funkcija, dok su narušenja u memoriji i jeziku prisutna kod bolesnika sa težom kliničkom prezentacijom (Peric et al., 2017). Pokazano je da različiti poremećaji centralnog nervnog sistema značajno utiču na kvalitet života ovih bolesnika (Rakocevic-Stojanovic et al., 2014). DM1 bolesnici neretko ispoljavaju smanjenu percepciju sopstvenih simptoma, prekomernu dnevnu pospanost, a u kasnijem uzrastu i apatiju. Zajedno, ovi simptomi mogu imati za posledicu niži nivo obrazovanja, smanjenu profesionalnu aktivnost i loš socio-ekonomski status.

Kongenitalna forma predstavlja najtežu formu DM1 sa simptomima koji se ispoljavaju pre rođenja u vidu polihidramniona i smanjenih fetalnih pokreta (P. S. Harper, 1975). Po rođenju, glavni simptomi uključuju ozbiljnu opštu mišićnu slabost, hipotoniju, probleme sa ishranom i disanjem, usled kojih je smrtnost prilično visoka u toku prve godine života (Rutherford, Heckmatt, & Dubowitz, 1989). Za razliku od „klasične” forme, mišićna slabost kod kongenitalne forme nije posledica degenerativnih promena, već razvojnih oštećenja (Udd & Krahe, 2012). Kod dece koja prežive neonatalni period dolazi do postepenog poboljšanja motornih funkcija i većina njih stekne mogućnost samostalnog



hoda. Međutim, karakteristična su kašnjenja u intelektualnom razvoju i većina bolesnika je mentalno retardirana. Simptomi koji karakterišu adultnu formu bolesti, kao što su degenerativni procesi u mišićima i klinička miotonija, mogu se javiti u kasnom detinjstvu i obično imaju sporiju progresiju. Ovi bolesnici obično razviju ozbiljnije kardiorespiratorne probleme u trećoj ili četvrtoj deceniji života (Meola & Cardani, 2015).

Dečja forma DM1 odlikuje se kliničkom prezentacijom pre desete godine života (Yum, Wang, & Kalsotra, 2017). Ova forma je dugo zanemarivana usled pojave simptoma koji nisu tipični za mišićnu distrofiju i naizgled negativne porodične istorije. Kod obolele dece se obično ne ispoljavaju mišićna slabost i miotonija. Naprotiv, javljaju se kognitivni i bihevioralni poremećaji, kao što su poteškoće u učenju i socijalizaciji u školi (Echenne et al., 2008; Steyaert, de Die-Smulders, Fryns, Goossens, & Willekens, 2000). Kao i u slučaju kongenitalne forme, oboleli od dečje forme DM1 mogu ispoljiti slabost distalnih mišića i miotoniju u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi. Takođe, dugoročnim praćenjem ovih bolesnika uočeno je postojanje loše prognoze za njihovo aktivno učešće u društvu, usled bihevioralnih, kognitivnih i problema društvene stigme u ranom detinjstvu (Gagnon et al., 2017).

Kasna forma DM1 obično se ispoljava nakon četrdesete godine života (Yum et al., 2017). Većina pacijenata razvija samo blage simptome, među kojima je najčešća katarakta (Arsenault et al., 2006). Međutim, kod nekih bolesnika dolazi do razvoja blage mišićne slabosti, dok se miotonija može detektovati samo na elektromiografskom zapisu. Osobe sa kasnom formom bolesti obično žive preko 60 godina ili imaju normalan životni vek (Turner & Hilton-Jones, 2010).

## 1.2. Molekularno-genetička osnova miotonične distrofije tip 1

Uzročna mutacija kod DM1 pripada dinamičnim mutacijama, koje podrazumevaju nestabilne promene u broju kopija (najčešće povećanje) jednostavnih ponovljenih sekvenci u genomu (Richards & Sutherland, 1992). Do danas je otkriveno da dinamične mutacije leže u osnovi preko 30 naslednih oboljenja, od kojih većina zahvata nervni sistem (La Spada & Taylor, 2010; Paulson, 2018).

Broj CTG ponovaka u genu *DMPK* je varijabilan u opštoj populaciji i kreće se od 5 do 35, dok je kod DM1 bolesnika u opsegu od 50 do nekoliko hiljada (The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC), 2000). Aleli koji poseduju između 35 i 50 CTG ponovaka obično nisu povezani sa bolešću i označavaju se kao premutacije. Uopšteno govoreći, broj ponovaka u mutiranim alelima pokazuje povezanost sa kliničkim formama bolesti (De Antonio et al., 2016; Harley et al., 1993). Najčešće, bolesnici sa kasnom formom bolesti poseduju male ekspanzije, veličine od 50 do 80 CTG ponovaka, koje se označavaju kao protomutacije (Barcelo, Mahadevan, Tsilfidis, MacKenzie, & Korneluk, 1993). Kao i premutacije, protomutacije pokazuju povećanu nestabilnost ka ekspanzijama, usled čega njihovi nosioci imaju povećan rizik za dobijanje potomstva sa velikim ekspanzijama. Bolesnici sa juvenilno-adultnom formom DM1 odlikuju se širokim opsegom veličine mutacije, otprilike od 100 do 1000 ponovaka, dok osobe sa kongenitalnom i dečjom formom uglavnom imaju preko 1000 CTG ponovaka (The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC), 2000).

Niz CTG ponovaka u genu *DMPK* nalazi se u okviru CpG ostrva veličine 3,5 kb, koje uključuje dva vezivna mesta za protein CTCF (eng. *CCCTC-binding factor*), od kojih se jedno nalazi uzvodno (mesto CTCF1), a drugo nizvodno (mesto CTCF2) u odnosu na (CTG)<sub>n</sub> niz. Pretpostavljeno je da vezivanje CTCF za ciljna mesta, zajedno sa nizom CTG ponovaka, ima ulogu insulatora između gena *DMPK* i nizvodnog gena *SIX5* (Filippova et al., 2001). Kod skoro svih bolesnika sa kongenitalnom formom bolesti zabeležena je metilacija CpG ostrvaca u regionu uzvodno od ponovaka (Steinbach, Glaser, Vogel, Wolf, & Schwemmle, 1998), a kod većine i u nizvodnom regionu (Barbe et al., 2017). Sa druge

strane, kod ostalih DM1 bolesnika nije zabeležena metilacija. Izuzetak su retki bolesnici sa juvenilno-adultnom formom bolesti kod kojih je detektovana metilacija CpG ostrvaca nizvodno od ponovaka (Barbe et al., 2017).

### **1.2.1. Mejotička nestabilnost *DMPK* ekspanzija**

Mutirani *DMPK* aleli odlikuju se mejotičkom nestabilnošću, koja je biološka osnova fenomena genetičke anticipacije prisutne u DM1 porodicama (Howeler et al., 1989). Pravac i veličina međugeneracijskih promena u broju ponovaka zavise od veličine ekspanzije i pola roditelja prenosioca. Ukoliko se prenose sa majke, pre- i protomutacije se nasleđuju stabilno ili sa manjim promenama u broju ponovaka tokom nekoliko generacija (Savic et al., 2006). Sa druge strane, prilikom prenošenja sa oca, premutacioni *DMPK* aleli pokazuju povećanu nestabilnost, dostižući velike ekspanzije u narednoj generaciji (Martorell, Monckton, Sanchez, Lopez De Munain, & Baiget, 2001), dok se protomutacije skoro uvek odlikuju velikim povećanjem u broju ponovaka (Barcelo et al., 1993). Izrazita sklonost pre- i protomutacija ka daljim ekspanzijama nakon prenošenja sa oca predstavlja molekularnu osnovu fenomena da među bolesnicima sa kasnom formom bolesti u DM1 porodicama preovlađuju muškarci (Brunner, Bruggenwirth, et al., 1993). *DMPK* ekspanzije sa više od 100 CTG ponovaka odlikuju se nestabilnim prenošenjima sa oba pola. Najčešće dolazi do daljeg povećanja broja ponovaka (Harley et al., 1993; Lavedan et al., 1993), ali se zapažaju i kontrakcije (Ashizawa et al., 1994; O'Hoy et al., 1993), ili, veoma retko, čak reverzije (Brunner, Jansen, et al., 1993). Međutim, kao i u slučaju pre- i protomutacija, u prenošenjima punih mutacija uočene su određene razlike u odnosu na pol prenosioca. Na primer, studija na ~1500 DM1 bolesnika, koji poseduju ekspanziju u opsegu 200-1000 ponovaka, pokazala je da je većina prenošenja sa majki (66%) za rezultat imala dalju ekspanziju, dok je najveći procenat prenošenja sa oca (69%) bio stabilan ili je rezultovao kontrakcijom (Salehi et al., 2007). Zbog navedenog, najveće ekspanzije, povezane sa kongenitalnom formom bolesti (od preko 1000 CTG ponovaka), po pravilu se prenose sa majke (Lavedan et al., 1993; Tsilfidis, MacKenzie, Mettler, Barcelo, & Korneluk, 1992), iako je opisano i nekoliko slučajeva prenošenja kongenitalne forme sa oca (Zeesman, Carson, & Whelan, 2002).

Studije na embrionima i gametima, dobijenim prilikom preimplantacione dijagnostike, otkrile su značajna povećanja u broju ponovaka u embrionima ženskih DM1 bolesnika, kao i u njihovim nezrelim i zrelim oocitama, dok kontrakcije nisu zabeležene (De Temmerman et al., 2004). Sa druge strane, spermatozoe i embrioni dobijeni od muških DM1 bolesnika pokazali su znatno manje povećanje ili kontrakcije (De Temmerman et al., 2004; Martorell et al., 2007).

Nivo nestabilnosti ekspanzija je značajno veći u uzorcima sperme u odnosu na nivoe zabeležene iz krvi bolesnika (Martorell et al., 2004; Monckton, Wong, Ashizawa, & Caskey, 1995). Uzorke sperme obolelih muškaraca odlikovala je velika heterogenost u veličini *DMPK* alela, pri čemu su distribucije učestalosti alela bile nagnute ka daljim ekspanzijama. Najveće promene u dužini zapažene su kod pre- i protomutacionih alela, dok je najveća učestalost kontrakcija primećena kod *DMPK* alela sa punom mutacijom (Martorell et al., 2004). U svim analiziranim uzorcima sperme nisu primećeni aleli sa više od 1000 CTG ponovaka (Jansen et al., 1994; Monckton et al., 1995).

Tačan vremenski trenutak mejotičke nestabilnosti i dalje ostaje nedovoljno razjašnjen. U ljudskim DM1 oocitama povećanje broja kopija zabeleženo je pre završetka mejoze, verovatno tokom premejozičke proliferacije oogonija ili u toku profaze I mejoze (De Temmerman et al., 2004). U DM1 transgenim miševima, koji poseduju više od 300 ponovaka u okviru većeg segmenta ljudskog genoma, ekspanzije su uočene i u spermatogonijama i u spermatozoama, ukazujući na to da su se odigrale na početku spermatogeneze, pre samog početka mejoze (Savouret et al., 2004).

Varijabilnost u dinamici nestabilnosti *DMPK* alela u muškim i ženskim mejozama dokumentovana je kroz relativno retke slučajeve prenošenja kongenitalne forme bolesti sa oca (Zeesman et al., 2002), kao i retka zapažanja relativno stabilnog prenošenja ili kontrakcija velikih *DMPK* ekspanzija sa majke (Ashizawa et al., 1994; Salehi et al., 2007), što je zapaženo i u našim dosadašnjim istraživanjima. Opisana varijabilnost ukazuje na to da, pored veličine ekspanzije, dodatni faktori mogu uticati na dinamiku nestabilnosti *DMPK* ekspanzije u muškim i ženskim mejozama. Identifikacija takvih faktora je od posebnog značaja za adekvatan genetički savet DM1 porodicama.

### 1.2.2. Mitotička nestabilnost *DMPK* ekspanzija

*DMPK* ekspanzije odlikuje izrazita mitotička nestabilnost, koja rezultuje somatskim mozaicizmom. Somatski mozaicizam je tkivno-specifičan, zavisan od uzrasta i sklon daljim ekspanzijama tokom života bolesnika (Martorell et al., 1998; Monckton et al., 1995; Wong, Ashizawa, Monckton, Caskey, & Richards, 1995). Pored toga, i ćelije jednog tkiva odlikuju se mutiranim *DMPK* alelima različitih veličina. Izražen somatski mozaicizam mutiranih *DMPK* alela otežava praćenje međugeneracijskih promena u broju CTG ponovaka, jer se one uglavnom zasnivaju na analizama mutiranih *DMPK* alela iz ćelija krvi. S tim u vezi, promena u veličini ekspanzije prilikom prenošenja predstavlja rezultat mejotičke nestabilnosti kod roditelja prenosioca, ali i mitotičke nestabilnosti u ćelijama krvi roditelja i potomaka.

Somatski mozaicizam je zabeležen u svim ispitivanim tkivima DM1 bolesnika. Razlika u veličini ekspanzije može se detektovati još u ranom embrionalnom stadijumu (Martorell, Johnson, Boucher, & Baiget, 1997; Wohrle et al., 1995). Ona je primećena kod fetusa starog 16 nedelja (Martorell et al., 1997) i pretpostavlja se da mozaicizam nastaje na početku drugog tromesečja gestacije (Wohrle et al., 1995). Ovaj period se dovodi u vezu sa početkom ubrzanog rasta fetusa, ukazujući na stabilnost ekspanzije tokom stadijuma diferencijacije u prvom tromesečju. Wohrle et al. (1995) pretpostavljaju da bi se stabilnost ekspanzije u ovom periodu mogla objasniti većom tačnošću mehanizama za popravku oštećenja molekula DNK tokom prvog tromesečja, koja se ne može održati u periodu ubrzanog rasta. Drugi mogući mehanizam suzbijanja ekspanzije ponovaka tokom faze diferencijacije mogla bi biti metilacija regiona koji sadrži CTG ponovke (Wohrle et al., 1995). U tkivima koja su primarno zahvaćena bolešću, kao što su skeletni mišići i srce, veličina ekspanzije je mnogo veća u odnosu na perifernu krv (Ashizawa, Dubel, & Harati, 1993; Thornton, Johnson, & Moxley, 1994), dok su najmanje ekspanzije prisutne u kori prednjeg mozga i talamusu (Jansen et al., 1994).

U okviru jednog tkiva DM1 bolesnika somatski mozaicizam *DMPK* ekspanzija se obično zapaža kao difuzni razmaz (eng. *smear*) na genomskom ili PCR-baziranom Southern blotu, zbog čega se veličina ekspanzije najčešće procenjuje kao modalni broj ponovaka. Primena *small-poll* PCR-a (SP-PCR) omogućila je razdvajanje ovog heterogenog razmaza u seriju diskretnih traka koje nastaju umnožavanjem pojedinačnih mutiranih *DMPK* alela (Monckton et al., 1995; Wong et al., 1995). SP-PCR podrazumeva umnožavanje ekspanzovanih alela iz višestrukih malih količina DNK (eng. *small pools*) u opsegu od 0,5 do 200 genomskih ekvivalenata. Proizvodi se razdvajaju agaroznom gel elektroforezom i detektuju Southern blot hibridizacijom pod uslovima koji dozvoljavaju identifikaciju pojedinačnih alela (Gomes-Pereira, Bidichandani, & Monckton, 2004). Kao takva, ova metoda omogućava detaljnu kvantifikaciju stepena varijabilnosti u veličini ekspanzije u datom uzorku. Kvantifikacija stepena mozaicizma u ćelijama krvi pokazala je visok nivo varijabilnosti, pri čemu su se distribucije učestalosti alela karakterisale nagnutošću ka većim dužinama alela i jasnom donjom granicom, ispod koje su pojedinačni aleli bili retki (Monckton et al., 1995). Kvantifikacija stepena somatskog mozaicizma kod pojedinačnih DM1 bolesnika ukazala je na očuvanost donje granice veličine *DMPK* ekspanzije između različitih tkiva, zbog čega je predloženo da se veličina donje granice uzima kao mera za veličinu progenitornog *DMPK* alela, odnosno alela koji je nasleđen od roditelja prenosioca (Monckton et al., 1995).

Rezultati matematičkog modelovanja somatske nestabilnosti u ćelijama krvi, na osnovu podataka za veliki broj mutiranih *DMPK* alela, ukazuju na to da sklonost ka daljim ekspanzijama predstavlja kumulativni efekat velikog broja događaja ekspanzija i kontrakcija, među kojima su događaji ekspanzije češći (Higham, 2013). Procene da bi se mnogi događaji ekspanzije i kontrakcije mogli odigravati svakog drugog dana, pre podržavaju ulogu sistema za popravku oštećenja molekula DNK i procesa transkripcije u somatskoj nestabilnosti, nego procesa replikacije (Higham, 2013). Nagnutost distribucija učestalosti alela je u skladu sa zapažanjima da nivo somatske nestabilnosti ekspanzovanih CTG ponovaka zavisi od starosti bolesnika i veličine ekspanzije. U longitudinalnim studijama, na uzorcima krvi DM1 bolesnika dobijenih iz više vremenskih tačaka, pokazano

je da vremenom dolazi do povećanja heterogenosti veličine alela i srednje veličine ekspanzije (Martorell et al., 1998), ukazujući na to da je somatska nestabilnost kontinuirana tokom života bolesnika i sklona daljim ekspanzijama. Bolesnici sa većim stepenom nestabilnosti su generalno stariji i sa težom kliničkom prezentacijom. Međutim, uzorci starijih bolesnika sa kasnom formom bolesti obično pokazuju nizak nivo somatske nestabilnosti, nagoveštavajući time da nestabilnost ekspanzovanih alela nije pod uticajem samo uzrasta bolesnika, već i veličine ekspanzije. Detaljna kvantifikacija somatske nestabilnosti, primenom metode SP-PCR-a, na grupi od 136 DM1 bolesnika i izvedeni modeli linearne regresije pokazali su da se veliki udeo varijabilnosti (89%) u somatskoj nestabilnosti objašnjava dužinom progenitornog alela i uzrastom bolesnika pri uzorkovanju, dok je neobjašnjena, međuindividualna varijabilnost nasledna kvantitativna osobina na koju utiču individualno-specifični genetički i sredinski faktori (Morales et al., 2012). Zbog kontinuirane nagnutosti mitotičke nestabilnosti mutiranih *DMPK* alela ka povećanju broja ponovaka tokom života bolesnika, smatra se da se simptomi DM1 klinički ispoljavaju kada dovoljan broj ćelija stekne dovoljno duge ekspanzije, koje uzrokuju disfunkciju na nivou tkiva (Morales et al., 2012). Dodatno, dalje povećanje veličine ekspanzije tokom života bolesnika dovodi se u vezu sa progresijom bolesti (Martorell et al., 1998; Monckton et al., 1995; Wong et al., 1995).

### **1.3. Korelacija genotipa i fenotipa kod miotonične distrofije tip 1**

U studijama korelacije genotipa i fenotipa kod DM1 bolesnika uočena je povezanost veličine *DMPK* ekspanzije iz ćelija krvi sa uzrastom početka bolesti (Hamshere, Harley, Harper, Brook, & Brookfield, 1999; Harley et al., 1993; Salehi et al., 2007; Savic et al., 2002). Korelacije sa specifičnim simptomima, kao što su mišićna zahvaćenost, srčani poremećaji, kognitivno oštećenje, miotonija, su dosta slabije ili se ne uočavaju (Marchini et al., 2000; Merlevede et al., 2002; Modoni et al., 2004; Savic et al., 2002). Iako su mišići primarno zahvaćeni bolešću, veličina ekspanzije u krvi generalno pokazuje bolju korelaciju sa težinom kliničke slike nego ona u mišićima (Zatz et al., 1995). Uprkos odsustvu dobrih genotip-fenotip korelacija, studija na grupi od 2650 bolesnika ukazala je na postojanje povezanosti između veličine ekspanzije i sveopšte kliničke slike (Salehi et al., 2007).

Jedno od mogućih objašnjenja za nepotpunu genotip-fenotip korelaciju je da, osim postojanja donjeg praga uzročne mutacije od 50 ponovaka, postoji i gornji prag (150-250 ponovaka), iznad kojeg dalje povećanje veličine ekspanzije ne doprinosi uzrastu početka bolesti (Hamshire et al., 1999; Savic et al., 2002). Za procenjivanje veličine alela u prethodno navedenim studijama korišćen je Southern blot sa digeriranom genomskom DNK (Hamshire et al., 1999), ili PCR-bazirani blot (Savic et al., 2002), na osnovu kojih je procenjivana prosečna (modalna) veličina ekspanzije. Međutim, ispitivanje genotip-fenotip korelacija na ovaj način je otežano, usled postojanja somatskog mozaicizma *DMPK* ekspanzije koji je zavisen od uzrasta bolesnika i sklon daljim ekspanzijama (Martorell et al., 1998). U cilju prevazilaženja ovog problema, primenjena je procena veličine progenitornog alela metodom SP-PCR. Kao najbolja procena veličine progenitornog alela, kao što je već navedeno, pokazala se oštra donja granica razmaza na blotu koja je očuvana među tkivima i specifična za pojedinačnog bolesnika (Monckton et al., 1995). Ipak, i ovakve procene bi trebalo uzimati sa određenom rezervom, jer postoji mogućnost da su kod nekih starijih bolesnika sa većim ekspanzijama svi *DMPK* aleli u ćelijama mutirali preko dužine progenitornog alela (Martorell et al., 1998). Korišćenjem metode SP-PCR iz malog broja ćelija, Morales i saradnici (2012) su na grupi od 136 DM1 bolesnika pokazali da je procenjena dužina progenitornog alela glavni modifikator uzrasta početka bolesti i da objašnjava ~64% varijabilnosti. Takođe, nije primećeno postojanje praga iznad kojeg veličina ekspanzije nije doprinela uzrastu početka bolesti. Ista studija je pokazala da međuindividualna varijabilnost u somatskoj nestabilnosti dodatno modifikuje uzrast početka bolesti, tj. bolesnici kod kojih veće ekspanzije brže nastaju imaju raniji početak simptoma (Morales et al., 2012). Iz tog razloga, identifikacija faktora koji doprinose individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti mogla bi doprineti u boljem razumevanju faktora koji utiču na varijabilnost u uzrastu početka bolesti.



### 1.3.1. Varijantni ponovci u *DMPK* ekspanzijama

Procenjena veličina progenitornog alela je glavni faktor koji utiče na uzrast početka bolesti. Ona objašnjava samo deo ukupne fenotipske varijabilnosti, što ukazuje na postojanje dodatnih faktora, genetičkih, epigenetičkih i/ili sredinskih, koji modifikuju efekat uzročne mutacije (Lamar & McNally, 2014). Dosadašnje studije su ukazale na nekoliko mogućih genetičkih modifikatora DM1 fenotipa, uključujući prethodno navedeni nivo somatske nestabilnosti ekspanzovanih CTG ponovaka (Morales et al., 2012), varijante u genima čiji su proizvodi uključeni u sistem za reparaciju pogrešnih baznih parova (Morales et al., 2016), kao i varijante u promotorskom regionu gena *MBNL1* (Huin et al., 2013).

Dugo se smatralo da je  $(CTG)_n$  niz u genu *DMPK* perfektan, kako kod *wild type* tako i u ekspanzovanim alelima. Jedini izuzetak bio je alel od 37 ponovaka koji je posedovao CCG prekide u okviru niza heksamera CCGCTG, opisan još 1995. godine (Leefflang & Arnheim, 1995). Međutim, pre manje od 10 godina identifikovane su *DMPK* ekspanzije koje sadrže prekide u  $(CTG)_n$  nizu, poznate i pod nazivom varijantni ponovci (Braidia et al., 2010; Musova et al., 2009). Od tog otkrića pa do danas opisani su CCG, GGC, CTC i CAG prekidi na 3' i 5' krajevima *DMPK* ekspanzija, pri čemu su najčešće detektovani različiti obrasci CCG ponovaka (Botta et al., 2017; Braidia et al., 2010; Musova et al., 2009; Santoro et al., 2013). Učestalost prekida u *DMPK* ekspanzijama procenjuje se na 3-5% kod DM1 bolesnika iz nekoliko ispitivanih populacija (Botta et al., 2017; Braidia et al., 2010; Musova et al., 2009; Santoro et al., 2013). Iako je najveći broj kliničkih simptoma kod opisanih bolesnika bio očekivan za DM1 fenotip, neki od njih odlikovali su se blažim ili atipičnim simptomima (Musova et al., 2009), čak i atipičnim neurološkim fenotipom (Braidia et al., 2010), dok kongenitalne forme nisu opisane. Kod određenih bolesnika sa prekidima opisan je kasniji uzrast početka bolesti, nego što bi se očekivalo na osnovu odgovarajuće veličine *DMPK* ekspanzije (Botta et al., 2017; Musova et al., 2009). Ovi nalazi su ukazali na to da bi varijantni ponovci mogli biti genetički modifikatori DM1 fenotipa, slično kao kod spinocerebelarne ataksije tip 10 (Matsuura et al., 2006).

Mehanizmi kojima bi varijantni ponovci mogli modifikovati DM1 fenotip nisu razjašnjeni. Do sada je pokazano da varijantni ponovci ne utiču na promenu broja i veličine toksičnih nukleusnih RNK fokusa u ćelijama skeletnih mišića bolesnika (Santoro et al., 2013). Kod drugih bolesti nestabilnih ponovaka, varijantni ponovci su poznati *in cis* modifikatori sa stabilišućim efektom na *wild-type* alele (Cleary & Pearson, 2003) i ekspanzije povezane sa SCA8 (Moseley et al., 2000), SCA10 (Matsuura et al., 2006) i SCA17 (Gao et al., 2008). Iz tog razloga, jedan od mehanizama kojim prekidi mogu uticati na efekat uzročne mutacije kod DM1 je genetička stabilizacija (CTG)<sub>n</sub> niza. Na osnovu studija koje su ispitivale svega par bolesnika, pretpostavljeno je da bi prekidi mogli uticati na mutacionu dinamiku *DMPK* ekspanzija i posledično na fenotipsku ekspresiju DM1 (Braida et al., 2010; Musova et al., 2009). Međutim, ne postoje nedvosmisleni dokazi o uticaju varijantnih ponovaka na stepen mitotičke nestabilnosti *DMPK* ekspanzija, dok njihov uticaj na mutacionu dinamiku tokom vremena nije ispitivan. Takođe, ne postoji ni dovoljan broj ispitanih međugeneracijskih prenošenja ovih alela, na osnovu kojih bi se mogao izvesti verodostojan zaključak o njihovom uticaju na mejotičku nestabilnost. Pored toga, opisana je metilacija CpG ostrvaca nizvodno od *DMPK* ekspanzija sa CCG varijantnim ponovcima i pokazano je da ona nema efekta na ekspresiju *DMPK* i okolnih gena (Santoro et al., 2015). Nastanak ove metilacije, kao i status metilacije samih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama nije ispitivan, iako je poznato da su GC bogati ponovci u nekim ekspanzijama metilovani, kao i da se ta metilacija može lokalno širiti na okolne sekvence. Takve su, na primer, ekspanzije CGG ponovaka u genu *FMRI* povezane sa fragilnim X sindromom (FRAXA) (Oberle et al., 1991) ili ekspanzije G4C2 ponovaka u genu *C9ORF72* povezane sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom (ALS) i frontotemporalnom degeneracijom (FTD) (Xi et al., 2015).

## 2. Ciljevi

Predmet ove doktorske disertacije je genetičko i epigenetičko ispitivanje varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama i njihov efekat kao genetičkih modifikatora fenotipa miotonične distrofije tip 1. U skladu sa tim, definisani su sledeći ciljevi:

- 1) Pretražiti reprezentativnu i klinički dobro okarakterisanu grupu bolesnika sa miotoničnom distrofijom tip 1, popisanih u Srpskom registru za miotonične distrofije, na prisustvo varijantnih ponovaka na 5' i 3' kraju *DMPK* ekspanzija;
- 2) Odrediti genetičku strukturu *DMPK* ekspanzija kod bolesnika sa identifikovanim varijantnim ponovcima;
- 3) Kroz praćenje međugeneracijskih prenošenja *DMPK* alela u porodicama sa miotoničnom distrofijom tip 1, ispitati uticaj varijantnih ponovaka na mejotičku nestabilnost *DMPK* ekspanzija;
- 4) Kroz kvantifikaciju somatskog mozaicizma varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi uzorkovanim u dvema vremenskim tačkama i ćelijama bukalne sluznice, okarakterisati tkivnu specifičnost i mutacionu dinamiku mitotičke nestabilnosti varijantnih *DMPK* alela;
- 5) Ispitati da li su varijantni CCG ponovci u *DMPK* ekspanzijama metilovani, kao i da li su metilovana CpG ostrvca uzvodno i nizvodno u odnosu na varijantne *DMPK* ekspanzije;
- 6) Ispitati povezanost varijantnih ponovaka i kliničkih parametara bolesti, prikupljenih nakon ponovnog kliničkog ispitivanja svih identifikovanih bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama;
- 7) Ispitati da li postoji veza između efekta varijantnih ponovaka na mitotičku nestabilnost *DMPK* ekspanzija i uzrasta pojave prvih simptoma.

## 3. Materijal i metode

### 3.1. Ispitanici

Studija je obuhvatila grupu od 243 bolesnika sa klinički i molekularno-genetički potvrđenom dijagnozom DM1 iz 174 porodice iz Srbije. Analizirani bolesnici su upisani u Srpski registar za miotonične distrofije. Uzorci krvi pacijenata prikupljeni su u saradnji sa Klinikom za neurologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 1997. do 2017. godine. Od svakog bolesnika uzeto je do 5 ml pune periferne krvi u vakutanerima sa natrijum citratom ili EDTA kao antikoagulansom. Uzorci su čuvani na temperaturi od 4°C do izolovanja DNK, a potom na temperaturi od -20°C. Dijagnoza DM1 je postavljena na osnovu tipične kliničke slike, elektromiografskih nalaza i genetičke analize. Genetička potvrda kliničke dijagnoze DM1 vršena je ili *long-range* PCR-baziranim Southern blotom (Savic et al., 2002) ili metodom *repeat-primed* PCR-a (Radvansky, Ficek, Minarik, Palffy, & Kadasi, 2011). Dijagnoza DM2 je isključena kod svih bolesnika metodom *repeat-primed* PCR-a (Radvansky, Ficek, & Kadasi, 2011).

Svi bolesnici kod kojih je utvrđeno prisustvo varijantnih ponovaka prošli su dodatno kliničko ispitivanje na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije, koje je obuhvatalo neurološki i oftalmološki pregled, laboratorijske analize, kardiološki pregled sa elektro- i ehokardiografijom, spirometriju i procenu opšteg kognitivnog statusa. Snaga najslabijih mišića ruku i nogu ocenjivana je od 0 do 5 korišćenjem skale MRC (eng. *Medical Research Council*). Opšti kognitivni status je ispitivan upotrebom baterije testova ACE-R (eng. *Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised*), pri čemu je ukupan rezultat niži od 82 smatran patološkim (Mioshi, Dawson, Mitchell, Arnold, & Hodges, 2006). Kod sedam bolesnika (DF1-1, DF1-2, DF1-3, DF2-1, DF3-1, DF5-2 i DF5-3) nakon određenog vremena ponovo je uzorkovana krv, dok su od pet bolesnika (DF1-1, DF1-2, DF1-3, DF5-2 i DF5-3) uzeti i uzorci brisa bukalne sluznice. Kod svih bolesnika koji su uzorkovani u drugoj vremenskoj tački, izvršena je nova klinička evaluacija u cilju praćenja toka bolesti i ispitivanja njene povezanosti sa vremenskom dinamikom mitotičke nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi.

Nakon detaljnog uvida u ciljeve istraživanja, svi ispitanici dali su svoju saglasnost za dobrovoljno učešće u ovoj studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije u Beogradu (Odluka broj 339/5) (Prilog 8.1) i izvršena je u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije iz 1964. godine.

U cilju ispitivanja dinamike mitotičke nestabilnosti, četiri bolesnika sa perfektnim CTG ponovcima u *DMPK* ekspanzijama predstavljala su kontrolnu grupu. Jedna od njih bila je sestra (DF5-3) bolesnice kod koje je identifikovana varijantna *DMPK* ekspanzija (DF5-2). Ostala tri bolesnika nisu bili u međusobnom srodstvu, kao ni u srodstvu sa ostalim bolesnicima sa varijantnim ponovcima. Njihovi uzorci DNK izolovane iz krvi bili su dostupni iz dveju različitih vremenskih tačaka u intervalu od osam do jedanaest godina. U cilju validacije metoda korišćenih za ispitivanje metilacije varijantnih *DMPK* ekspanzija, korišćeni su uzorci DNK bolesnika sa kongenitalnom formom DM1, FRAXA i Hantingtonovom bolešću (HD), čije su kliničke dijagnoze potvrđene korišćenjem standardnih dijagnostičkih testova. Svi navedeni uzorci pripadaju odgovarajućim bankama DNK Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, od kojih DNK banka za DM1 prati Srpski registar za miotonične distrofije.

Za potrebe ove studije korišćeni su klinički i genetički podaci DM1 bolesnika sa čistim ekspanzijama, dostupni iz Srpskog registara za miotonične distrofije i baze podataka Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta u Univerziteta Beogradu. Podaci za stepen aktivne i prekusione miotonije praćeni genetičkim podacima bili su dostupni za 85 bolesnika, podaci za uzrast početka bolesti praćeni genetičkim podacima za 143 bolesnika, dok su genetički podaci, korišćeni za ispitivanje međugeneracijske promene broja ponovaka, bili dostupni za 112 bolesnika iz 44 porodice. Veličina *DMPK* ekspanzije u ovim bazama dobijene su primenom *long-range* PCR-baziranog Southern blota (Poglavlje 3.5).

### **3.2. Izolovanje, provera kvaliteta i kvantifikacija genomske DNK**

Izolovanje genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi vršeno je korišćenjem komercijalnog seta QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

#### **3.2.1. Protokol za izolovanje DNK iz krvi korišćenjem seta QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka)**

- 1) U mikrotubu zapremine 1,5 ml pipetirano je po 20 µl proteinaze QIAGEN, 200 µl periferne krvi i 200 µl pufera AL;
- 2) Smeša je vorteksovana 15 sekundi (s), a potom inkubirana 10 minuta (min) u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C;
- 3) Smeša je kratko centrifugirana (eng. *spin-down*) do 8000 obrtaja u minuti (eng. *rotation per minute*, rpm) (Labofuge 400R, rotor 3324, *Heraeus instruments*, Nemačka) da bi se uklonile kapi sa unutrašnjosti poklopca mikrotube;
- 4) Dodato je 200 µl 96-100% etanola (*ZORKA Pharma*, Srbija) i smeša je vorteksovana 15 s, a zatim kratko centrifugirana (do 8000 rpm);
- 5) Sadržaj mikrotube nanet je na kolonu sa silika-membranom, smeštenu u kolektorskoj tubi;
- 6) Vršeno je centrifugiranje na 8000 rpm/1 min;
- 7) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 8) Dodato je 500 µl pufera AW1 i smeša je centrifugirana na 8000 rpm/1 min;
- 9) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 10) Dodato je 500 µl pufera AW2 i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/3 min;
- 11) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu mikrotubu zapremine 1,5 ml;

12) Dodato je 200  $\mu$ l dejonizovane vode (eng. *Nuclease-Free Water*, *Qiagen*, Nemačka) i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 1-5 min, a zatim centrifugirana na 13000 rpm/1 min;

13) Eluirani uzorak DNK čuvan je na temperaturi od 4°C ili -20°C.

Provera kvaliteta izolovane genomske DNK vršena je agaroznom gel elektroforezom. Korišćen je 0,8% (w/v) agarozni gel napravljen u 0,5x TBE puferu (0,045 M Tris-borat, 0,001 M EDTA, pH 8,0) i bojen etidijum-bromidom (EtBr) finalne koncentracije 0,5  $\mu$ g/ml. Elektroforeza je izvođena u 0,5x TBE puferu (pH 8,0), a kao pufer za nalivanje uzoraka korišćen je 0,25% (w/v) bromfenol-plavo, 0,25% (w/v) ksilencijanoli i 30% (w/v) glicerol (Sambrook, 1989).

### **3.2.2. Protokol za pripremu agaroznog gela i gel elektroforezu**

- 1) 0,8% (w/v) rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) u puferu 0,5x TBE (pH 8,0) zagrevan je do ključanja i dok rastvor nije postao potpuno bistar;
- 2) Nakon dodavanja EtBr (0,5  $\mu$ g/ml), rastvor je ohlađen do temperature od ~50°C;
- 3) Ohlađeni rastvor izliven je u kadicu za elektroforezu i gel je ostavljen da polimerizuje na sobnoj temperaturi;
- 4) 5  $\mu$ l uzorka DNK i 1  $\mu$ l standarda DNK (humana genomska DNK iz ćelijske linije K562, koncentracije 10 ng/ $\mu$ l; *Promega*, USA) pomešani su sa puferom za nalivanje uzoraka u odnosu 5:1, a zatim su naliveni na gel;
- 5) Elektroforeza je vršena u 0,5x TBE puferu (pH 8,0), na konstantnom naponu od 100 V, u trajanju od 15 min u sistemu za elektroforezu (Wide Mini-Sub® Cell GT, *BioRad*, SAD);
- 6) Po završetku elektroforeze, gel je izložen UV svetlu ( $\lambda=254$  nm) na transiluminatoru (Transilluminator, *Vilber Lourmat*, Francuska) i fotografisan.

Kvantifikacija izolovane genomske DNK izvršena je na fluorometru (QubitR 2.0 Fluorometer, *Invitrogen*, SAD) korišćenjem komercijalnog seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (*Invitrogen*, SAD), koji omogućava detektovanje koncentracije DNK u opsegu od 100 pg/ $\mu$ l do 1000 ng/ $\mu$ l.

### **3.2.3. Protokol za kvantifikaciju genomske DNK korišćenjem seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, SAD)**

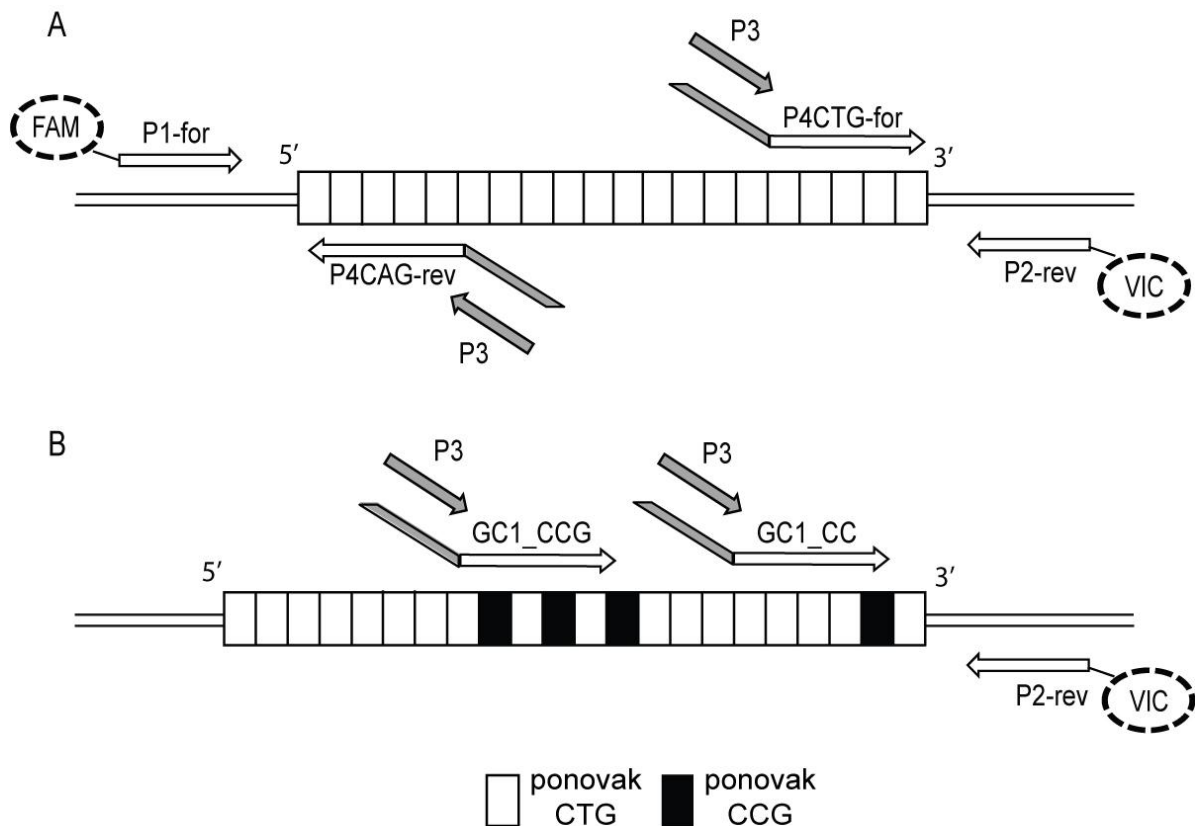
- 1) Pripremljen je Qubit™ radni rastvor mešanjem Qubit™ dsDNA BR reagensa sa Qubit™ dsDNA BR puferom u odnosu 1:200;
- 2) Dodato je po 190  $\mu\text{l}$  radnog rastvora u svaku mikrotubu za standarde;
- 3) Zatim je dodato po 10  $\mu\text{l}$  svakog Qubit™ standarda u odgovarajuću mikrotubu i smeša je kratko vorteksovana. Koncentracije Qubit™ standarda 1 i 2 bile su 0 i 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , redom;
- 4) U mikrotube za uzorke dodato je od 180 do 199  $\mu\text{l}$  radnog rastvora;
- 5) Potom je ispipetirano od 1 do 20  $\mu\text{l}$  uzorka DNK u odgovarajuće mikrotube, vodivši računa da finalna zapremina u svakoj tubi bude 200  $\mu\text{l}$ ;
- 6) Smeša je kratko vorteksovana, a zatim inkubirana na sobnoj temperaturi 2 min;
- 7) Koncentracije su izmerene i očitane na aparatu u  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .



### **3.3. Ispitivanje prisustva varijantnih ponovaka na 5' i 3' krajevima DMPK ekspanzija korišćenjem *repeat-primed* PCR-a**

Metoda RP-PCR (eng. *repeat-primed PCR*) koristi fluorescentno obeležen lokus-specifičan prajmer, komplementaran sekvenci koja sa jedne strane okružuje ponovke, i klizni prajmer, komplementaran nizu od nekoliko ponovaka tako da hibridizuje na većem broju mesta u okviru ponovljenog niza (Warner et al., 1996) (Slika 3.1). Klizni prajmer na svom 5' kraju ima dodatnu sekvencu od 24 nukleotida (nt) koja je identična sekvenci trećeg prajmera u reakciji, koji je označen kao repić (eng. *tail*) ili sidro (eng. *anchor*), i povećava efikasnost umnožavanja. Zbog sposobnosti kliznog prajmera da hibridizuje na većem broju mesta u okviru ponovljenog niza, umnoženi proizvodi nakon fragment analize daju karakterističan profil koji se opisuje kao lestičast, jer je sastavljen iz signala opadajućeg intenziteta koji se razlikuju u dužini za 3 bazna para (bp). Opadanje intenziteta signala je posledica smanjenja efikasnosti umnožavanja sa povećanjem dužine proizvoda. Profili sa signalima koji nisu lestvičasti, na primer sa značajnim prazninama i/ili neuobičajenim padom u inenzitetu signala, ukazuju na prisustvo varijantnih ponovaka u ekspanziji.

Pretraga na prisustvo varijantnih ponovaka obavljena je kako sa 5' kraja, korišćenjem uzvodnog RP-PCR-a (eng. *forward RP-PCR*), tako i sa 3' kraja, korišćenjem nizvodnog RP-PCR-a (eng. *reverse RP-PCR*) za DMPK ekspanziju. U tu svrhu iskorišćeni su prethodno objavljeni prajmeri (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011), pri čemu su u uzvodnom RP-PCR-u korišćeni prajmeri FAM-P1-for, P4CAG-rev i P3, dok su u nizvodnom RP-PCR-u korišćeni prajmeri VIC-P2-rev, P4CTG-for i P3 (Slika 3.1, Tabela 3.1).



**Slika 3.1.** Šematski prikaz *repeat-primed* PCR-a (RP-PCR) za detekciju perfektnih CTG i varijantnih CCG ponovaka u 3' netranslatirajućem regionu gena *DMPK*. (A) Prajmeri P1-for, P4CAG-rev i P3 korišćeni su u uzvodnom (eng. *forward*) RP-PCR-u, dok su prajmeri P2-rev, P4CTG-for i P3 korišćeni u nizvodnom (eng. *reverse*) RP-PCR-u. Prajmeri P1-for i P2-rev komplementarni su jedinstvenim sekvencama uzvodno i nizvodno od regiona sa ponovcima. Klizni praumeri P4CAG-rev i P4CTG-for sadrže na svom 5' kraju sekvencu identičnu praumeru P3, za kojom sledi nekoliko ponovaka CAG ili CTG, omogućavajući višestruka mesta hibridizacije u okviru monotonog niza ponovaka. Zahvaljujući kliznim praumerima, u prvim ciklusima RP-PCR-a sekvenca P3 postaje sastavni deo proizvoda reakcije, usled čega je omogućeno vezivanje praamera P3, koji služi kao repić i povećava efikasnost umnožavanje dugih ekspanzovanih alela. (B) U nizvodnom RP-PCR-u za detekciju varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija, praumer P4CTG-for zamenjen je alternativnim kliznim praumerima (GC1\_CC i/ili GC1\_CCG) koji hibridizuju sa CTG nizom prekinutim CCG ponovcima. FAM, VIC – fluorescentne boje.

RP-PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakciona smeša za uzvodni RP-PCR sadržala je: 1x KAPA *Taq* Buffer A sa 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM nukleotide (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,2 µM prajmere FAM-P1-for, 0,05 µM prajmere P4CAG-rev i 0,3 µM prajmer P3 (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1 M Betain (*Serva*, Nemačka), 0,25 U KAPA *Taq* DNK polimeraze (*Kapa Biosystems*, SAD), 10-20 ng genomske DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Reakciona smeša za nizvodni RP-PCR bila je istog sastava, s tim da je umesto prajmera FAM-P1-for korišćen prajmer VIC-P2-rev, dok je umesto prajmera P4CAG-rev korišćen prajmer P4CTG-for. Oba RP-PCR-a vršena su u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 97°C/3 min, 30 ciklusa denaturacije 95°C/1 min, hibridizacije prajmera 60°C/1 min, i elongacije 72°C/1 min, i finalna elongacija 72°C/60 min. RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom koja podrazumeva razdvajanje fluorescentno obeleženih proizvoda RP-PCR-a kapilarnom elektroforezom korišćenjem genetičkog analizatora (ABI-3130 Genetic Analyzer, *Applied Biosystems*, SAD) i analizu rezultata korišćenjem odgovarajućeg softvera.

### 3.3.1. Protokol za fragment analizu

- 1) Na optičku ploču sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD) naliveno je po 1 µl proizvoda RP-PCR reakcije;
- 2) U svaki bunarić sa uzorkom dodato je 0,3 µl standarda za dužinu DNK (Gene Scan 500 Lize Size Standard, *Applied Biosystems*, SAD) i 8,7 µl Hi-Di formamida (*Applied Biosystems*, SAD);
- 3) Uzorci su denaturisani inkubiranjem optičke ploče na 95°C/5 min, a potom ohlađeni stavljanjem ploče na led u trajanju od 5 min;
- 4) Kapilarna elektroforeza vršena je pod sledećim uslovima:
  - modul za elektroforezu: FragmentAnalysis
  - napon pri injektiranju uzorka: 1,6 kV
  - vreme injektiranja uzorka: 15 s
  - napon tokom elektroforeze: 15 kV

- trajanje elektroforeze: 1800 s
- temperatura rerne: 60°C
- dužina kapilare: 36 cm
- tip polimera: POP4 (Performance Optimized Polymer™-4, Applied Biosystems, SAD).

**Tabela 3.1.** Prajmeri korišćeni u reakcijama *repeat-primed* PCR-a (RP-PCR) i *long-range* PCR-a (LR-PCR).

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera i opis njegove ciljne sekvence	Referenca
101	5'-CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC-3' Jedinstvena sekvenca nizvodno od CTG ponovaka u genu <i>DMPK</i>	Brook et al. (1992)
102	5'-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGC-3' Jedinstvena sekvenca uzvodno od CTG ponovaka u genu <i>DMPK</i>	
FAM-P1-for	5'- GGGGCTCGAAGGGTCCTTGT-3' Jedinstvena sekvenca uzvodno od CTG ponovaka u genu <i>DMPK</i>	Radvansky, Ficek, Minarik, et al. (2011)
VIC-P2-rev	5'- GTGCGTGGAGGATGGAAC-3' Jedinstvena sekvenca nizvodno od CTG ponovaka u genu <i>DMPK</i>	
P4CTG-for	5'- <u>AGCGGATAACAATTTACACAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG</u> -3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa perfektnim CTG ponovcima	
P4CAG-rev	5'- <u>AGCGGATAACAATTTACACAGGACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG</u> -3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa perfektnim CTG ponovcima	
P3	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3' Repić koji hibridizuje sa podvučenom sekvencom u prajmerima P4CTG-for i P4CAG-rev	
GC1_CC	5'- <u>AGCGGATAACAATTTACACAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCC</u> -3' Klizni prajmer specifičan za detekciju pojedinačnih CCG ponovaka	
GC1_CCG	5'- <u>AGCGGATAACAATTTACACAGGATGCCGCTGCCGCTGCCGCTGCC</u> -3' Klizni prajmer specifičan za detekciju CCGCTG heksamera	
P5CCG	5'- <u>AGCGTCTACTGTCTCGGCACTTGCCC GCCGCCGCCG</u> -3' Klizni prajmer za detekciju perfektnog niza od barem 4 CCG ponovka	
P5	5'-AGCGTCTACTGTCTCGGCACTTGC-3' Repić koji hibridizuje sa podvučenom sekvencom u prajmeru P5CCG	

### **3.4. Određivanje tipa i obrazaca varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama primenom *repeat-primed* PCR-a i sekvenciranja**

Uzorci sa uočenim nepravilnostima u očekivanom lestivčastom profilu nizvodnog RP-PCR-a dalje su analizirani korišćenjem RP-PCR-ova u kojima je klizni prajmer P4CTG-for zamenjen kliznim prajmerima koji omogućavaju detekciju varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju ekspanzija *DMPK* ekspanzija: GC1\_CC i GC1\_CCG (Slika 3.1, Tabela 3.1).

RP-PCR-ovi za detekciju CCG ponovaka rađeni su u ukupnoj zapremini od 30  $\mu$ l. Reakciona smeša sa prajmerom GC1\_CC sadržala je: 1x Expand Long Template Buffer 1 sa 1,75 mM MgCl<sub>2</sub> (*Roche Life Science*, Nemačka), 0,36 mM nukleotide (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,3  $\mu$ M prajmer VIC-P2-rev, 0,05  $\mu$ M prajmer GC1\_CC i 0,5  $\mu$ M prajmer P3 (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2% (v/v) DMSO (*Serva*, Nemačka), 0,1% (v/v) Tween 20 (*Serva*, Nemačka), 0,9 U KAPA Taq DNK polimeraze (*Kapa Biosystems*, SAD), 10-20 ng genomske DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Reakciona smeša sa prajmerom GC1\_CCG sadržala je: 1x KAPA Taq Buffer A sa 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM nukleotide (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,3  $\mu$ M prajmer VIC-P2-rev, 0,05  $\mu$ M prajmer GC1\_CCG i 0,5  $\mu$ M prajmer P3 (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1,7 M Betain (*Serva*, Nemačka), 0,9 U KAPA Taq DNK polimeraze (*Kapa Biosystems*, SAD), 10-20 ng genomske DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Oba RP-PCR-a vršena su u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 97°C/3 min, 30 ciklusa denaturacije 95°C/1 min, hibridizacije prajmera 60°C/1 min i elongacije 72°C/1 min, i finalna elongacija 72°C/60 min. RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

U cilju identifikacije obrazaca CCG prekida na 3' krajevima *DMPK* ekspanzija, umnoženi RP-PCR proizvodi za detekciju CCG ponovaka razdvojeni su na 3% agaroznom gelu. Pojedinačne trake su prečišćavane sa agaroznog gela korišćenjem komercijalnog seta Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research, SAD*), a potom opet umnožene pomoću prajmera P2-rev i P3. PCR za ponovno umnožavanje je vršen pod prethodno navedenim uslovima i na istom temperaturnom profilu. PCR proizvodi prečišćeni su korišćenjem komercijalnog seta QIAquick® PCR Purification Kit (*Qiagen, Nemačka*) i direktno sekvencirani uz pomoć neobebeženog prajmera P2-rev i komercijalnog seta BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

Reakcija Sangerovog sekvenciranja vršena je u ukupnoj zapremini od 7,5 µl, a sastav reakcione smeše i krajnje zapremine/koncentracije komponenata bili su sledeći: 1 µl BigDye™ Terminator v1.1 Ready Reaction Mix, 1 µl BigDye™ Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer, 1 µM prajmer P2-rev, 1,27 M betain (*Serva, Nemačka*) i prečišćeni PCR proizvod do pune zapremine. Reakcija je vršena u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems, SAD*) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 96°C/1 min i 25 ciklusa denaturacije 96°C/10 s, hibridizacije prajmera 50°C/5 s i elongacije 60°C/4 min. Proizvodi reakcije sekvenciranja prečišćeni su korišćenjem etanol/EDTA precipitacije, a potom su razdvojeni kapilarnom elektroforezom korišćenjem genetičkog analizatora (ABI-3130 Genetic Analyzer, *Applied Biosystems, SAD*). Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci tokom kapilarne elektroforeze obrađivani su korišćenjem softvera Sequencing Analysis v6.0 (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) i BioEdit Sequence Alignment Editor (*Ibis Biosciences, SAD*).

### **3.4.1. Protokol za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćenjem seta Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, SAD)**

- 1) Uz pomoć skalpela isečen je deo agaroznog gela sa umnoženim proizvodima nizvodnog RP-PCR-a i prebačen je u mikrotubu zapremine 1,5 ml;
- 2) Dodata su 3 volumena pufera ADB na jedan volumen isečenog agaroznog gela (npr. za 100 mg isečenog gela dodato je 300 µl pufera ADB);
- 3) Smeša je inkubirana 5-10 min na 55°C, odnosno dok se isečak gela nije potpuno rastvorio;
- 4) Sadržaj mikrotube nanet je na kolonu sa silika-membranom, smeštenu u kolektorskoj tubi;
- 5) Vršeno je centrifugiranje na 13000 rpm/1 min;
- 6) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 7) Dodato je 200 µl pufera DNA Wash i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- 8) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 9) Dodato je 200 µl pufera DNA Wash i smeša je centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- 10) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu mikrotubu zapremine 1,5 ml;
- 11) Dodato je 8 µl dejonizovane vode (*Qiagen*, Nemačka) i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 1-5 min, a zatim centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- 12) Eluirani uzorak čuvan je na temperaturi od 4°C ili -20°C.

### **3.4.2. Protokol za prečišćavanje DNK sa agaroznog gela korišćenjem seta QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka)**

- 1) U mikrotubu zapremine 0,2 ml koja je sadržala 20 µl RP-PCR proizvoda pipetirano je 100 µl pufera PB i 10 µl 3M Na-acetata (pH 5,2);
- 2) Smeša je kratko vorteksovana, a potom naneta na kolonu sa silika-membranom, smeštenu u kolektorskoj tubi;
- 3) Vršeno je centrifugiranje na 10000 rpm/1 min;
- 4) Filtrat je odbačen, a kolona je smeštena u istu kolektorsku tubu;
- 5) Dodato je 650 µl pufera PE i smeša je centrifugirana na 10000 rpm/1 min;
- 6) Filtrat je odbačen, a kolona je smeštena u istu kolektorsku tubu;
- 7) Vršeno je centrifugiranje na 10000 rpm/1 min;
- 8) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu mikrotubu zapremine 1,5 ml;
- 9) Dodato je 30 µl dejonizovane vode (*Qiagen*, Nemačka) i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 1-5 min, a zatim centrifugirana na 13000 rpm/1 min;
- 10) Eluirani uzorak čuvan je na temperaturi od 4°C ili -20°C.



### 3.4.3. Protokol za prečišćavanje reakcije sekvenciranja korišćenjem precipitacije sa etanolom i EDTA

- 1) U mikrotubu zapremine 0,2 ml koja je sadržala 7,5  $\mu$ l proizvoda reakcije sekvenciranja pipetirano je 5  $\mu$ l 125 mM EDTA, pH 8,0 (*Serva*, Nemačka);
- 2) Dodato je 60  $\mu$ l 96-100% etanola (*ZORKA Pharma*, Srbija);
- 3) Sadržaj mikrotube je izmešan okretanjem gore-dole nekoliko puta, a potom inkubiran na sobnoj temperaturi 15 min;
- 4) Mikrotube su smeštene u kolektorske tube zapremine 2 ml i centrifugirane na 6000 rpm/30 min i temperaturi od 4°C;
- 5) Supernatant je odliven otvaranjem i smeštanjem mikrotuba naopako okrenutih u kolektorske tube od 2 ml, a potom centrifugiranjem na 1200 rpm/1 min;
- 6) Dodato je 60  $\mu$ l 70% etanola u mikrotube (*ZORKA Pharma*, Srbija);
- 7) Mikrotube su smeštene u kolektorske tube zapremine 2 ml i centrifugirane na 5000 rpm/15 min i temperaturi od 4°C;
- 8) Supernatant je odliven kao u koraku 5;
- 9) Talog je osušen inkubiranjem na 90°C/2 min (u mašini za PCR sa otvorenim mikrotubama);
- 10) Dodato je 15  $\mu$ l Hi-Di formamida (*Applied Biosystems*, SAD);
- 11) Talog je rastvoren kratkim vorteksovanjem;
- 12) Pripremljeni uzorci čuvani su na -20°C do kapilarne elektroforeze.

### 3.5. Određivanje veličine varijantnih *DMPK* ekspanzija primenom *long-range* PCR-a i Southern blota

U cilju određivanja veličine *DMPK* ekspanzija korišćen je LR-PCR-bazirani Southern blot. LR-PCR (eng. *long-range PCR*) predstavlja modifikaciju PCR-a i zasnovan je na istovremenom korišćenju *Taq* polimeraze i neke termostabilne polimeraze koja ima 3' egzonukleaznu aktivnost (npr., *Pfu* ili *Pwo*), kao i na dovoljno dugom koraku elongacije u svakom ciklusu PCR-a (Cheng, Fockler, Barnes, & Higuchi, 1994). LR-PCR za detekciju *DMPK* ekspanzija prilagođen je za umnožavanje GC bogatih sekvenci kroz upotrebu restrikciono digerirane DNK i odgovarajućih PCR aditiva (DMSO, Tween 20, BSA). Ovaj pristup omogućava detekciju širokog opsega veličina *DMPK* ekspanzija, koje se nakon Southern blot hibridizacije zapažaju u vidu difuznih razmaza, usled velikog stepena somatske nestabilnosti uzročne mutacije.

Za umnožavanje perfektnih i varijantnih *DMPK* ekspanzija korišćen je protokol LR-PCR-baziranog Southern blota optimizovan u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta u Beogradu (Savic et al., 2002). Digestija genomske DNK sa *EcoRI* izvršena je u ukupnoj zapremini od 50 µl. Reakciona smeša sadržala je: 1x Buffer *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 10 U enzima *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) i 400-500 ng DNK. Umnožavanje segmenta gena *DMPK* sa CTG ponovcima vršeno je pomoću prajmera 101 i 102 (Brook et al., 1992) (Tabela 3.1). PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 12,5 µl. Pripremane su dve odvojene reakcione smeše. Reakciona smeša 1, ukupne zapremine od 6,5 µl, sadržala je: 0,36 mM nukleotide (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,24 µM prajmere 101 i 102, 200-300 pg DNK/*EcoRI* i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Reakciona smeša 2, ukupne zapremine od 6 µl, sadržala je: 1x Expand Long Template Buffer 1 sa 1,75 mM MgCl<sub>2</sub> (*Roche Life Science*, Nemačka), 0,1% (v/v) TWEEN 20 (*Serva*, Nemačka), 2% (v/v) DMSO (*Serva*, Nemačka), 0,25 U Exp DNA Pol Mix (komercijalna smeša *Taq* i *Pwo* polimeraze; *Roche Life Science*, Nemačka) i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). LR-PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 96°C/3 min, 10 ciklusa hibridizacije prajmera 65°C/30 s, elongacije 68°C/3 min i

denaturacije 95°C/30 s; sledećih 15 ciklusa hibridizacije prajmera 65°C/30 s, elongacije 68°C/3 min sa produženjem od po 10 s u svakom sledećem ciklusu i denaturacije 95°C/30 s; finalna hibridizacija prajmera 65°C/1 min i finalna elongacija 68°C/8 min. Nakon završetka PCR-a, uzorci su čuvani na 4°C do analize.

Navedeni protokol za LR-PCR nije dao proizvode kod nekih DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima. Iz tog razloga je za porodicu DF2 i osobu DF4-1 korišćen LR-PCR protokol optimizovan za umnožavanje CGG ekspanzija u genu *FMRI* (Saluto et al., 2005), uz upotrebu prajmera 101 i 102 (Brook et al., 1992) (Tabela 3.1). PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakciona smeša sadržala je: 1x Expand Long Template Buffer 2 sa 2,75 mM MgCl<sub>2</sub> (*Roche Life Science*, Nemačka), 0,5 mM nukleotide (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,3 µM prajmere 101 i 102, 2 M betain (*Serva*, Nemačka), 0,15 U Exp DNA Pol Mix (*Roche Life Science*, Nemačka), 200-300 pg DNK/*EcoRI* i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). LR-PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 98°C/10 min, 10 ciklusa denaturacije 97°C/35 s, hibridizacije prajmera 65°C/35 s i elongacije 68°C/4 min; sledećih 25 ciklusa denaturacije 97°C/35 s, hibridizacije prajmera 65°C/35 s i elongacije 68°C/4 min sa produženjem od po 20 s u svakom sledećem ciklusu; finalna elongacija 68°C/10 min. Nakon završetka PCR-a, uzorci su čuvani na 4°C do analize.

U cilju detektovanja specifičnih LR-PCR proizvoda primenjena je Southern blot hibridizacija. Korišćen je reverzni kapilarni transfer, hibridizacija sa oligonukleotidnom (CAG)<sub>12</sub> probom, obeleženom na 3' kraju digoksigenin-ddUTP-om (DIG-ddUTP). Vizuelizacija hibrida urađena je hemiluminiscentnom detekcijom, korišćenjem antitela na digoksigenin konjugovan sa alkalnom fosfatazom (anti-DIG-AP) i CDP-stara kao hemiluminiscentnog supstrata za alkalnu fosfatazu. Emitovana hemiluminiscencija ostavlja trag na rentgenskom filmu.

Procena veličine mutiranih *DMPK* alela vršena je poređenjem njihove veličine sa DNK standardom za veličinu (DNA Molecular Weight Marker X, *Roche Life Science*, Nemačka) obeleženim na 3' kraju sa DIG-ddUTP-om i korišćenjem Core Laboratory Image

Quantification Software - CLIQS (*TotalLab Ltd.*, UK). Imajući u vidu logaritamsko putovanje DNK fragmenata različite dužine kroz agarozni gel, za svaki blot konstruisana je logaritamska kriva (veličina DNK fragmenata u funkciji dužine pređenog puta), na osnovu koje softverski program sa zadovoljavajućom preciznošću očitava veličinu mutiranih alela. S obzirom na poziciju prajmera 101 i 102 u odnosu na CTG ponovke, broj ponovaka određivan je po sledećoj formuli: (veličina mutiranog alela u bp – 112 bp)/3. Vrednost jasne donje granice, ispod koje su pojedinačni aleli bili retki korišćena je za procenu dužine progenitornog alela (Monckton et al., 1995).

### **3.5.1. Protokol za pripremu agaroznog gela i gel elektroforezu za Southern blot**

- 1) 0,8% (w/v) rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) u puferu 0,5x TBE (pH 8,0) zagrevan je do ključanja i dok rastvor nije postao potpuno bistar;
- 2) Nakon dodavanja EtBr (0,5 µg/ml), rastvor je ohlađen do temperature od ~50°C;
- 3) Ohlađeni rastvor izliven je u kadicu za elektroforezu dužine 24 cm i gel je ostavljen da polimerizuje na sobnoj temperaturi;
- 4) 12,5, odnosno 10 µl uzorka LR-PCR-a pomešano je sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% (w/v) bromfenol-plavo, 0,25% (w/v) ksilencijanol i 30% (w/v) glicerol) (*Sambrook*, 1989) u odnosu 5:1, a zatim naliveno na gel;
- 5) 1-3 µl DNK standarda za veličinu obeleženog na 3' kraju sa DIG-ddUTP-om (DNA Molecular Weight Marker X, *Roche Life Science*, Nemačka) i 1 µl neobeležnog 1 kilobaznog DNK standarda za veličinu (1 kb Ladder, *Thermo Fisher Scientific*, SAD) pomešano je sa puferom za nalivanje uzoraka i naliveno na gel;
- 6) Elektroforeza je vršena u 0,5x TBE puferu (pH 8,0), na konstantnom naponu od 80 V, u trajanju 13-15 h u sistemu za elektroforezu (Sunrise 96 Horizontal Gel Electrophoresis system, *Gibco BRL LifeTechnologies*, SAD).

### 3.5.2. Protokol za denaturaciju, neutralizaciju i reverzni kapilarni transfer

- 1) Nakon završene elektroforeze, suvišni delovi agaroznog gela isečeni su lenjirom na transluminatoru (Transilluminator, *Vilber Lourmat*, Francuska), izmerene su mu dimenzije (12x18 cm) i, radi dalje orijentacije pri manipulaciji sa gelom, zasečen je koso njegov levi gornji ugao;
- 2) Gel je pažljivo ljuljan dva puta po 25 min u rastvoru za denaturaciju (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) na rokeru (*Kisker Biotech*, Nemačka);
- 3) Gel je ispran u dejonizovanoj vodi tri puta po 1 min;
- 4) Gel je pažljivo ljuljan dva puta po 25 min u rastvoru za neutralizaciju (1,0 M Tris-HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl) na rokeru;
- 5) Isečeno je šest MN 827 B papira (*MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Nemačka) i pozitivno naelektrisana najlonska membrana (Nylon-Bind B, *Serva*, Nemačka) tako da odgovaraju veličini agaroznog gela;
- 6) Postavljen je reverzni kapilarni transfer slaganjem redom odozdo na gore: 10-12 MN 440 B papira za transfer (*MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Nemačka), tri MN 827 B papira, pozitivno naelektrisane najlonske membrane, agaroznog gela licem okrenutog prema gore i tri MN 827 B papira. Istisnuti su svi eventualno prisutni mehurovi kotrljanjem staklenog štapića po površini poslednjeg MN827 B papira. Transfer je postavljen između dve posude u kojima se nalazio 10x SSC pufer za transfer (1,5M NaCl, 0,3 M Na-citrat, pH 7 na 20°C). Odozgo je postavljen jedan MN 827 B papir dimenzije 12x36 cm tako da su krajevi papira bili uronjeni u posude sa puferom za transfer, dok je centralni deo bio pokriven acetatnom folijom veličine gela;
- 7) Transfer se odigravao preko noći kako bi kapilarne sile prebacile LR-PCR proizvode sa agaroznog gela na pozitivno naelektrisanu najlonsku membranu;
- 8) Sistem za transfer je rastavljen, a LR-PCR proizvodi su kroslinkovani za membranu njenim izlaganjem UV svetlu ( $\lambda=254$  nm) na transluminatoru (Transilluminator, *Vilber Lourmat*, Francuska) po 3-5 min sa obe strane;

- 9) Membrana je ili odmah korišćena za hibridizaciju ili je osušena na vazduhu, uvijena u aluminijumsku foliju i čuvana na sobnoj temperaturi do hibridizacije;
- 10) Papiri za transfer su ispirani u dejonizovanoj vodi i osušeni na sobnoj temperaturi za ponovno korišćenje.

### **3.5.3. Protokol za hibridizaciju sa (CAG)<sub>12</sub> probom**

- 1) Membrana je stavljena u tubu za hibridizaciju, prelivena je standardnim prehibridizacionim puferom (5x SSC, 0,1% (v/v) N-lauroylsarcosine-Na so, 0,02% SDS, 2% reagens za blokiranje) i okretana je na 65°C/1-2 h u hibridizacionoj rerni (Hybridiser HB-ID, *Technne*, SAD);
- 2) Prehibridizacioni pufer je odliven i čuvan za ponovnu upotrebu na 4°C, dok je membrana prelivena standardnim hibridizacionim puferom sa (CAG)<sub>12</sub> probom, koja je na 3' kraju obeležena DIG-ddUTP-om (5x SSC, 0,1% N-lauroylsarcosine-Na so, 0,02% SDS, 2% bloking reagens, 5 pmol (CAG)<sub>12</sub>-3'-DIG-ddUTP) i okretana je na 65°C preko noći u hibridizacionoj rerni. Standardni hibridizacioni pufer je neposredno pred upotrebu inkubiran na 100°C/10 min i zatim potpuno ohlađen na ledu;
- 3) Nakon završene hibridizacije, pufer za hibridizaciju je odliven i čuvan za ponovnu upotrebu na -20°C;
- 4) Membrana je ispirana ljuljanjem na rokeru 2 puta po 5 minuta na sobnoj temperaturi u 2x puferu za ispiranje (eng. *2x Washing buffer*, 2x SSC, 0,1% (w/v) SDS);
- 5) Membrana je ispirana 2 puta po 20 min na temperaturi hibridizacije u 0,5x puferu za ispiranje (eng. *0,5x Washing buffer*, 0,5x SSC, 0,1% (w/v) SDS), zagrejanom na 65°C u hibridizacionoj rerni;

### 3.5.4. Protokol za hemiluminiscentnu detekciju

- 1) Membrana je ekvilibrisana stavljanjem 1 min u pufer sa maleinskom kiselinom (eng. *Maleic-acid buffer*; 0,1 M maleinska kiselina, 0,15 M NaCl, pH 7,5 na 20°C);
- 2) Membrana je ljuljana na rokeru 45 min na sobnoj temperaturi u reagensu za blokiranje (eng. *Blocking reagents*; 1% (w/v) nemasno mleko u puferu sa maleinskom kiselinom);
- 3) Anti-DIG-AP (*Roche Life Science*, Nemačka) je rastvoren u reagensu za blokiranje u odnosu 1:20 000;
- 4) Membrana je prebačena u rastvor sa anti-DIG-AP-om i ljuljana je na rokeru 30 min na sobnoj temperaturi;
- 5) Membrana je ispirana od viška nevezanog antitela ljuljanjem na rokeru 2 puta po 20 min na sobnoj temperaturi u puferu za ispiranje sa TWEEN-om 20 (eng. *Wash buffer with TWEEN 20*; 0,1 M maleinska kiselina, 0,15M NaCl, pH 7,5 na 20°C, 0,3% (v/v) TWEEN 20);
- 6) Membrana je ekvilibrisana ljuljanjem na rokeru 2-5 min na sobnoj temperaturi u puferu za detekciju (eng. *Detection buffer*; 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 na 20°C);
- 7) CPD-star (*Roche Life Science*, Nemačka) je rastvoren u puferu za detekciju u odnosu 1:100;
- 8) Ekvilibrisana membrana je položena na acetatnu foliju, prelivena je rastvorom CPD-stara (0,5 ml ovog rastvora je dovoljno za 100 cm<sup>2</sup> membrane) i pokrivena drugom acetatnom folijom razvlačeći hemiluminiscentni supstrat ravnomerno po celoj površini membrane. Papirom su istisnuti svi prisutni mehurovi;
- 9) Membrana je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi u mraku;
- 10) Uklonjena je gornja acetatna folija, višak CPD-stara je upijen direktnim naslanjanjem MN 827 B papira na membranu, stavljena je nova acetatna folija i istisnuti su svi mehurovi;

- 11) U mračnoj komori rentgenski film (MXB Film, *Carestream Health*, SAD) je eksponiran membrani 1-2 h ili preko noći;
- 12) Rentgenski film je potopljen u razvijач (*Tetenal Eukobrom*, Nemačka) rastvoren u vodi u odnosu 1:9 do kompletne pojave signala;
- 13) Razvijen rentgenski film (blot) je ispran u destilovanoj vodi;
- 14) Blot je ostavljen 10 min u fiksiru (*Tetenal Superfix Plus*, Nemačka) rastvorenom u vodi u odnosu 1:5;
- 15) Blot je ispiran od fiksira 20 min pod tekućom vodom i osušen.

### **3.5.5. Protokol za alkalno stripovanje probe sa najlonske membrane**

- 1) U slučaju neuspešne detekcije signala, sa sumnjom da je uzrok problema mogla biti hibridizacija sa probom ili hemiluminiscentna detekcija, nakon završene detekcije, membrana je potopljena 1 min u destilovanu vodu;
- 2) Membrana je inkubirana 2 puta po 15 min u rastvoru za alkalno stripovanje membrane (eng. *Stripping buffer*; 0,2 M NaOH, 0,1% (w/v) SDS) na 37°C u hibridizacionoj retni;
- 3) Membrana je ispirana 5 min u 2x SSC, a zatim 5 min u destilovanoj vodi;
- 4) Membrana je osušena na vazduhu, uvijena u aluminijumsku foliju i čuvana do sledeće hibridizacije sa probom na sobnoj temperaturi.

### **3.5.6. Protokol za 3'obeležavanje (CAG)<sub>12</sub> probe sa digoksigenin-11-ddUTP-om**

- 1) Reakciona smeša ukupne zapremine 50 µl sadržala je: 1x pufer za terminalnu transferazu (0,2 M Na-kakodilat, 125 mM Tris-HCl, 0,25mg/ml BSA, pH 6,6 na 25 °C, *Roche Life Science*, Nemačka), 5 µM Co-hlorid (*Roche Life Science*, Nemačka), 0,05 mM DIG-11-ddUTP (*Roche Life Science*, Nemačka), 100 U terminalne transferaze (*Roche Life Science*, Nemačka), 2µg (CAG)<sub>12</sub> probe i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka);
- 2) Reakciona smeša je inkubirana na 37°C preko noći u PCR mašini;
- 3) Smeša je prebačena na led i reakcija obeležavanja je prekinuta dodavanjem 0,1 volumena rastvora za zaustavljanje reakcije (eng. *Stop solution*; 200 mM EDTA,



pH 8,0, *Serva*, Nemačka, 0,005% (w/v) glikogen, *Roche Life Science*, Nemačka);

- 4) U tubu je dodato 3 volumena 96% (v/v) etanola (*ZORKA Pharma*, Srbija) ohlađenog na -20°C i 0,1 volumen 4 M Li-hlorida (*Serva*, Nemačka);
- 5) Obeležena proba je ostavljena da precipitira na -20°C preko noći;
- 6) Smeša je centrifugirana na 13000 rpm/30 min na 4°C;
- 7) Supernatant je odliven, a talog je ispran sa 50 µl 70% (v/v) etanola (*ZORKA Pharma*, Srbija);
- 8) Smeša je centrifugirana na 13000 rpm/10 min na 4°C;
- 9) Talog obeležene probe je osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u sterilnoj vodi bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka);
- 10) Obeležena proba je rastvorena u 50 ml standardnog hibridizacionog pufera.

### **3.5.7. Protokol za 3'obeležavanje DNK standarda za veličinu sa digoksigenin-11-ddUTP-om**

- 1) Reakciona smeša ukupne zapremine 30 µl sadržala je: 1x pufer za terminalnu transferazu (0,2 M Na-kakodilat, 125 mM Tris-HCl, 0,25mg/ml BSA, pH 6,6 na 25 °C, *Roche Life Science*, Nemačka), 5 µM Co-hlorid (*Roche Life Science*, Nemačka), 2,5 µg DNK standarda za veličinu (DNA Molecular Weight Marker X, *Roche Life Science*, Nemačka), 0,05 mM DIG-11-ddUTP (*Roche Life Science*, Nemačka), 50 U terminalne transferaze (*Roche Life Science*, Nemačka) i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka);
- 2) Koraci od 2 do 9 bili su isti kao kod 3.5.6., osim što se u koraku 4 za precipitaciju koristilo 0,5 volumena 3 M amonijum-acetata (*Sigma-Aldrich*, SAD), umesto 0,1 volumen 4 M Li-hlorida.

### **3.6. Ispitivanje prisustva varijantnih ponovaka uzvodno od 3' kraja DMPK ekspanzija digestijom long-range PCR proizvoda enzimom SsiI**

Prisustvo varijantnih ponovaka uzvodno od samog 3' kraja, prema središnjem delu DMPK ekspanzija, nije moglo biti određeno usled ograničenja RP-PCR-a vezanog za preferencijalno umnožavanje fragmenata kraćih od 250-300 bp (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011). Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, primenjen je LR-PCR-bazirani Southern blot sa dodatnim korakom koji podrazumeva restrikciju digestiju umnoženih DMPK ekspanzija korišćenjem enzima SsiI (restrikciono mesto 5'-C↓CGC-3', Thermo Fisher Scientific, SAD). U ovom pristupu, poređenje Southern blot profila digeriranih i nedigeriranih LR-PCR proizvoda kod datog bolesnika može ukazivati na prisustvo dodatnih CCG prekida uzvodno od 3' kraja. Digestija LR-PCR proizvoda sa SsiI izvršena je u ukupnoj zapremini od 20 µl, koja je inkubirana na 37°C preko noći u PCR mašini. Reakciona smeša sadržala je: 1x Buffer O (Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,5 U enzima SsiI (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 12,5 µl LR-PCR proizvoda. Digerirani LR-PCR proizvodi vizuelizovani su primenom Southern blot hibridizacije (Poglavlje 3.5).

### **3.7. Određivanje strukture varijantnih ponovaka uzvodno od 3' kraja *DMPK* ekspanzija sekvenciranjem i *repeat-primed* PCR-om za detekciju perfektnih CCG nizova**

Pored prethodno navedenog pristupa za ispitivanje prisustva varijantnih ponovaka uzvodno od samog 3' kraja, struktura kompletne varijantne *DMPK* ekspanzije kod osobe DF2-2 određena je direktnim sekvenciranjem PCR proizvoda (Poglavlje 3.4), s obzirom na to da su primenjenim protokolom (Saluto et al., 2005) dobijene trake vidljive na agaroznom gelu.

Prisustvo CCG bloka i određivanje broja CCG ponovaka unutar bloka urađeno je i RP-PCR-om za detekciju perfektnih CCG nizova, u kome su korišćeni prajmeri VIC-P2-rev, P5CCG i P5 (Tabela 3.1). RP-PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10  $\mu$ l. Reakciona smeša sadržala je: 1x GeneAmp® Gold Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,2 mM 7-deaza-GTP (*New England Biolabs*, SAD), 0,05  $\mu$ M prajmer P5CCG i 0,5  $\mu$ M prajmere VIC-P2-rev i P5 (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1,325 M Betain (*Serva*, Nemačka), 1,25 U *AmpliTaq Gold* DNK polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 10-20 ng genomske DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 95°C/15 min, 2 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 70°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 3 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 68°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 4 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 66°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 5 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 64°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 6 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 62°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 7 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 60°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 8 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 58°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, 5 ciklusa denaturacije 94°C/1 min, hibridizacije prajmera 56°C/1 min i elongacije 72°C/3 min, i finalna elongacija 72°C/10 min. RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

### **3.8. Kvantifikacija somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija primenom *single-molecule small-pool* PCR-a**

U cilju kvantifikacije somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija i praćenja njihove dinamike tokom vremena, primenjena je metoda *single-molecule* SP-PCR. Ova metoda podrazumeva umnožavanje mutiranih alela iz višestrukih malih pool-ova DNK, koji sadrže od 0,5 do 10 genomskih ekvivalenata DNK (Gomes-Pereira et al., 2004). Polazeći od navedene količine DNK, detektuju se jedna do desetak diskretnih traka, od kojih je svaka dobijena umnožavanjem jednog mutiranog alela. *Single-molecule* SP-PCR proizvodi razdvajaju se elektroforezom u agaroznom gelu i detektuju se Southern blot hibridizacijom pod uslovima koji dozvoljavaju detekciju proizvoda nastalih umnožavanjem samo jednog mutiranog alela. Usled male početne količine DNK, ovom metodom ne favorizuje se predominantno umnožavanje *wild-type* alela u odnosu na mutirane. Metoda se odlikuje izuzetnom senzitivnošću, čime je moguća detekcija kako najčešćih, tako i retkih alelskih varijanti prisutnih u ćelijama određenog tkiva.

*Single-molecule* SP-PCR izvođen je sa ~30-60 pg DNK (5-10 genomskih ekvivalenata). Korišćen je prethodno opisani protokol za LR-PCR (Savic et al., 2002), sa izuzetkom za bolesnika DF2-1, za koga je primenjen protokol za detekciju CGG ekspanzija u genu *FMRI* (Saluto et al., 2005) uz upotrebu prajmera 101 i 102 (Brook et al., 1992) (Tabela 3.1) i opisana Southern blot hibridizacija (Poglavlje 3.5). Veličina proizvoda *single-molecule* SP-PCR-a određivana je korišćenjem Core Laboratory Image Quantification Software - CLIQS (*TotalLab Ltd.*, UK) (Poglavlje 3.5). Izvođenjem serije *single-molecule* SP-PCR-ova, umnoženo je barem 200 alela po uzorku radi dobijanja verodostojne distribucije učestalosti mutiranih *DMPK* alela. Vrednost 10. percentila distribucije učestalosti alela korišćena je za procenu dužine progenitornog alela (Higham, 2013), kao preciznija i objektivnija mera u odnosu na jasnu donju granicu razmaza dobijenog LR-PCR-om (Monckton et al., 1995).

### **3.9. Ispitivanje metilacije CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od (CTG)<sub>n</sub> niza u genu *DMPK* primenom bisulfitnog sekvenciranja**

Ispitivanje metilacije CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od CTG ponovaka u genu *DMPK* (Slika 3.2), urađeno je bisulfitnim sekvenciranjem. Ova metoda podrazumeva Sangerovo sekvenciranje PCR proizvoda dobijenih korišćenjem bisulfitno-konvertovane DNK kao matrice. Bisulfitna konverzija genomske DNK zasniva na hemijskoj reakciji jednolančane DNK sa Na-bisulfitom na visokoj temperaturi i niskoj pH vrednosti. Tom prilikom, nemetilovani citozini (C) konvertuju se u uracil, a nakon PCR-a u timin (T), dok metil grupa kod 5-metil citozina sprečava reakciju sulfonacije i posledičnu konverziju u uracil. U skladu sa navedenim, prisustvo signala T u elektroforegramima ukazuje na odsustvo metilacije, dok prisustvo signala C ukazuje na prisustvo 5-metil citozina u datom CpG ostrvcetu.

Za umnožavanje regiona sa CpG ostrvcima u okolini ponovaka u genu *DMPK* iskorišćeni su prethodno objavljeni prajmeri (Barbe et al., 2017) za *nested* i *hemi-nested* PCR za uzvodni i nizvodni region, redom (Slika 3.2, Tabela 3.2). Analizirano je 30 CpG ostrvaca u regionu od ~300 bp uzvodno i 11 CpG ostrvaca u regionu od ~200 bp nizvodno od (CTG)<sub>n</sub> niza u genu *DMPK* (Slika 3.2). Ovim su bila obuhvaćena i CpG ostrvca u vezivnim mestima proteina CTCF: 7 CpG ostrvaca u mestu CTCF1 i 3 CpG ostrvca u mestu CTCF2 (Slika 3.2).

Imajući u vidu ograničenje bisulfitnog sekvenciranja vezano za nejednaku zastupljenost četiri nukleotida u matičnim lancima bisulfitno-konvertovane DNK, za optimizaciju su korišćeni uzorci četiri bolesnika sa juvenilno adultnom formom DM1 i čistim ekspanzijama, kao negativne kontrole, i dva bolesnika sa kongenitalnom formom DM1, kao pozitivne kontrole za metilaciju (Barbe et al., 2017; Steinbach et al., 1998).

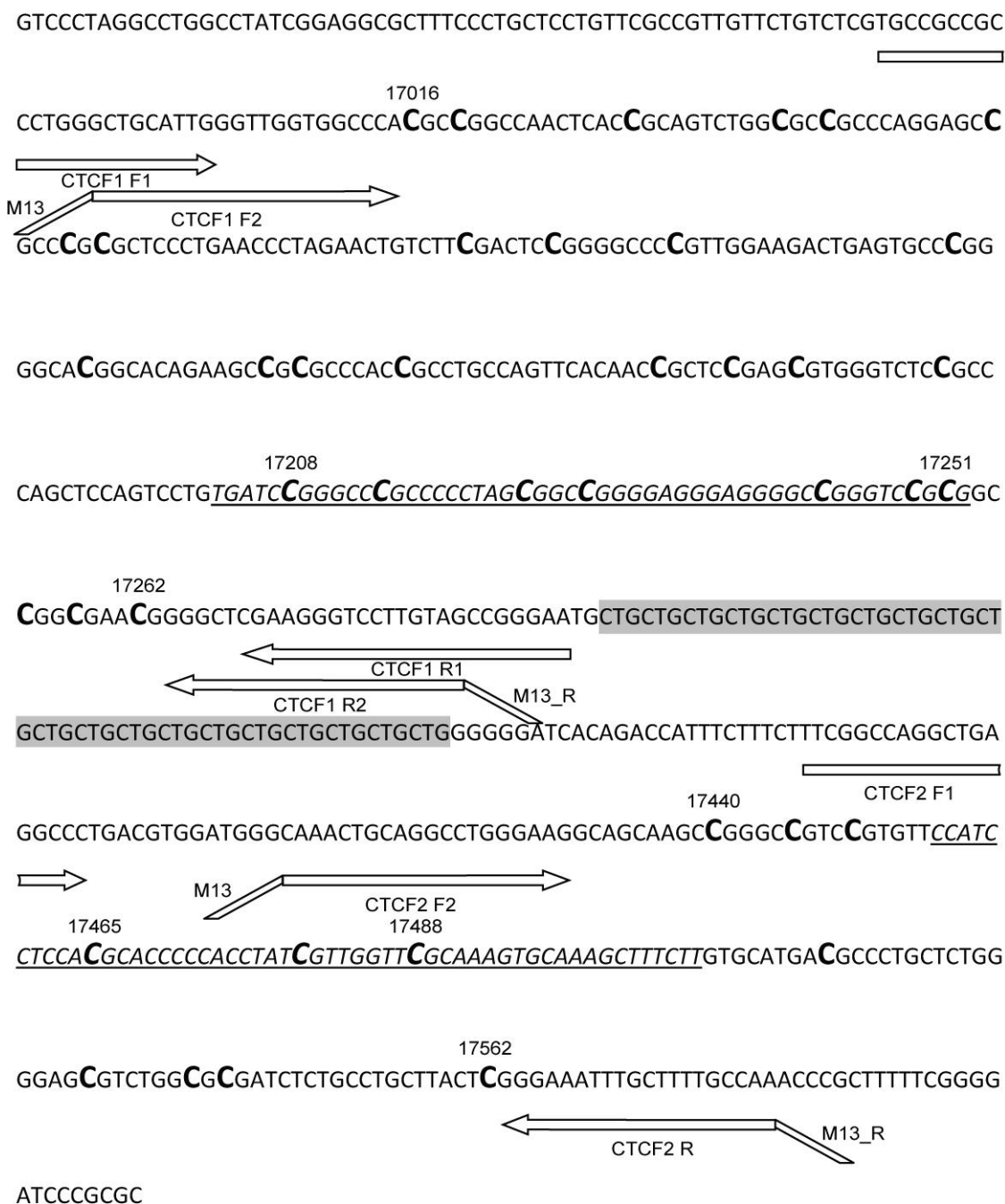
**Tabela 3.2.** Prajmeri korišćeni u analizi metilacije CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od (CTG)<sub>n</sub> niza u genu *DMPK* sa prikazanim očekivanim dužinama PCR proizvoda.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (Barbe et al., 2017)	Dužina PCR proizvoda (bp)
CTCF1 F1	5'-TGTYGTYGTTTTGGGTTGTATTG-3'	312 bp
CTCF1 R1	5'-TTCCYGACTACAAAAACCCTTYG-3'	
M13_CTCF1 F2	*5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGTATTGGGTTGGTGGTTTA-3'	326 bp
M13_R_CTCF1 R2	*5'- <u>CAGG</u> AAACAGCTATGACCTACAAAAACCCTTYGAACCC-3'	
CTCF2 F1	5'-TTYGGTTAGGTTGAGGTTT-3'	204 bp
CTCF2 R	5'-TTAACAAAAACAAATTTCCC-3'	
M13_CTCF2 F2	*5'- <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTTAAATTGTAGGTTTGGGAAG-3'	207 bp
M13_R_CTCF2 R	*5'- <u>CAGG</u> AAACAGCTATGACTTAACAAAAACAAATTTCCC-3'	

Y – nukleotid C ili T; \* – originalni prajmeri su modifikovani dodavanjem sekvence repića M13 i M13\_R koje su prikazane podvučeno.

Bisulfitna konverzija genomske DNK izvršena je korišćenjem komercijalnog seta EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (*Zymo Research*, SAD). Prva runda PCR sa prajmerima CTCF1 F1 i CTCF1 R1 za uzvodni region i prajmerima CTCF2 F1 i CTCF2 R za nizvodni region je rađena u ukupnoj zapremini od 10 µl prema modifikovanom originalnom protokolu (Barbe et al., 2017). Reakciona smeša sadržala je: 1x GeneAmp® Gold Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM dNTPs (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,4 µM prajmere (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,5 U *AmpliTaq Gold* DNK polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 50-100 ng bisulfitno-konvertovane DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 95°C/15 min, 40 ciklusa denaturacije 95°C/30 s, hibridizacije prajmera 55°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, i finalna elongacija 72°C/10 min.

*Nested* i *hemi-nested* PCR-om dalje je umnožavan 1 µl proizvoda prve runde PCR-a za uzvodni i nizvodni region, redom, u ukupnoj zapremini od 25 µl. Reakciona smeša je bila identičnog sastava, pri čemu su korišćeni „unutrašnji” prajmeri koji na svom 5' kraju poseduju sekvencu repića M13 ili M13\_R i to: prajmeri M13\_CTCTF1 F2 i M13\_R\_CTCTF1 R2 za *nested* PCR i prajmeri M13\_CTCTF2 F2 i M13\_R\_CTCTF2 R za *hemi-nested* PCR. PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu za *touch-down* PCR: inicijalna denaturacija 95°C/15 min, 2 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 70°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 3 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 68°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 4 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 66°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 5 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 64°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 6 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 62°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 7 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 60°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 8 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 58°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, 5 ciklusa denaturacije 94°C/30 s, hibridizacije prajmera 56°C/30 s i elongacije 72°C/30 s, i finalna elongacija 72°C/10 min. Umnoženi proizvodi PCR-a prečišćeni su korišćenjem komercijalnog seta QIAquick® PCR Purification Kit (*Qiagen*, Nemačka) i direktno sekvencirani uz pomoć prajmera M13 (5'-TGTAACAACGACGGCCAGT-3') i M13\_R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') i komercijalnog seta BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) prema prethodno opisanim protokolima (Poglavlje 3.4).



**Slika 3.2. Nekonvertovana sekvenca regiona gena *DMPK*, koja obuhvata CTG ponovke i uzvodna i nizvodna CpG ostrvca, sa pozicijama prajmera korišćenih za bisulfitno sekvenciranje regiona sa CpG ostrvcima.** CTG ponovci su zasenčeni sivom bojom. Sekvence vezivnih mesta za protein CTCF, uzvodno i nizvodno od ponovaka, prikazane su iskošeno i podvučeno, dok su analizirana CpG ostrvca prikazana podebljanim i uvećanim slovima C. Pozicije prajmera označene su strelicama, dok su njihove sekvence date u Tabeli 3.2. Prajmeri CTCF1 F1 i CTCF1 R1 i prajmeri CTCF2 F1 i CTCF2 R1 korišćeni su za umnožavanje uzvodnog i nizvodnog regiona, redom. Prajmeri M13\_CTCF1 F2 i M13\_R\_CTCF1 R2 i prajmeri M13\_CTCF2 F2 i M13\_R\_CTCF2 R korišćeni su za *nested* i *himi-nested* PCR, redom, čiji su proizvodi bidirekciono sekvencirani korišćenjem prajmera M13 i M13\_R. Pozicije prvog i poslednjeg prikazanog CpG ostrvceta označene su prema referentnoj sekvenci NG\_009784.1.



### 3.9.1. Protokol za bisulfitnu konverziju genomske DNK korišćenjem seta EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, SAD)

- 1) U tubu sa praškastim CT reagensom za konverziju dodato je 900 µl sterilne vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka), 300 µl pufera za razblaživanje M (eng. *M-Dilution Buffer*) i 50 µl pufera za rastvaranje M (eng. *M-Dissolving Buffer*). Pripremljena smeša je vorteksovana 10 min na sobnoj temperaturi. Ako se odmah ne iskoristi, rastvoreni CT reagens čuva se preko noći na sobnoj temperaturi, jednu nedelju na 4°C ili jedan mesec na -20°C;
- 2) U mikrotubu zapremine 0,2 ml dodato je 130 µl rastvorenog CT reagensa i 20 µl uzorka DNK (400-600 ng), smeša je zatim promešana nekoliko puta pipetiranjem i kratko centrifugirana do 13000 rpm (MiniSpin plus, *Eppendorf*, Nemačka);
- 3) Pripremljeni uzorci su denaturisani na 98°C/10 min, nakon čega je usledila reakcija bisulfitne konverzije na 64°C/2,5 h. Ova reakcija je izvođena u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD). Uzorci su do dalje analize čuvani na 4°C;
- 4) U kolonu smeštenu u kolektorskoj tubi dodato je 600 µl pufera za vezivanje M (eng. *M-Binding Buffer*) i reakciona smeša sa konvertovanom DNK;
- 5) Kolona je zatvorena i rastvor je promešan izvrtanjem kolone nekoliko puta i centrifugiran na 10000 rpm/1 min;
- 6) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 7) Dodato je 100 µl pufera za ispiranje M (eng. *M-Wash Buffer*) i smeša je centrifugirana na 10000 rpm/1 min;
- 8) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 9) Dodato je 200 µl pufera za desulfonovanje M (eng. *M-Desulphonation Buffer*), smeša je inkubirana 15-20 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 10000 rpm/1 min;

- 10) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 11) Dodato je 200 µl pufera za ispiranje M (eng. *M-Wash buffer*) i smeša je centrifugirana na 10000 rpm/1 min;
- 12) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu;
- 13) Dodato je 200 µl pufera za ispiranje M (eng. *M-Wash buffer*) i smeša je centrifugirana na 10000 rpm/1 min;
- 14) Kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu mikrotubu zapremine 1,5 ml;
- 15) Dodato je 15 µl pufera za eluciju M (eng. *M-Elution buffer*) direktno na matriks kolonu, smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 13000 rpm/1 min.
- 16) Eluirani uzorak bisulfitno-konvertovane DNK čuvan je na -20°C do upotrebe.

### 3.10. Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama primenom metil-specifičnog *repeat-primed* PCR-a

U cilju ispitivanja metilacije varijantnih CCG ponovaka u (CTG)<sub>n</sub> nizu gena *DMPK*, dizajniran je metil-specifičan RP-PCR, koji se od klasičnog RP-PCR-a razlikuje po tome što kao matricu koristi bisulfitno-konvertovanu genomsku DNK. Metil-specifičan RP-PCR prvi put je primenjen za detekciju metilacije CGG ekspanzija u genu *FMR1* kod FRAXA bolesnika (Zhou et al., 2006), a kasnije i G4C2 ekspanzija u genu *C9ORF72* kod ALS i FTD bolesnika (Xi et al., 2015), s tim da je interpretacija rezultata bila jednostavnija, jer su analizirani perfektni nizovi ponovaka koji su potpuno metilovani.

Princip metil-specifičnog RP-PCR-a za ispitivanje metilacije CCG ponovaka na 3' kraju (CTG)<sub>n</sub> niza u genu *DMPK* predstavljen je na slici 3.3. Genomska DNK DM1 bolesnika sa varijantnim CCG ponovcima se prvo bisulfitno konvertuje, nakon čega se očekuje da svi nemetilovani citozini u okviru CTG i CCG ponovaka budu pretvoreni u uracil, odnosno T nakon PCR-a, dok eventualno prisutni 5-metil citozini ostaju neizmenjeni i ponašaju se kao C u pogledu sparivanja baza. Za svakog bolesnika radi se RP-PCR sa kliznim prajmerom za nemetilovane CCG ponovke i RP-PCR-ovi sa odgovarajućim kliznim prajmerima za metilovane ponovke, u skladu sa utvrđenim obrascem CCG ponovaka. Odsustvo umnožavanja za nemetilovane CCG ponovke i specifični RP-PCR profil za metilovane CCG ponovke kod datog bolesnika i obrnuto, ukazuju na postojanje, odnosno odsustvo metilacije CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama (Slika 3.3). Metil-specifičan RP-PCR je kvalitativan „da/ne” test, te se ne može koristiti za precizno određivanje stepena metilacije. Međutim, uspešno umnožavanje RP-PCR-om sa kliznim prajmerima kako za nemetilovane tako i za metilovane CCG ponovke kod datog bolesnika ukazuje na prisustvo heterogene metilacije (Slika 3.3).

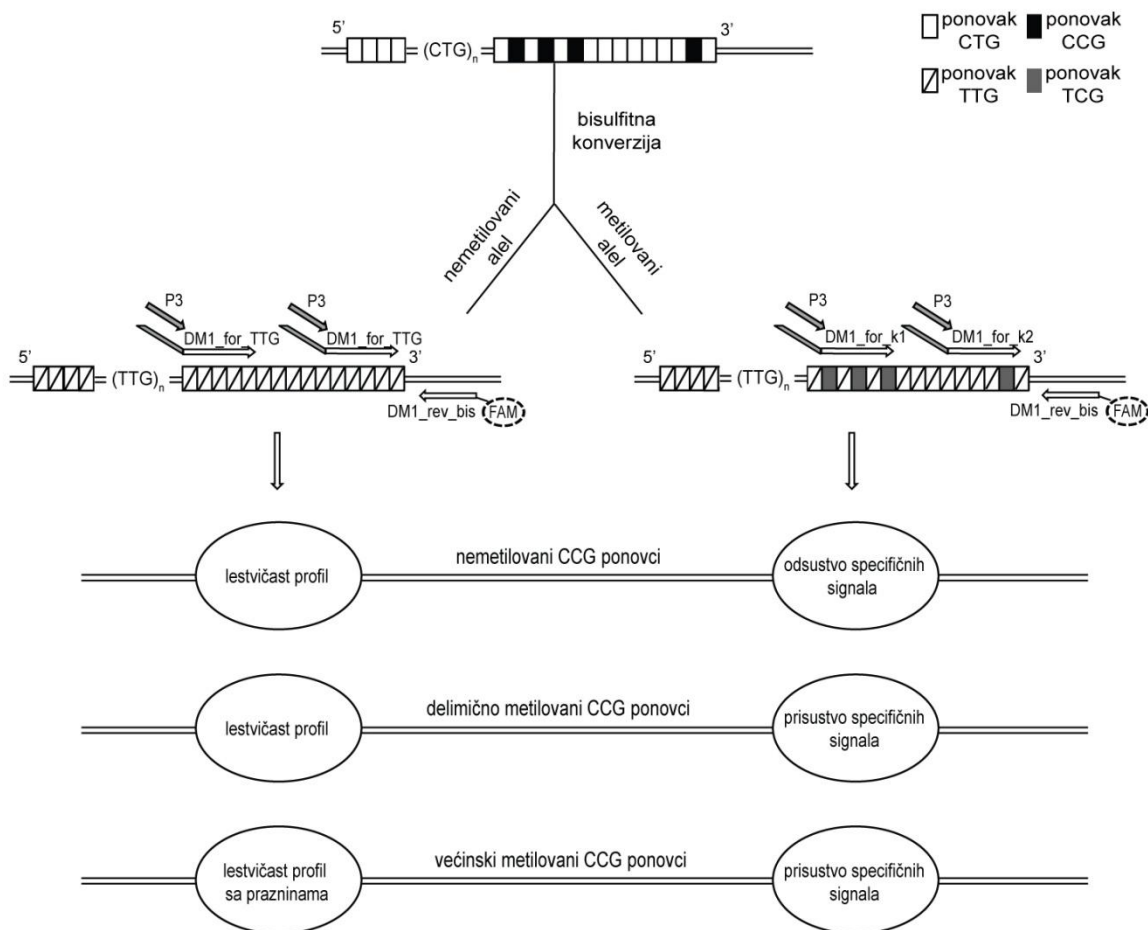
S obzirom na to da su lanci bisulfitno-konvertovane DNK međusobno nekomplementarni, najpre je dizajniran jedinstven prajmer, komplementaran sekvenci nizvodno od ponovaka u genu *DMPK*, koji je na svom 5' kraju fluorescentno obeležen (FAM-DM1\_rev\_bis, Tabela 3.3). U zavisnosti od obrasca varijantnih CCG ponovaka na 3'

kraju *DMPK* ekspanzija kod ispitivanih bolesnika, dizajnirani su različiti klizni prajmeri na osnovu referentne sekvence NG\_009784.1, koji su komplementarni lancu nastalom ekstenzijom jedinstvenog prajmera. Klizni prajmeri DM1\_for\_TCG, DM1\_for\_k1, DM1\_for\_k2 i DM1\_for\_k3 (Tabela 3.3) mogu da hibridizuju sa ponovcima ukoliko postoji metilacija citozina u okviru varijantnih CCG ponovaka. Takođe, dizajniran je dodatni klizni prajmer DM1\_for\_TTG (Tabela 3.3), koji je istovremeno komplementaran nemetilovanim perfektnim CCG i CTG ponovcima u bisulfitno-konvertovanoj DNK. Svi klizni prajmeri su na svom 5' kraju posedovali sekvencu repića P3 (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011).

**Tabela 3.3.** Dizajnirani prajmeri korišćeni u analizi metilacije varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera i opis njegove ciljne sekvence u bisulfitno-konvertovanoj DNK	Testirani bolesnici
FAM-DM1_rev_bis	5'-FAM-TTCCCAAACCTACAATTTACCCAT-3' Jedinstvena sekvenca nizvodno od CTG ponovaka u genu <i>DMPK</i>	Svi
DM1_for_TTG	5'-P3-GGAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG-3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa perfektnim nemetilovanim CCG i CTG ponovcima	DF1, DF2, DF3, DF4-1
DM1_for_TCG	5'-P3-TGTCGTCGTCGTCGTCGTCG-3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa nizom od šest metilovanih CCG ponovaka	DF2, DF4-1
DM1_for_k1	5'-P3-TGTTGTCGTTGTCGTTGTCG-3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa metilovanim sekvencama CCGCTG heksamera	DF1, DF4-1
DM1_for_k2	5'-P3-TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTCG-3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa nemetilovanim CTG ponovcima, ali se 3' krajem vezuje za metilovan C	DF1, DF2, DF3, DF4-1
DM1_for_k3	5'-P3-TGTTGTTGTTGTTGTCGTCGTCG-3' Klizni prajmer koji 3' krajem hibridizuje sa tri uzastopna metilovana CCG ponovka	DF3, DF4-1

P3 označava sekvencu repića (Tabela 3.1) (Radvansky, Ficek, Minarik, et al. (2011))



**Slika 3.3. Šematski prikaz metil-specifičnog *repeat-primed* PCR-a (RP-PCR) za ispitivanje metilacije CCG ponovaka na 3' kraju  $(CTG)_n$  niza u genu *DMPK*.** Nakon bisulfitne konverzije DNK DM1 bolesnika sa varijantnim CCG ponovcima, za svakog od njih urađen je RP-PCR za nemetilovane i metilovane CCG ponovke, u kojima je korišćen jedinstveni, fluorescentno-obeleženi reverzni prajmer DM1\_rev\_bis. Klizni prajmer DM1\_for\_TTG (na slici levo, Tabela 3.3) hibridizuje sa nemetilovanim CCG/CTG ponovcima. Nakon bisulfitne konverzije i PCR-a, CTG i nemetilovani CCG ponovci postaju TTG ponovci, usled čega se dobija lestvičast RP-PCR profil. Ukoliko je citozin metilovan, CCG ponovci postaju TCG i prajmer DM1\_for\_TTG ne može da hibridizuje sa njima, usled čega se u lestvičastom RP-PCR profilu uočavaju praznine. Klizni prajmeri DM1\_for\_TCG, DM1\_for\_k1, DM1\_for\_k2 i DM1\_for\_k3 (na slici desno, Tabela 3.3) hibridizuju sa CCG ponovcima ukoliko je citozin metilovan, dajući RP-PCR profile sa specifičnim signalima. Svi klizni prajmeri na svom 5' kraju poseduju sekvencu repića P3. Određene kombinacije RP-PCR profila sa kliznim prajmerima za metilovane i nemetilovane CCG ponovke kod datog bolesnika, ukazuju na postojanje ili odsustvo metilacije varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija, ili na prisustvo heterogene metilacije. FAM – fluorescentna boja.

Nakon bisulfitne konverzije genomske DNK (Poglavlje 3.9.1), svaki RP-PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10  $\mu$ l. Reakciona smeša sadržala je: 1x GeneAmp® Gold Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM dNTP (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,3  $\mu$ M prajmere FAM-DM1\_rev\_bis i P3, 0,05  $\mu$ M odgovarajući klizni prajmer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1 M Betain (*Serva*, Nemačka), 0,5 U *AmpliTaq Gold* DNK polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 50-100 ng bisulfitno-konvertovane DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 95°C/15 min, 40 ciklusa denaturacije 95°C/1 min, hibridizacije prajmera 60°C/1 min, i elongacije 72°C/2 min, i finalna elongacija 72°C/60 min. Metil-specifični RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

### **3.11. Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama primenom *repeat primed* PCR-a i genomske DNK digerirane enzimom *SsiI* kao matrice**

S obzirom na to da je metil-specifičan RP-PCR za ispitivanje metilacije varijantnih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama originalno dizajniran u ovom radu, u cilju potvrde dobijenih rezultata urađena je dodatna analiza. Primenjen je nizvodni RP-PCR za detekciju varijantnih CCG ponovaka u (CTG)<sub>n</sub> nizu gena *DMPK* (Poglavlje 3.3), ali je kao matrica korišćena genomska DNK digerirana restrikcijom enzimom *SsiI*. Navedeni enzim prepoznaje restrikciono mesto 5'-C↓CGC-3' i senzitivan je na CpG metilaciju tako da enzim ne vrši digestiju, ako je 5-metil citozin prisutan u restrikcionom mestu. Za svakog bolesnika radi se nizvodni RP-PCR kako sa *SsiI* digeriranom DNK tako i sa nedigeriranom DNK. Ukoliko su CCG ponovci nemetilovani, RP-PCR profili sa *SsiI* digeriranom DNK sadrže signale koji su po dužini kraći od RP-PCR signala sa nedigeriranom DNK. U prisustvu metilacije očekuje se da signali u RP-PCR profilima sa *SsiI* digeriranom DNK i RP-PCR profilima sa nedigeriranom DNK budu identični po dužini. Kao i metil-specifičan RP-PCR, RP-PCR sa genomskom DNK digeriranom enzimom *SsiI* je kvalitativan „da/ne” test. Međutim, RP-PCR profili koji istovremeno sadrže očekivane dužine signala za digeriranu i nedigeriranu DNK ukazuju na prisustvo heterogene metilacije kod datog bolesnika.

Digestija genomske DNK enzimom *SsiI* rađena je u ukupnoj zapremini od 30 µl. Reakciona smeša sadržala je: 1x Buffer O (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 5 U enzima *SsiI* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) i 500-800 ng genomske DNK bolesnika sa varijantnim ponovcima CCG. Reakciona smeša je inkubirana preko noći na 37°C.

Digerirana DNK je zatim korišćena za četiri reakcije nizvodnog RP-PCR-a u kome su korišćeni klizni prajmeri za detekciju varijantnih CCG ponovaka: P4CTG-for, GC1\_CC, GC1\_CCG i P5CCG (Tabela 3.1). Sastav reakcionih smeša i temperaturni profili reakcija opisani su u poglavljima 3.3, 3.4 i 3.6. RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

### 3.12. Ispitivanje metilacije CCG ponovaka u ponovljenim nizovima gena *FMRI* i *HTT* primenom metil-specifičnog *repeat primed PCR*-a

U cilju provere verodostojnosti metil-specifičnog RP-PCR-a za ispitivanje metilacije CCG ponovaka u (CTG)<sub>n</sub> nizu gena *DMPK*, koji je originalno dizajniran u ovom radu, analizirani su drugi lokusi metil-specifičnim RP-PCR-om. Kao pozitivna kontrola analizirana je metilacija CGG ponovaka u genu *FMRI*. Kao pretpostavljena negativna kontrola analizirana je metilacija CCG ponovaka u genu *HTT*. Naime, gen *HTT* sadrži region sličan po strukturi *DMPK* ekspanzijama sa varijantnim CCG ponovcima, u smislu GC bogatih sekvenci sa kombinacijom ekspanzijama sklonih CAG/CTG ponovaka, praćenih kraćim nizovima CCG/GGC ponovaka (Gellera et al., 1996).

Za analizu metilacionog statusa CGG ponovaka u genu *FMRI* korišćeni su prethodno opisani jedinstveni prajmer Ned-mTPF, klizni prajmer mTPR, i repić TailR (Zhou et al., 2006) (Tabela 3.4). Primenom ovog metil-specifičnog RP-PCR-a moguće je detektovati metilovane CCG ekspanzije kod dečaka sa FRAXA sindromom i žena koje su heterozigotni nosioci ekspanzije.

**Tabela 3.4.** Prajmeri korišćeni u analizi metilacije CGG ponovaka u genu *FMRI*.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (Zhou et al., 2006) i opis njegove ciljne sekvence
NED-mTPF	5'-NED-CCGCTACCAAAAAACGTACGACAACGCG-3' Jedinstvena sekvenca uzvodno od CGG ponovaka u genu <i>FMRI</i>
mTPR	5'-TACCGATACGCATCCCAGTTTGTCAGC(TCG) <sub>8</sub> -3' Klizni prajmer koji hibridizuje sa metilovanim CGG ponovcima
TailR	5'- TACCGATACGCATCCCAGTTTGTCAGC-3' Repić koji hibridizuje sa podvučenom sekvencom u prajmeru mTPR

Nakon bisulfitne konverzije genomske DNK (Poglavlje 3.9.1), RP-PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakciona smeša sadržala je: 1x GeneAmp® Gold Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,2 mM 7-deaza-GTP (*New England Biolabs*, SAD), 0,4 µM prajmere Ned-mTPF i TailR, 0,05 µM klizni prajmer mTPR (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1,325 M Betain (*Serva*, Nemačka), 1 U *AmpliTaq Gold*



DNK polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 50-100 ng bisulfitno-konvertovane DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema prethodno opisanom temperaturnom profilu (Poglavlje 3.7). RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

Imajući u vidu da metilacija tri relativno kratka niza neperfektnih CCG ponovaka, koji se nalaze neposredno nizvodno od ekspanzijama sklonih CAG ponovaka u genu *HTT* i kodiraju poliprolinske nizove u proteinu hantingtin (Gellera et al., 1996), nije ispitivana, u ovoj studiji dizajniran je metil-specifičan RP-PCR. Prvo je dizajniran jedinstven fluorescentno obeležen nizvodni prajmer FAM-HD\_rev\_bis, a zatim i specifični setovi kliznih prajmera na osnovu referentne sekvence NG\_009378.1 (Tabela 3.5). U analizi prvog polimorfnog CCG niza korišćeni su prethodno navedeni klizni prajmeri DM1\_for\_TTG (specifičan za nemetilovanu sekvencu) i DM1\_for\_TCG (specifičan za metilovanu sekvencu) (Tabela 3.3). U analizi nizvodnih CpG ostrvaca, korišćeni su klizni prajmeri HD\_k1\_TG - HD\_k4\_TG, koji mogu da hibridizuju sa nemetilovanom sekvencom, i klizni prajmeri HD\_k1\_CG - HD\_k4\_CG, koji mogu da hibridizuju sa metilovanom sekvencom (Tabela 3.5). Slično metil-specifičnom RP-PCR za varijantne CCG ponovake u genu *DMPK* (Poglavlje 3.10), obrazac dobijenih signala, korišćenjem odgovarajućih prajmera za nemetilovanu i metilovanu sekvencu, ukazuje na metilacioni status regiona gena *HTT* bogatog CCG ponovcima.

Nakon bisulfitne konverzije genomske DNK (Poglavlje 3.9.1), RP-PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakciona smeša sadržala je: 1x GeneAmp® Gold Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*Kapa Biosystems*, SAD), 0,2 mM dNTP (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,3 µM prajmere FAM-HD\_rev\_bis i P3, 0,05 µM odgovarajući klizni prajmer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 1 M Betain (*Serva*, Nemačka), 0,5 U *AmpliAq Gold* DNK polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 50-100 ng bisulfitno-konvertovane DNK i sterilnu vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 95°C/15 min, 30 ciklusa denaturacije 95°C/1 min, hibridizacije prajmera 60°C/1 min, i elongacije 72°C/1 min, i finalna elongacija 72°C/10 min. RP-PCR proizvodi analizirani su fragment analizom (Poglavlje 3.3.1).

**Tabela 3.5.** Dizajnirani prajmeri korišćeni u analizi metilacije CCG ponovaka nizvodno smeštenih u odnosu na CAG ponovke u genu *HTT*.

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera i opis njegove ciljne sekvence	Dužina PCR proizvoda (bp)
FAM-HD_rev_bis	5'-FAM-CCTCATAAACTCTAAATTACTAAATCAC-3' Jedinstvena sekvenca nizvodno od CAG ponovaka u genu <i>HTT</i>	/
HD_k1_CG	5'-P3-AGTCGTCGTCGTAGGTATAGTC-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa metilovanom sekvencom	275
HD_k1_TG	5'-P3-TAGTTGTTGTTGTAGGTATAGTTG-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa nemetilovanom sekvencom	276
HD_k2_CG	5'-P3-AGTCGTAGTCGTTTTTCGTCGTC-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa metilovanom sekvencom	242
HD_k2_TG	5'-P3-TAGTTGTAGTTGTTTTTGTGTTGT-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa nemetilovanom sekvencom	243
HD_k3_CG	5'-P3-TCGTTTTTCGTCGTTATTCGGTTC-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa metilovanom sekvencom	222
HD_k3_TG	5'-P3-TTGTTGTTTTTGTGTTATTTGGTTTGG-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa nemetilovanom sekvencom	225
HD_k4_CG	5'-P3-GTTGAGGAGTCGTTGTATCGATC-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa metilovanom sekvencom	192
HD_k4_TG	5'-P3-GTTGAGGAGTTGTTGTATTGATTG-3' Jedinstveni prajmer koji hibridizuje sa nemetilovanom sekvencom	192

P3 označava sekvencu repića prema Radvansky, Ficek, Minarik, et al. (2011).

### 3.13. Statistička obrada rezultata

Za poređenja nominalnih promenljivih (udeo međugeneracijskih kontrakcija u odnosu na ekspanzije, udeo majčinih u odnosu na očeva prenošenja, udeo bolesnika suspektnih na DM1 u odnosu na DM2) između grupa DM1 bolesnika sa i bez varijantnih ponovaka, korišćen je Fišerov egzaktni test.

Kako bi se odabrao odgovarajući test za statistička poređenja kontinualnih promenljivih između grupa DM1 bolesnika sa varijantnim i čistim ekspanzijama (uzrast početka bolesti i stepen miotonije izražen u sekundama), najpre je linearnom regresijom testirana korelacija kliničkih promenljivih sa dužinom progenitornog alela u grupi bolesnika sa juvenilno-adultnom formom DM1 bez varijantnih ponovaka. U slučaju odsustva korelacije između broja CTG ponovaka i ispitivanih kliničkih promenljivih, poređenja su vršena Wilcoxon-Mann-Whitney testom, nakon provere normalnosti distribucije Shapiro-Wilk testom. Sa druge strane, u slučaju postojanja korelacije između broja ponovaka i ispitivanih kliničkih promenljivih, parametri dobijenog modela linearne regresije korišćeni su za procenu mogućih odstupanja.

Za ispitivanje tkivne specifičnosti somatskog mozaicizma, distribucije učestalosti alela iz ćelija krvi i bukalne sluznice poređene su kod pojedinačnih bolesnika Wilcoxon-Mann-Whitney testom, nakon provere normalnosti distribucije Shapiro-Wilk testom.

Za karakterizaciju mutacione dinamike *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi, zapažene i očekivane vrednosti nivoa somatske nestabilnosti poređene su u svakoj grupi bolesnika Wilcoxon signed-rank testom. Razlika u broju ponovaka između 10. i 90. percentila distribucije učestalosti alela korišćena je kao mera zapaženog nivoa somatske nestabilnosti (Higham, 2013; Morales et al., 2012). Za ispitivanje očekivanog nivoa somatske nestabilnosti, razmatrani su modeli linearne regresije koji korelišu somatsku nestabilnost sa dužinom progenitornog alela i uzrastom uzorkovanja (Morales et al., 2012). Modeli linearne regresije su ponovno testirani upotrebom 10. percentila distribucije učestalosti alela, kao mere za veličinu progenitornog alela, na uzorku koji je obuhvatio 136 bolesnika

sa čistim *DMPK* ekspanzijama (dalje označena kao referentna grupa) (Morales et al., 2012) i bolesnike analizirane u ovoj studiji (one sa varijantnim ponovcima i iz kontrolne grupe opisane u Poglavlju 3.1). Ponovno testiranje izvršeno je odvojeno za prvu i drugu vremensku tačku uzorkovanja krvi (Tabela 8.2.1). Modelom 8\* objašnjeno je 90% ukupne varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti u obema vremenskim tačkama. Iz tog razloga ovaj model je korišćen za procenu očekivanog nivoa somatske nestabilnosti kod DM1 bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama i kontrolne grupe.

Za ispitivanje međuindividualne varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti razmatrana je rezidualna varijansa modela 8\*. Rezidualna varijansa ovog modela odražava individualne razlike u nivou somatske nestabilnosti koje nisu objašnjene nezavisnim promenljivim (dužinom progenitornog alela i uzrastom uzorkovanja), već drugim individualno-specifičnim faktorima (genetičkim i sredinskim) (Morales et al., 2012). Svi reziduali su standardizovani na srednju vrednost nula i standardnu devijaciju (SD) jedan. Standardizovani reziduali poređeni su između DM1 bolesnika ispitivanih u ovoj studiji (onih sa varijantnim ponovcima i iz kontrolne grupe opisane u poglavlju 3.1) i referentne grupe DM1 bolesnika (Morales et al., 2012) Wilcoxon-Mann-Whitney testom, nakon provere normalnosti distribucije Shapiro-Wilk testom.

Za karakterizaciju mutacione dinamike somatske nestabilnosti u ćelijama krvi tokom vremena, distribucije učestalosti alela iz dveju vremenskih tačaka poređene su za svakog bolesnika Wilcoxon-Mann-Whitney testom. Dodatno, zapažena i očekivana povećanja veličine ekspanzije tokom vremena poređena su u svakoj grupi bolesnika Wilcoxon signed-rank testom. Očekivano povećanje veličine ekspanzije tokom vremena procenjivano je korišćenjem modela linerane regresije, koji objašnjava ~56% varijabilnosti dvema nezavisnim promenljivim: modalnom veličinom ekspanzije i vremenskim intervalom između uzorkovanja (Martorell et al., 1998). S obzirom na to da se veliki broj alela umnožen *single-molecule* SP-PCR-om uglavnom odlikuje distribucijom učestalosti koja odstupa od normalne, razmatrana je vrednost moda kao odgovarajuća mera modalne veličine ekspanzije. U originalnoj studiji, modalna veličina ekspanzije određivana je kao tačka najvećeg intenziteta trake na rendgenskom filmu genomskog Southern blota ili u

središtu razmaza za veoma difuzne trake (Martorell et al., 1998). Zapaženo povećanje veličine ekspanzije tokom vremena predstavljalo je razliku između vrednosti moda u prvoj i drugoj vremenskoj tački.

Za karakterizaciju mutacione dinamike *DMPK* ekspanzija bez dela koji sadrži prekide (dalje označen kao 5' kraj) u ćelijama krvi i tokom vremena, korišćen je gore opisani pristup za cele ekspanzije. Veličina 5' kraja dobijena je oduzimanjem odgovarajućeg dela sa prekidima na 3' kraju od svakog detektovanog alela u pojedinačnom uzorku. Ponovno testiranim modelom 8\*\* (Morales et al., 2012) za obe vremenske tačke uzorkovanja pokazano je da dužina progenitornog alela i uzrast uzorkovanja objašnjavaju 90% ukupne varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti (Tabela 8.2.2).

Za ispitivanje uzrasta početka bolesti, zapažen i očekivan uzrast poređeni su u svakoj grupi bolesnika Wilcoxon signed-rank testom. Zapaženom vrednošću uzrasta početka bolesti smatrala se ona koju je svaki bolesnik saopštio. Za procenu očekivane vrednosti uzrasta početka bolesti, korišćeni su sledeći modeli linearne regresije (Morales et al., 2012): modeli 9 i 10, koji korelišu uzrast početka bolesti sa dužinom progenitornog alela, i model 11, koji koreliše uzrast početka bolesti sa dužinom progenitornog alela i rezidualnom varijansom somatske nestabilnosti iz modela 8\*. Modeli su ponovno testirani upotrebom 10. percentila distribucije učestalosti alela, kao mere za veličinu progenitornog alela, na uzorku od 121 simptomatskog bolesnika iz referentne grupe (Morales et al., 2012) i bolesnike analizirane u ovoj studiji (one sa varijantnim ponovcima i iz kontrolne grupe opisane u poglavlju 3.1). Ponovno testiranje je izvršeno odvojeno za prvu i drugu vremensku tačku uzorkovanja krvi (Tabela 8.2.3). Ponovno testiranim modelima objašnjeno je ~43% (model 9\*), ~49% (model 10\*) i ~55% (model 11\*) ukupne varijabilnosti uzrasta početka bolesti (Tabela 8.2.3). Dalje su za procenu očekivanog uzrasta početka bolesti korišćeni modeli 10\* i 11\*.

Za ispitivanje međuindividualne varijabilnosti uzrasta početka bolesti, standardizovani reziduali iz modela 10\* i 11\* poređeni su između bolesnika analiziranih u ovoj studiji (onih sa varijantnim ponovcima i iz kontrolne grupe opisane u poglavlju 3.1) i

referentne grupe (Morales et al., 2012) Wilcoxon-Mann-Whitney testom, nakon provere normalnosti distribucije Shapiro-Wilk testom. Rezidualna varijansa u modelu 10\* odražava individualne razlike u uzrastu početka bolesti koje nisu objašnjene dužinom progenitornog alela. Rezidualna varijansa u modelu 11\* odražava individualne razlike u uzrastu početka bolesti koje nisu objašnjene dužinom progenitornog alela i međuindividualnom varijabilnošću u somatskoj nestabilnosti prema modelu 8\*. Za procenu doprinosa međuindividualne varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti, standardizovani reziduali modela 11\* poređeni su sa standardizovanim rezidualima modela 10\* u svakoj grupi bolesnika Wilcoxon signed-rank testom.

Sve statističke analize urađene su u osnovnom statističkom paketu softverskog okruženja R ver 3.3.3 (R Development Core Team, 2016). Određene analize su izvršene za obe vremenske tačke uzorkovanja. U svim analizama, nivo statističke značajnosti definisan je pragom  $P < 0.05$  (dvosmerna P vrednost, eng. *two-tailed p value*).

## 4. Rezultati

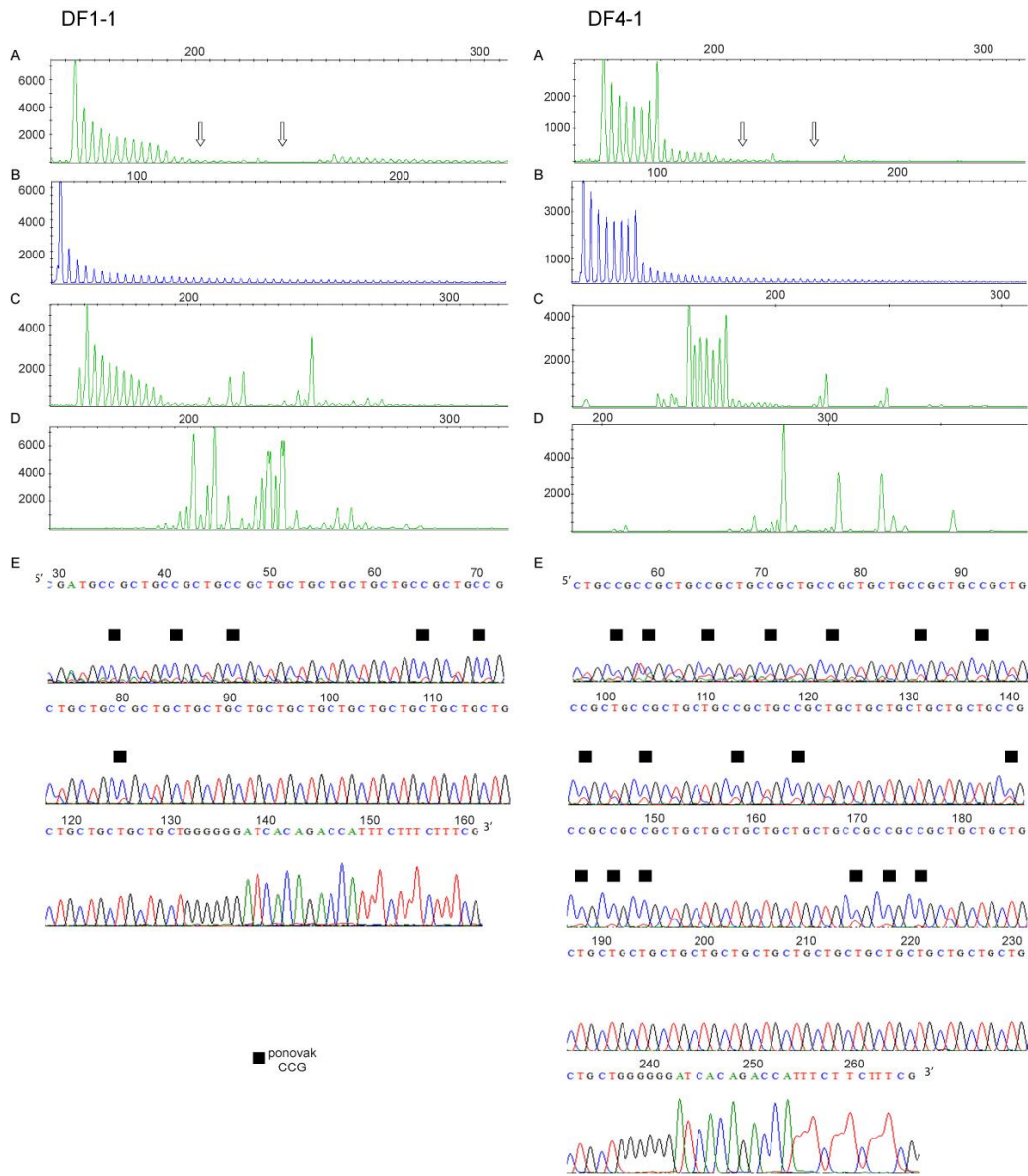
### 4.1. Strukture varijantnih ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija i opšte kliničke karakteristike bolesnika

DNK je uspešno izolovana iz uzoraka periferne krvi i bukalnih briseva ispitanika. Na nativnu formu izolovanih DNK, kao i korišćenih uzoraka iz DM1, FRAXA i HD banki DNK uzoraka Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, ukazivalo je prisustvo diskretne trake na 0,8% agaroznom gelu. Kvantifikacijom DNK fluorometrijskom metodom izmerena je koncentracija u opsegu od 10-100 ng/μl, što je bilo zadovoljavajuće za planirane molekularno-genetičke analize.

Pretraga krajeva *DMPK* ekspanzija nizvodnim RP-PCR-om otkrila je prisustvo varijantnih ponovaka na 3' kraju kod 9 od 243 ispitanih bolesnika (3,7%) iz 5 od 174 porodice sa DM1 (2,9%). Na 5' kraju *DMPK* ekspanzija nisu detektovani varijantni ponovci u ispitivanoj grupi.

#### 4.1.1. Porodica DF1

Porodica DF1 uključivala je majku (DF1-1) i dva sina (DF1-2 i DF1-3). Majka je imala kliničku dijagnozu DM1, dok su njeni sinovi ispoljavali atipičnu kliničku sliku, koju je odlikovalo odsustvo karakterističnih DM1 simptoma (perkusione miotonije, ptoze, katarakte i hipotrofije mišića). Iznenadujuće je bilo prisustvo hipertrofije listova, simptoma koji pre ukazuje na DM2. Međutim, i uzvodni i nizvodni RP-PCR potvrdili su prisustvo ekspanzije CTG ponovaka u genu *DMPK* (Slika 4.1), dok je DM2 mutacija isključena. Nizvodni RP-PCR profili odlikovali su se istovetnim neregularnostima kod sva tri člana porodice, koje su se ogledale u značajnim prazninama i padu intenziteta signala (Slika 4.1). S druge strane, umnožavanje sa 5' kraja dalo je lestvičast obrazac signala, očekivan za *DMPK* ekspanziju (Slika 4.1). RP-PCR analize upotrebom prajmera GC1\_CC ili GC1\_CCG (Tabela 3.1), ukazale su na verovatno prisustvo varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzije (Slika 4.1).



**Slika 4.1. Identifikacija varijantnih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama kod bolesnika DF1-1 i DF4-1.** (A) Praznine i padovi u intenzitetu signala (označeni strelicama) u nizvodnim RP-PCR profilima ukazali su na to da 3' kraj ekspanzija sadrži varijantne ponovke, koji sprečavaju uspešno vezivanje kliznog prajmera P4CTG-for, koji hibridizuje sa čistim CTG ponovcima. (B) Uzvodni RP-PCR profili bili su lestvičasti sa signalima udaljenim 3 bp i opadajućim intenzitetom sa povećanjem dužine umnoženog proizvoda. Ovakav profil nastaje usled hibridizacije prajmera P4CAG-rev za čiste nizove CTG ponovaka i ukazuje na odsustvo varijantnih ponovaka na 5' kraju. Specifični signali u RP-PCR profilima sa kliznim prajmerom GC1\_CC, koji detektuje pojedinačne CCG ponovke u nizu CTG ponovaka (C) i kliznim prajmerom GC1\_CCG, koji detektuje CCG ponovke u CCGCTG heksamerima (D), ukazali su na prisustvo CCG varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama. (E) Eektroforegrami sekvenci RP-PCR proizvoda, dobijenih korišćenjem kliznih prajmera GC1\_CC i GC1\_CCG i sekvenciranih prajmerom P2-rev, koji hibridizuje nizvodno od ponovaka. Prikazane su sekvence komplementarnog *antisense* lanca DNK, pri čemu su CCG prekidi označeni crnim kvadratima. Preklapajući signali na određenim pozicijama mogu se objasniti ograničenjima reakcije sekvenciranja i/ili somatskim mozaicizmom ekspanzija. Profili i sekvence drugih članova porodice DF1 (DF1-2 i DF1-3) bili su identični onima kod DF1-1.

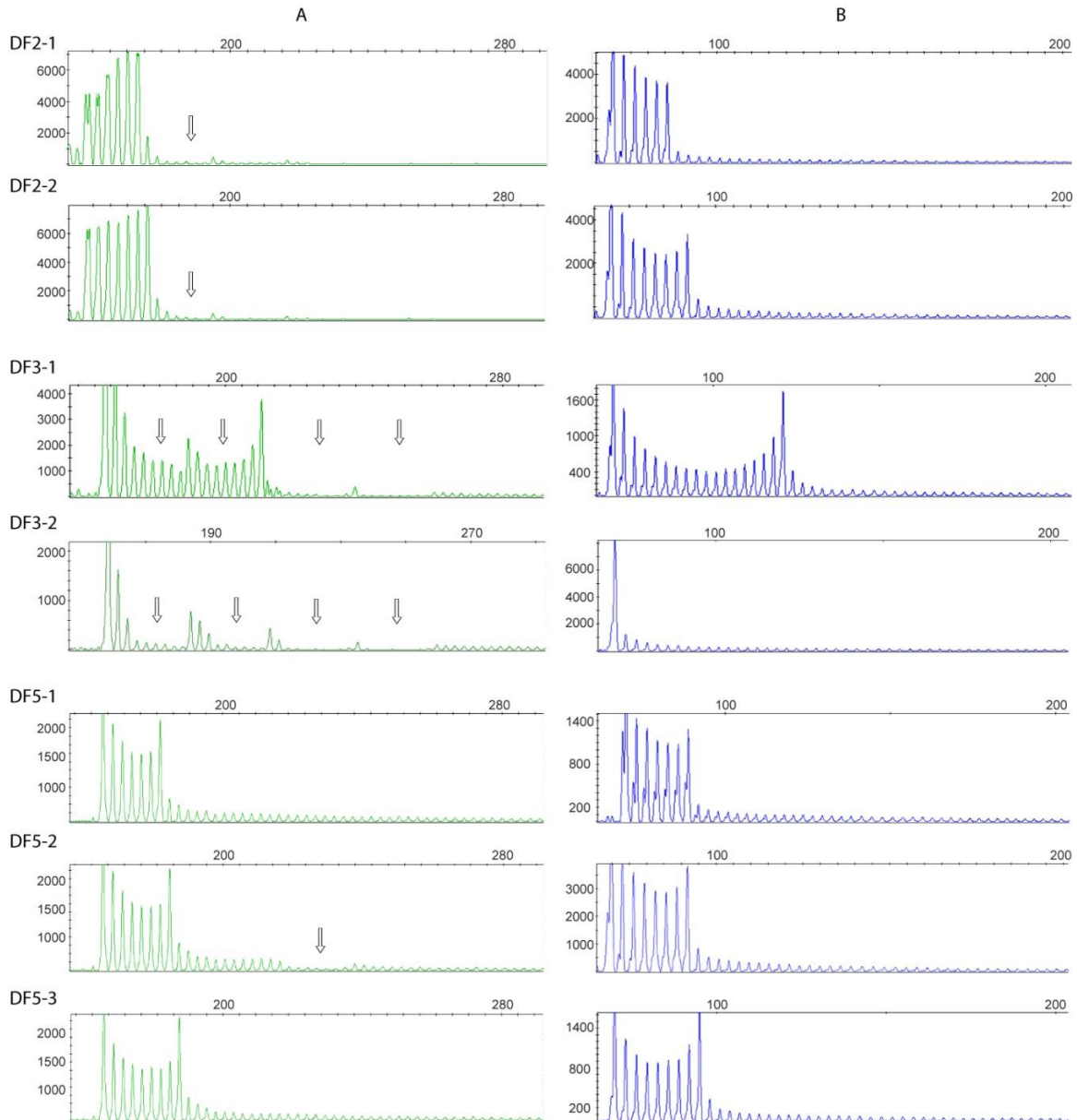


Sangerovo sekvenciranje RP-PCR proizvoda otkrilo je istovetan obrazac prekida kod sva tri člana porodice koji se odlikovao prisustvom CCGCTG heksamera:  $(CTG)_n(CCGCTG)_3(CTG)_4(CCGCTG)_2CTGCCG(CTG)_{17}$  (Slike 4.1 i 4.4). Veličine progenitornih alela kod DF1-1, DF1-2 i DF1-3, procenjene kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu, iznosile su ~520, ~350 i ~450 ponovaka, redom (Slika 4.5).

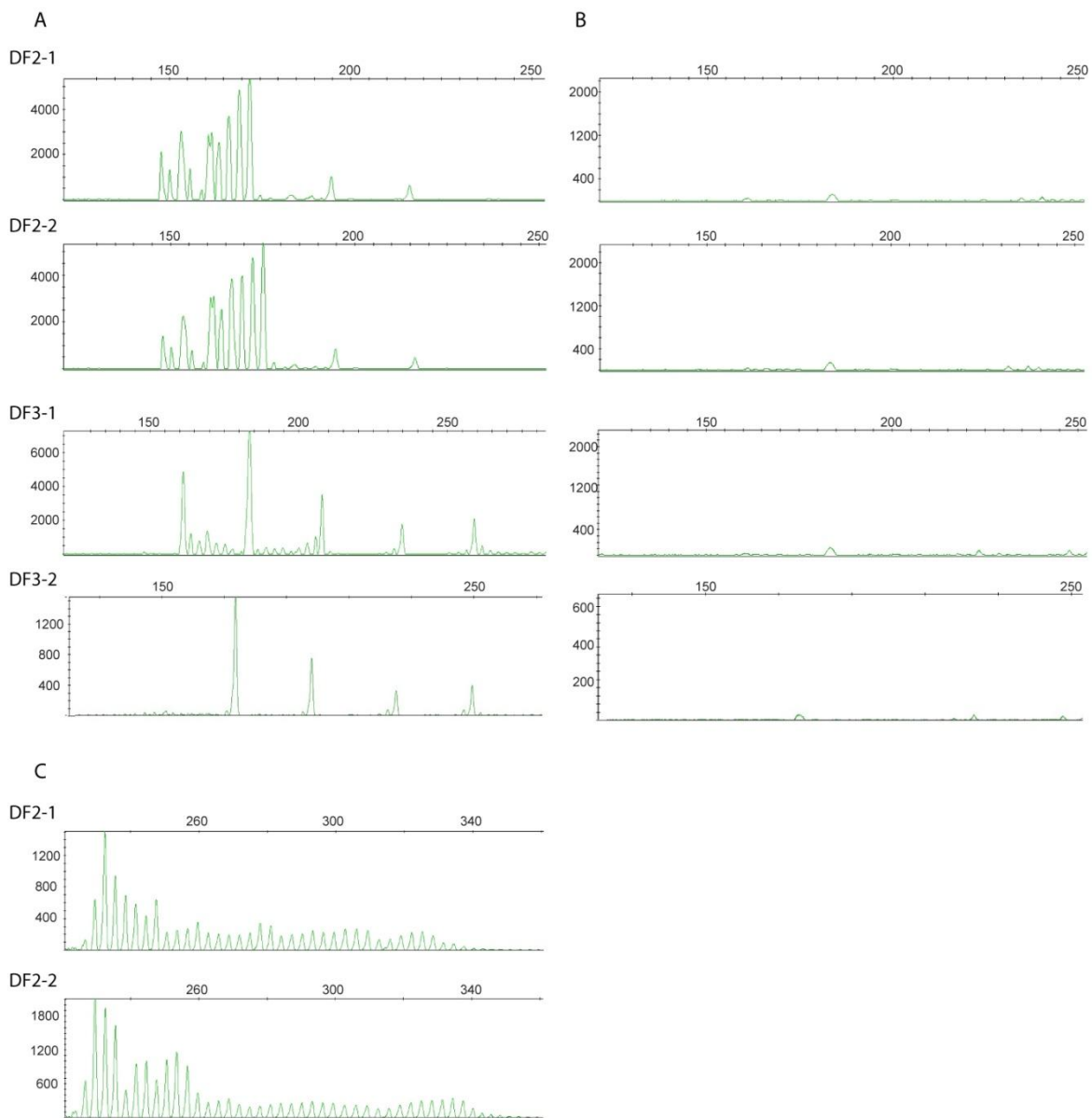
#### 4.1.2. Porodica DF2

U porodici DF2, sveukupna klinička prezentacija oca (DF2-1) ukazivala je na DM1, ali se odlikovala ponekim atipičnim simptomima, kao što su slična zahvaćenost proksimalnih i distalnih mišića, što je pre odlika DM2, i krilate lopatice. Njegova kćerka (DF2-2) je imala samo blagu semiptozu i blagu perkusiju mitoniju.

Nizvodni RP-PCR profili bili su identični kod DF2-1 i DF2-2 i odlikovali su se značajnim padom u intenzitetu signala i velikom prazninom, što je čak moglo navesti na lažno-negativan rezultat (Slika 4.2). Međutim, uzvodni RP-PCR je dao lestvičast obrazac signala tipičan za trinukleotidne ekspanzije. RP-PCR upotrebom prajmera GC1\_CC ukazao je na verovatno prisustvo pojedinačnih CCG prekida, dok je umnožavanje prajmerom GC1\_CCG bilo neuspešno (Slika 4.3). Sangerovim sekvenciranjem GC1\_CC PCR proizvoda utvrđen je sledeći obrazac prekida:  $(CTG)_nCCG(CTG)_7CCG(CTG)_{12}$  (Slika 4.4). Korišćenim protokolom za LR-PCR-bazirani Southern blot (Savic et al., 2002) umnožavanje *DMPK* ekspanzije u ovoj porodici je izostalo. Međutim, umnožavanje je bilo uspešno korišćenjem PCR-a optimizovanog za umnožavanje CGG ekspanzija u genu *FMRI* (Saluto et al., 2005), praćenog Southern blot hibridizacijom, i određene su dužine progenitornih alela od ~320 ponovaka kod oca (DF2-1) i ~200 ponovaka kod kćerke (DF2-2) (Slika 4.5).



**Slika 4.2. Uzvodni i nizvodni RP-PCR profili u porodicama DF2 (DF2-1 i DF2-2), DF3 (DF3-1 i DF3-2) i DF5 (DF5-1, DF5-2 i DF5-3). (A)** Praznine i padovi u intenzitetu signala (označeni strelicama), uočeni u nizvodnim RP-PCR profilima korišćenjem kliznog prajmera P4CTG-for koji hibridizuje sa čistim CTG ponovcima, ukazali su na prisustvo varijantnih ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija. U porodici DF2 značajni pad u intenzitetu signala sa velikom prazninom je čak mogao navesti na lažno-negativan rezultat. U porodici DF5, nepravilnosti u nizvodnom RP-PCR profilu uočene su samo kod bolesnika DF5-2, ukazujući na to da je kod ovog člana porodice varijantni ponovak nastao *de novo*. **(B)** Uzvodni RP-PCR korišćenjem kliznog prajmera P4CAG-rev, koji hibridizuje za čiste nizove CTG ponovaka, proizveo je lestvičaste profile, karakteristične za čiste nizove CTG ponovaka na 5' kraju.



**Slika 4.3. Nizvodni RP-PCR profili sa prajmerima specifičnim za detekciju CCG ponovaka u porodicama DF2 (DF2-1 i DF2-2) i DF3 (DF3-1 i DF3-2).** (A) RP-PCR profili sa kliznim prajmerom GC1\_CC, koji detektuje pojedinačne CCG ponovke u nizu CTG ponovaka, u porodicama DF2 (DF2-1 i DF2-2) i DF3 (DF3-1 i DF3-2) ukazali su na prisustvo pojedinačnih CCG ponovaka na 3' kraju ekspanzije. (B) RP-PCR profili sa kliznim prajmerom GC1\_CCG, koji detektuje CCG ponovke u CCGCTG heksamerima, pokazuju neuspešno vezivanje ovog prajmera, usled obrazaca prekida koji se nisu karakterisali prisustvom CCGCTG heksamera. (C) RP-PCR profili sa kliznim prajmerom P5CGG, koji hibridizuje sa čistim nizom od barem četiri CCG ponovka, odlikovali su se lestvičastim obrascem signala u porodici DF2 (DF2-1 i DF2-2), ukazujući na prisustvo dugog bloka CCG ponovaka na 3' kraju ekspanzije.

### 4.1.3. Porodica DF3

Porodica DF3 uključivala je majku (DF3-1) i kćerku (DF3-2). Prvi klinički pregled kod majke upućivao je na DM2, s obzirom na starosnu dob, zahvaćenost proksimalnih mišića nogu i blagu miotoniju. Kćerka je pokazivala samo blagu semiptozu i segmentnu hipotrofiju vastus medialis. Genetičko testiranje za DM2 je bilo negativno, dok je za DM1 pokazalo da se nizvodni RP-PCR profili odlikuju istovetnim neregularnostima kod oba člana porodice DF3, ukazujući na moguće prisustvo prekida na 3' kraju *DMPK* ekspanzije (Slika 4.2).

Korišćenjem prajmera GC1\_CC u RP-PCR-u ukazalo je na verovatno prisustvo pojedinačnih CCG prekida, dok je umnožavanje prajmerom GC1\_CCG bilo neuspešno (Slika 4.3). Sangerovim sekvenciranjem GC1\_CC PCR proizvoda utvrđeno je prisustvo kratkih CCG nizova i pojedinačnih CCG ponovaka rasutih na 3' kraju ekspanzije sa sledećim obrascem prekida  $(CTG)_n(CCG)_3(CTG)_6(CCG)_3(CTG)_7CCG(CTG)_8CCG(CTG)_8$  (Slika 4.4). Veličine progenitornih alela prema LR-PCR-baziranom Southern blotu iznosile su: ~240 ponovaka kod DF3-1 i ~180 ponovaka kod DF3-2 (Slika 4.5).

### 4.1.4. Bolesnik DF4-1

Još jedna varijantna *DMPK* ekspanzija otkrivena je kod ženskog indeks bolesnika DF4-1. Jedan od njenih simptoma bila je slična zahvaćenost proksimalnih i distalnih mišića, što je pre moglo ukazivati na DM2. Slično prethodno opisanim slučajevima, DM2 je genetički isključena, a nepravilnosti u nizvodnim RP-PCR profilima predstavljali su indicaciju za prisustvo prekida u *DMPK* ekspanziji (Slika 4.1). Korišćenje prajmera GC1\_CCG u RP-PCR-u ukazalo je na prisustvo CCG prekida u vidu CCGCTG heksamera na 3' kraju ekspanzije (Slika 4.1). Zaista, Sangerovim sekvenciranjem ovih PCR proizvoda potvrđeni su CCGCTG heksameri i detektovani kratki CCG blokovi na 3' kraju sa sledećim obrascem  $(CTG)_nCCG(CCGCTG)_4CTG(CCGCTG)_4CTG(CCGCTG)_2(CTG)_5(CCG)_4(CTG)_6(CCG)_3(CTG)_{20}$  (Slika 4.4). PCR-om optimizovanim za umnožavanje CGG ekspanzija u genu *FMRI* (Saluto et al., 2005) procenjena je veličina progenitornog alela od ~300 ponovaka (Slika 4.5).

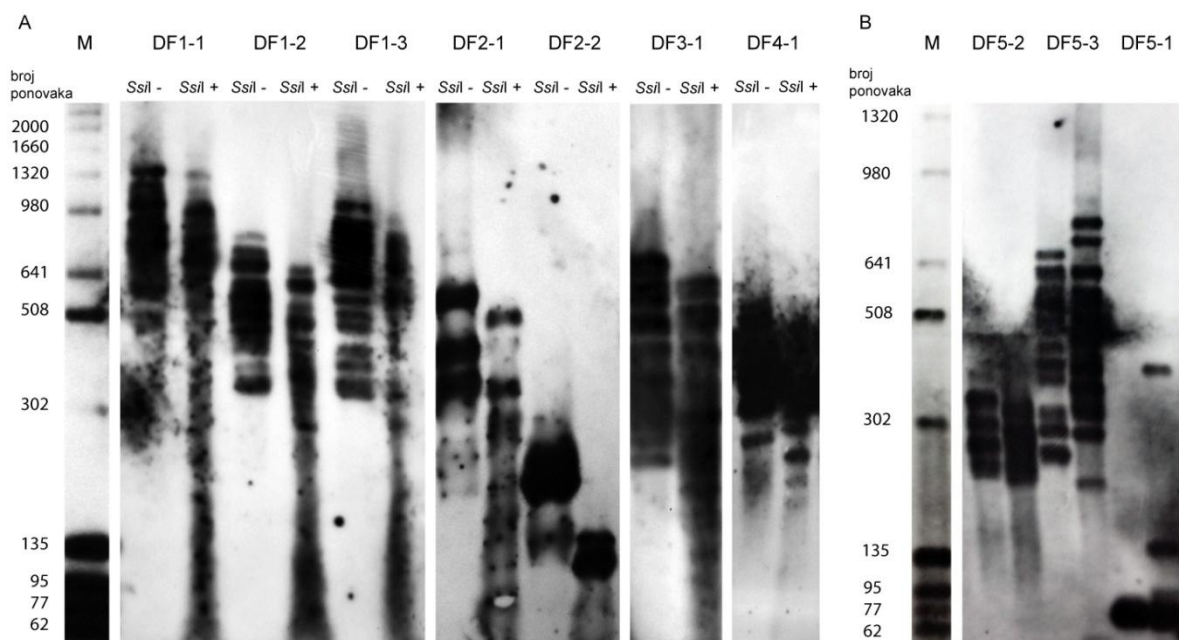
#### 4.1.5. Porodica DF5

U porodici DF5, koja je uključivala asimptomatskog oca (DF5-1) i dve kćerke (DF5-2 i DF5-3), *DMPK* ekspanzija potvrđena je kod sva tri člana uzvodnim RP-PCR-om, koji se odlikovao očekivanim lestvičastim obrascem signala. Nizvodni RP-PCR je rezultovao lestvičastim obrascem signala samo za bolesnike DF5-1 i DF5-3, dok se profil kod DF5-2 odlikovao neobičnim padom intenziteta nekoliko signala, ukazujući na prisustvo varijantnih ponovaka na 3' kraju (Slika 4.2). Nakon Sangerovog sekvenciranja nizvodnih RP-PCR proizvoda, identifikovan je jedan CTC ponovak ekspanzije sa obrascem  $(CTG)_nCTC(CTG)_{26}$  (Slika 4.4). S obzirom na to da su kod oca (DF5-1) i sestre (DF5-3) identifikovane čiste *DMPK* ekspanzije, zaključeno je da je CTC varijantni ponovak kod DF5-2 nastao *de novo*. LR-PCR-baziranim Southern blot-om pokazano je da DF5-1 poseduje protomutaciju (~80 ponovaka), dok su veličine progenitornih alela kod DF5-2 i DF5-3 bile ~250 i ~300 ponovaka, redom (Slika 4.5). Obe kćerke imale su sličan uzrast početka bolesti, ali se DF5-2 odlikovala pojedinim osobenostima koje nisu zapažene u kliničkoj slici kod DF5-3: potpuno normalna snaga sternokleidomastoidnog mišića i veoma blaga miotonija šake. Dodatne razlike u kliničkoj prezentaciji između sestara nisu primećene.



## **4.2. Strukture varijantnih CCG ponovaka uzvodno od 3' kraja *DMPK* ekspanzija**

Southern blot profili, nakon digestije LR-PCR proizvoda enzimom *SsiI*, karakterisali su se serijom diskretnih traka čiji je opseg veličina kod svih bolesnika bio pomećen ka kraćim alelima u poređenju sa opsegom veličina na Southern blot profilima bez restriktione digestije (Slika 4.5). Usled nedovoljne rezolucije 0,8% agaroznog gela, razlika u opsezima veličina za digerirane i nedigerirane LR-PCR proizvode nedvosmisleno je ukazivala na prisustvo dodatnih CCG prekida samo u porodici DF2, dok je kod drugih analiziranih bolesnika dodatno potvrdila prisustvo CCG ponovaka, prethodno identifikovanih na samom 3' kraju. Zaista, Sangerovo sekvenciranje cele ekspanzije bolesnika DF2-2 identifikovalo je kontinuirani niz od ~40 CCG ponovaka, pored dva pojedinačna CCG ponovaka na samom 3' kraju (Slika 4.4). Kako bi se proverilo prisustvo navedenog CCG bloka kod njenog oca (DF2-1), primenjen je RP-PCR sa kliznim prajmerom P5CCG. RP-PCR profili ukazali su na prisustvo bloka od ~36 CCG ponovaka kod DF2-1 i potvrdili postojanje bloka od ~40 CCG ponovaka kod DF2-2 (Slika 4.3). Iz dobijenih profila se dodatno moglo zaključiti da se oba CCG bloka nalaze na istom rastojanju od 3' kraja ekspanzije.



**Slika 4.5. LR-PCR-bazirani Southern blot za detekciju DMPK ekspanzija i varijantnih CCG ponovaka.** (A) Za porodice DF1 i DF2, i bolesnike DF3-1 i DF4-1 prikazane su po dve LR-PCR reakcije koje su urađene sa ~300 pg DNK, bez (-) i sa (+) digestijom LR-PCR proizvoda enzimom *Ssi*I. Restrikciono mesto enzima *Ssi*I je C↓CGC, tako da digestija LR-PCR proizvoda ukazuje na prisustvo CCG ponovaka. Kraći aleli u profilima digeriranih LR-PCR proizvoda u odnosu na nedigerirane potvrđuju prisustvo CCG ponovaka identifikovanih Sangerovim sekvenciranjem RP-PCR proizvoda, a kod porodice DF2 ukazuju na prisustvo dodatnih CCG ponovaka. (B) LR-PCR bazirana Southern blot analiza DMPK ekspanzija za porodicu DF5, u kojoj je kod osobe DF5-2 identifikovan *de novo* nastali varijantni CTC ponovak. Za svakog bolesnika porodice DF5 prikazane su dve reakcije koje su urađene sa ~300 pg i ~600 pg DNK. M - DNA Molecular Weight Marker X (Roche Life Science, Nemačka) prikazan u broju CTG ponovaka.



### **4.3. Mejotička nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija**

#### **4.3.1. Međugeneracijske promene veličine varijantnih *DMPK* ekspanzija u ispitivanim porodicama**

U ovoj studiji detektovana su četiri stabilna međugeneracijska prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija, dok povećanje broja ponovaka nije zabeleženo (Slike 4.4 i 4.5). Nedvosmisleno zaključivanje da li je reč o međugeneracijskom stabilnom prenošenju ili kontrakciji bilo je zamaskirano somatskim mozaicizmom varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi (Martorell et al., 1998).

Veličine progenitornih alela u porodici DF1 ukazale su na dva stabilna prenošenja varijantne *DMPK* ekspanzije sa majke DF1-1 (~520 ponovaka) na sinove: DF1-2 (~350 ponovaka) i DF1-3 (~450 ponovaka). Slično, u porodici DF3 zabeleženo je stabilno prenošenje varijantne *DMPK* ekspanzije sa majke DF3-1 (~240 ponovaka) na kćerku DF3-2 (~180 ponovaka). U porodici DF2 verovatnije je da je došlo do kontrakcije prilikom prenošenja sa oca DF2-1 (~320 ponovaka) na kćerku DF2-2 (~200 ponovaka). Sa druge strane, u porodici DF5 protomutacija sa čistim CTG ponovcima (~80 ponovaka) pretrpela je očekivanu ekspanziju prilikom prenošenja sa oca DF5-1 na kćerku DF5-2 sa *de novo* CTC varijantnim ponovkom (~250 ponovaka) i kćerku DF5-3 sa čistim CTG ponovcima (~300 ponovaka).

#### **4.3.2. Povezanost varijantnih ponovaka sa međugeneracijskom nestabilnošću *DMPK* ekspanzija**

U cilju ispitivanja povezanosti varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama i mejotičke nestabilnosti izvršeno je poređenje međugeneracijskih prenošenja varijantnih i čistih *DMPK* ekspanzija. Međugeneracijske promene u broju ponovaka u čistim *DMPK* ekspanzijama bile su dostupne za 66 parova roditelj-dete (112 bolesnika iz 44 porodice) iz baze podataka Centra za humanu molekularu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Većina međugeneracijskih prenošenja (61, 92.4%) odlikovala se povećanjem broja CTG ponovaka (ekspanzijama), dok su stabilna prenošenja ili kontrakcije detektovane

u svega pet (7,6%) slučajeva (četiri (12,1%) sa oca i samo jedno (3%) sa majke). Broj međugeneracijskih ekspanzija i kontrakcija bio je statistički značajno različit među DM1 bolesnicima sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama (Fišerov egzaktni test,  $p=1,4e^{-4}$ ). Imajući u vidu da su u ovoj studiji detektovane 4 međugeneracijske kontrakcije ili stabilna prenošenja i nijedna ekspanzija varijantnih *DMPK* alela, prethodno navedeni rezultat je bio indikacija za veću mejotičku stabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija.

S obzirom na mali broj međugeneracijskih prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija detekovanih u ovoj studiji, u cilju dobijanja verodostojnijeg rezultata urađeno je poređenje svih publikovanih podataka o međugeneracijskim prenošenjima varijantnih *DMPK* ekspanzija do 2018. godine i podataka o međugeneracijskim prenošenjima čistih *DMPK* ekspanzija. Među ukupno 20 opisanih međugeneracijskih prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija (14 sa majke i 6 sa oca) (Botta et al., 2017; Braida et al., 2010; Musova et al., 2009), uključujući i naše rezultate, primećeno je 14 (70%) kontrakcija ili stabilnih prenošenja, i to 5 (83,3%) sa oca i 9 (64,3%) sa majke (Tabela 3.1). Podaci o međugeneracijskim prenošenjima čistih *DMPK* ekspanzija iz ove studije sjedinjeni su sa podacima studije koja je analizirala mnogo veći broj međugeneracijskih prenošenja i u kojoj su zabeleženi slični podaci – procenjena učestalost stabilnih prenošenja ili kontrakcija bila je 6.4%, od čega je svega 1/4 bila preko majke (Ashizawa et al., 1994). Broj međugeneracijskih ekspanzija i kontrakcija bio je statistički značajno različit između grupe bolesnika sa i bez varijantnih ponovaka (Fišerov egzaktni test,  $p=1,337e^{-12}$ ) (Tabela 4.1), potvrđujući početni rezultat da su varijantne *DMPK* ekspanzije, u odnosu na čiste, stabilnije u polnim ćelijama.

### 4.3.3. Povezanost pola roditelja prenosioca i međugeneracijske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija

U tri od četiri međugeneracijska prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija u ovoj studiji roditelj prenosilac bila je majka (DF1-1 i DF3-1) sa adultnom formom DM1 i veličinom *DMPK* ekspanzije za koju se očekuje da u ženskim mejozama ima tendenciju ka daljoj ekspanziji (Ashizawa et al., 1994).

**Tabela 4.1.** Odnos međugeneracijskih ekspanzija/kontrakcija kod DM1 bolesnika sa i bez varijantnih ponovaka.

Referenca	Broj međugeneracijskih prenošenja	Ekspanzije		Kontrakcije ili stabilna prenošenja		Fišerov egzakti test (P vrednost)
		Sa oca	Sa majke	Sa oca	Sa majke	
Bolesnici sa varijantnim <i>DMPK</i> ekspanzijama						
Musova et al. (2009)	6	0	1	3	2	
Braida et al. (2010)	5	1	4	0	0	
Botta et al. (2017)	5	0	0	1	4	
Ova studija	4	0	0	1	3	
Ukupno	20	1	5	5	9	0.61
		6 (30%)		14 (70%)		<b>1,337e<sup>-12</sup></b>
Bolesnici sa čistim <i>DMPK</i> ekspanzijama						
Ashizawa et al. (1994)	1489	677	717	76	19	
Ova studija	66	29	32	4	1	
Ukupno	1555	706	749	80	20	<b>4.093e<sup>-10</sup></b>
		1455 (93,6%)		100 (6,4%)		

Ovo zapažanje je bilo indikacija da se ispita povezanost pola roditelja i prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija. Analiza na objedinjenim podacima ove studije i studija publikovanih do 2018. godine (Botta et al., 2017; Braida et al., 2010; Musova et al., 2009) pokazala je da međugeneracijsko prenošenje varijantnih *DMPK* ekspanzija nije zavisno od pola roditelja prenosioca (Fišerov egzaktni test,  $p=0,61$ ) (Tabela 4.1). Sa druge strane, na objedinjenim podacima pokazano je da je pol roditelja prenosioca bio statistički značajan u prenošenjima čistih *DMPK* alela, pri čemu su, očekivano, kontrakcije bile češće u prenošenjima preko oca (10,2%) u odnosu na prenošenja preko majke (2,6%) (Fišerov egzaktni test,  $p=4,093e^{-10}$ ) (Tabela 4.1). Za primetiti je da bi nevedeni rezultat mogao biti posledica češćeg stabilnog prenošenja ili kontrakcija varijantnih u odnosu na čiste *DMPK* ekspanzije u ženskim mejozama (64% za varijantne naspram 20% za čiste *DMPK* ekspanzije), dok u muškim mejozama to nije bio slučaj (36% za varijantne naspram 80% za čiste *DMPK* ekspanzija). Navedeni rezultat ukazuje na to da je stabilizujući efekat varijantnih ponovaka na *DMPK* lokus izraženiji u ženskim polnim ćelijama.

Intrigantna je činjenica da je, uprkos stabilnim međugeneracijskim prenošenjima ili čak kontrakcijama varijantnih *DMPK* ekspanzija, zabeležen raniji uzrast početka bolesti kod dece u porodicama DF1, DF2 i DF3.

#### **4.4. Mitotička nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija**

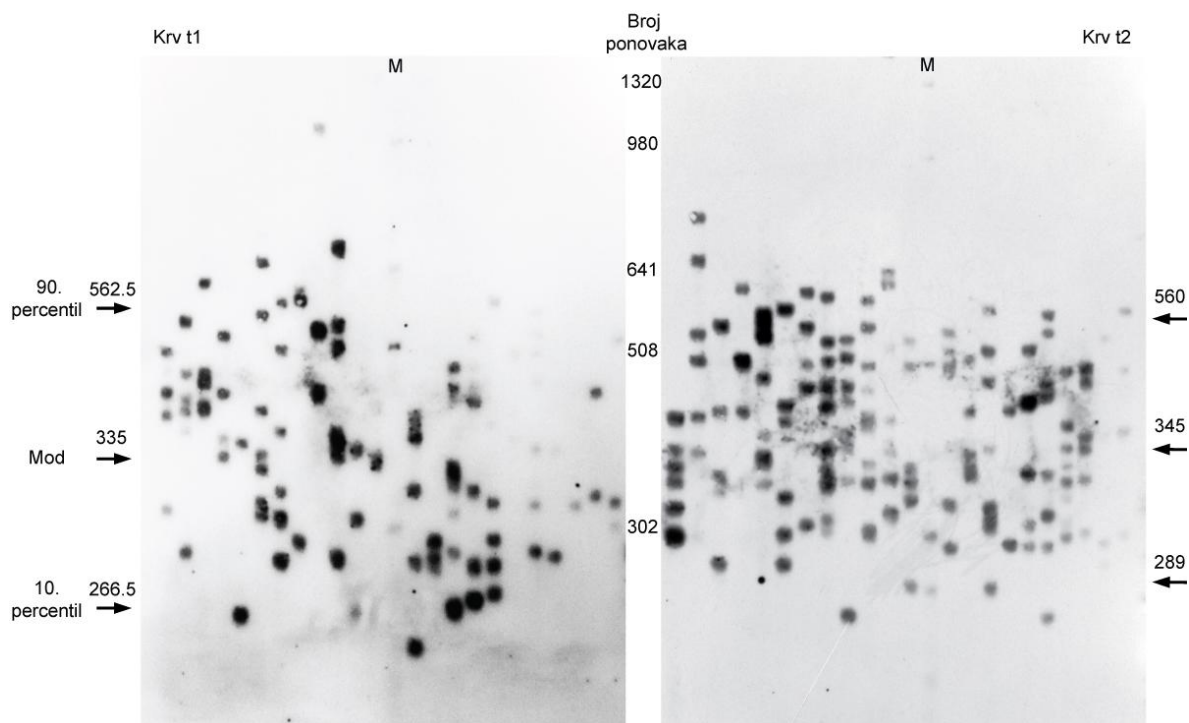
LR-PCR analiza varijantnih *DMPK* ekspanzija pokazala je heterogenost veličine alela u ćelijama krvi. Pažnju je skrenuo zapažen manji nivo somatskog mozaicizma kod bolesnice sa *de novo* nastalim CTC prekidom (DF5-2) u poređenju sa sestrom koja je nosilac čiste *DMPK* ekspanzije (DF5-3), uprkos sličnoj starosnoj dobi i sličnoj veličini njihovih progenitornih alela (Slika 4.5). S tim u vezi, u ovoj studiji urađena je karakterizacija somatskog mozaicizma varijantnih *DMPK* ekspanzija.

##### **4.4.1. Kvantifikacija somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija**

Preduslov za ispitivanje somatskog mozaicizma varijantnih *DMPK* ekspanzija bila je detaljna kvantifikacija somatske nestabilnosti primenom *single-molecule* SP-PCR-a. U ovoj studiji ukupno je umnožen 5701 alel, sa preko 200 alela po svakom analiziranom uzorku (kompletan set podataka dat je u Tabeli 8.2.4). Ukupno je umnoženo 4572 alela iz uzoraka krvi šest bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama (DF1-1, DF1-2, DF1-3, D2-1, DF3-1 i DF5-2) i četiri bolesnika sa čistim ekspanzijama iz dveju vremenskih tačaka, i jednog bolesnika sa varijantnom ekspanzijom (DF3-2) iz jedne vremenske tačke (Tabela 4.2). Dodatnih 1129 alela umnoženo je iz uzoraka bukalne sluznice četiri bolesnika sa varijantnim ponovcima (DF1-1, DF1-2, DF1-3 i DF5-2) i jednog sa čistim CTG ponovcima (DF5-3). Reprezentativan Southern blot, dobijen nakon detekcije *single-molecule* SP-PCR proizvoda, prikazan je na slici 4.6.

*Single-molecule* SP-PCR omogućio je objektivniji uvid u nivo somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija, koja je izražena kao razlika u broju ponovaka između 10. i 90. percentila distribucije učestalosti alela, kao i objektivnu procenu dužine progenitornog alela, koja je izražena kao 10. percentil distribucije učestalosti alela (Higham, 2013). U poređenju sa LR-PCR-om, procenjene dužine progenitornog alela bile su slične kod svih ispitivanih bolesnika, dok je uvid u nivo somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija bio detaljniji (Tabela 4.2).

DF3-1



**Slika 4.6. Single-molecule SP-PCR analiza DMPK ekspanzija sa varijantnim ponovcima.** Analiza uzorka krvi bolesnika DF3-1, pri uzrastu od 50 godina (prva vremenska tačka, krv t1) i 52,5 godine (druga vremenska tačka, krv t2), pokazuje heterogenost u veličini alela (somatski mozaicizam). U svaki bunar agaroznog gela (dužine 24 cm) naneti su PCR proizvodi dobijeni umnožavanjem ~30-60 pg DNK (5 do 10 genomskih ekvivalenata). Strelice sa brojevima ukazuju na poziciju i veličinu moda, 10. i 90. percentila distribucije dužine alela dobijene na osnovu više od 200 analiziranih alela po uzorku. M - DNA Molecular Weight Marker X (Roche Life Science, Nemačka). Dužine DMPK alela i standarda za veličinu izražene su u broju CTG ponovaka.

**Tabela 4.2.** Molekularno-genetičke karakteristike DM1 bolesnika analiziranih *single-molecule* SP-PCR-om, uzrast početka bolesti i uzrast uzorkovanja.

ID bolesnika	Pol	Struktura <i>DMPK</i> eskpanzija	AO	PAL	AS t1	10 <sup>th</sup> t1	AS t2	10 <sup>th</sup> t2	Opseg (LR-PCR)	Opseg t1 (s.m. SP-PCR)	Opseg t2 (s.m. SP-PCR)
DF1-1	Ž		39,5	520	61,5	459	65,5	443	520-1250	459-920	443-979
DF1-2	M	(CTG) <sub>n</sub> (CCGCTG) <sub>3</sub> (CTG) <sub>4</sub>	30,5	350	34,5	348	38,5	384	350-730	348-608	384-670
DF1-3	M	(CCGCTG) <sub>2</sub> CTGCCG(CTG) <sub>17</sub>	15,5	450	35,5	441	39,5	469	450-970	441-840	469-941
DF2-1	M	(CTG) <sub>n</sub> (CCG) <sub>36</sub> (CTG) <sub>n</sub> CCG(CTG) <sub>7</sub> CCG(CTG) <sub>12</sub>	40,5	320	45,5	371	48	350	320-600	371-697	350-688
DF3-1	Ž	(CTG) <sub>n</sub> (CCG) <sub>3</sub> (CTG) <sub>6</sub> (CCG) <sub>3</sub>	45,5	240	50	266,5	52,5	289	240-700	266,5-526,5	289-560
DF3-2	Ž	(CTG) <sub>7</sub> CCG(CTG) <sub>8</sub> CCG(CTG) <sub>8</sub>	31,5	180	NA	NA	31,5	187	180-280	NA	187-285
DF5-2	Ž	(CTG) <sub>n</sub> CTC(CTG) <sub>26</sub>	22,5	250	26,5	235	30,5	262	250-350	235-337	262-420
DF5-3*	Ž		21,5	300	23,5	314	27,5	422	300-620	314-587	422-758
MD70*	Ž		35,5	90	50,5	106	61,5	146	90-300	106-259	146-421
MD179*	Ž	perfektni (CTG) <sub>n</sub> niz	13,5	310	14,5	326	23	415	310-570	326-522	415-688
MD180*	Ž		14,5	430	22,5	400	30,5	462	430-900	400-785	462-1062

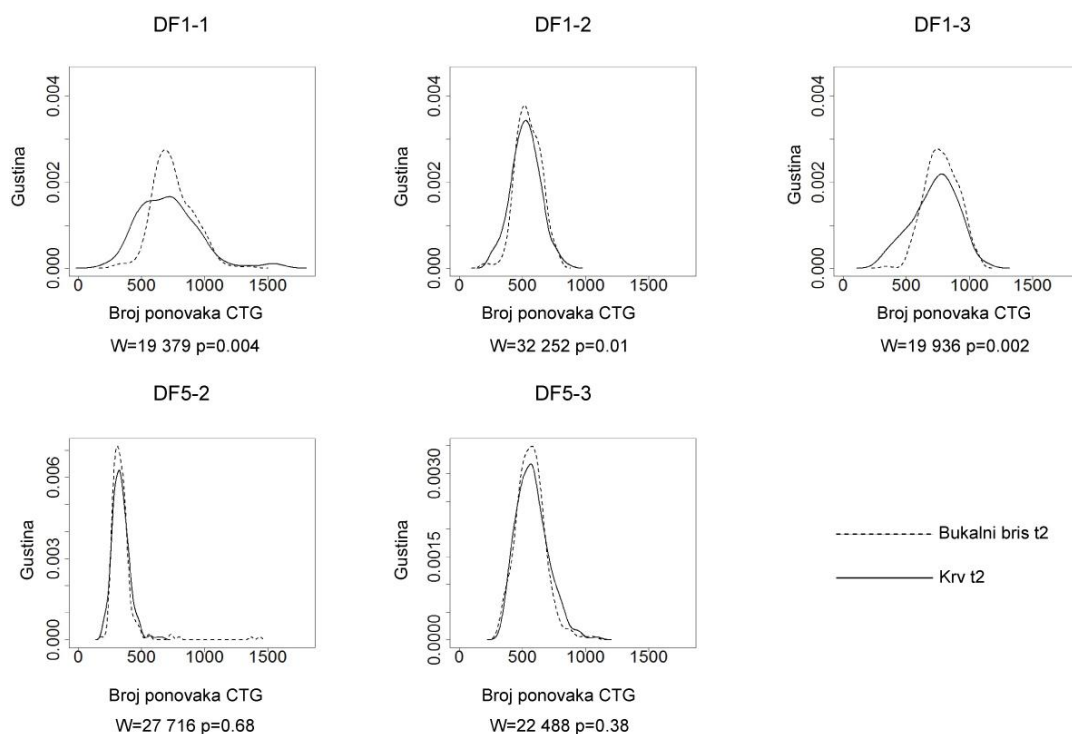
AO – uzrast početka bolesti (saopšten od strane bolesnika u godinama); PAL – dužina progenitornog alela u broju ponovaka; AS – uzrast uzorkovanja u godinama; 10<sup>th</sup> – 10. percentil dužine alela u broju ponovaka; t1 i t2 – prva i druga vremenska tačka uzorkovanja, redom; \* – kontrola grupa; M/Ž – muški/ženski pol; NA – nedostupan podatak.

PAL je procenjen u vremenskoj tački t1 kao oštra donja granica opsega eskpanzije (Monckton et al., 1995) korišćenjem LR-PCR-a sa ~300 pg DNK. Isti bolesnici su zatim analizirani *single-molecule* SP-PCR-om u dvema vremenskim tačkama, na osnovu kojeg je procenjen 10. percentil distribucije učestalosti alela kao objektivnija mera dužine progenitornog alela (Higham, 2013).

Zapažen opseg veličine eskpanzije procenjen je kao donja i gornja oštra granica opsega eskpanzije korišćenjem LR-PCR-a sa ~300 pg DNK, odnosno kao 10. i 90. percentil distribucije učestalosti alela nakon kvantifikacije somatske nestabilnosti *single-molecule* SP-PCR-om.

#### 4.4.2. Tkivna specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija

Distribucije učestalosti mutiranih *DMPK* alela svih analiziranih uzoraka bile su nagnute ka dužim alelima. Poređenje distribucija učestalosti alela između ćelija krvi i bukalne sluznice pokazalo je statistički značajnu razliku kod članova porodice DF1 koji nose kratke nizove CCGCTG heksamera (Wilcoxon-Mann-Whitney test, majka DF1-1:  $W=19\ 379$ ,  $p=0.004$ ; sin DF1-2:  $W=32\ 252$ ,  $p=0.01$ ; sin DF1-3:  $W=19\ 936$ ,  $p=0.002$ ) (Slika 4.7). U odnosu na ćelije krvi, ćelije bukalne sluznice odlikovale su se većom dužinom progenitornog alela za 50-150 ponovaka, dok je nivo somatske nestabilnosti bio niži (Slika 4.7, Tabela 4.3).



#### Slika 4.7. Tkivno-specifična somatska nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija.

Grafici gustine pokazuju nagnutost distribucija učestalosti alela ka dužim alelima u ćelijama krvi (pune linije) i bukalne sluznice (isprekidane linije), uzorkovanim u istoj vremenskoj tački ( $t_2$ ). Sve distribucije učestalosti alela dobijene su na osnovu određivanja veličine barem 200 alela, a njihova poređenja su izvršena Wilcoxon-Mann-Whitney testom (prikazane su vrednosti  $W$  i  $p$ ). Članovi porodice DF1, koji nose identične obrasce CCG prekida, pokazali su razliku u distribucijama učestalosti alela između ispitivanih tkiva. Članovi porodice DF5, od kojih DF5-2 ima jedan *de novo* CTC prekid, dok DF5-3 ima čistu *DMPK* ekspanziju, nisu pokazali razliku u distribucijama učestalosti alela između ispitivanih tkiva.



Bolesnica DF5-2, koja nosi jedan *de novo* nastali CTC prekid, nije pokazala statistički značajnu razliku u distribuciji učestalosti alela između ćelija krvi i bukalne sluznice (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $W=27\ 716$ ,  $p=0.68$ ) (Slika 4.7, Tabela 4.3). Sličan rezultat je dobijen za njenu sestru (DF5-3) sa čistom *DMPK* ekspanzijom (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $W=22\ 488$ ,  $p=0.38$ ) (Slika 4.7, Tabela 4.3). Dobijeni rezultati ukazuju na to da se varijantne *DMPK* ekspanzije odlikuju heterogenošću dužine alela koja je sklona daljim ekspanzijama u ispitivanim somatskim ćelijama. Takođe, tip i struktura prekida, kao i dodatni faktori specifični za ispitivane porodice utiču na tkivnu specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija.

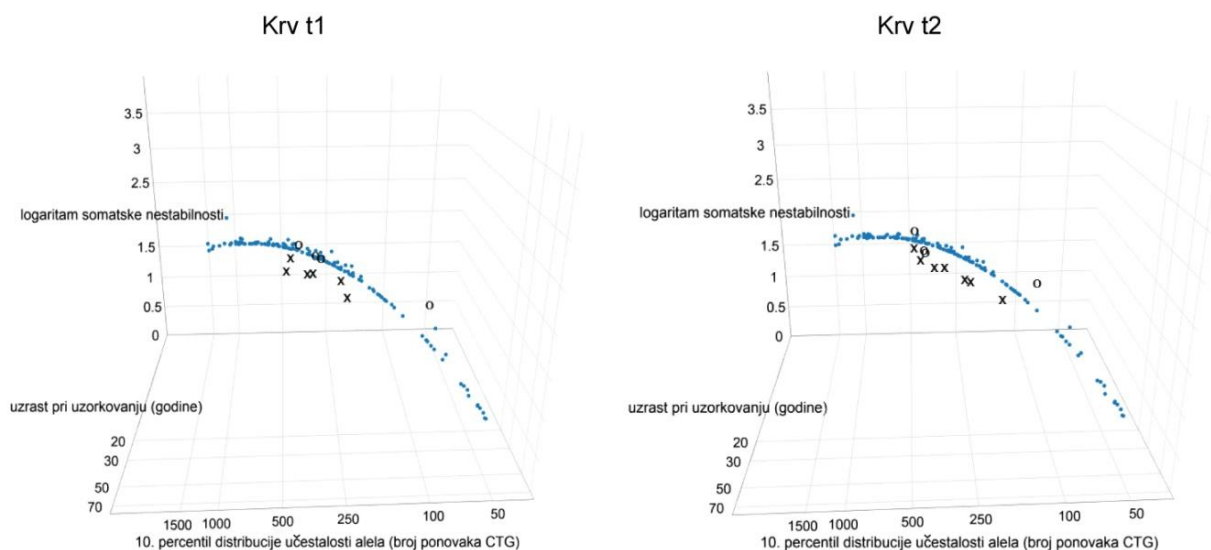
#### **4.4.3. Povezanost varijantnih ponovaka sa somatskom nestabilnošću *DMPK* ekspanzija**

Svi bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama imali su niži nivo zapažene somatske nestabilnosti od očekivanog prema modelu linearne regresije 8\*, koji somatsku nestabilnost koreliše sa dužinom progenitornog alela i uzrastom uzorkovanja (Slika 4.8, Tabela 4.3). Ova razlika je bila statistički značajna (Wilcoxon signed-rank test, prva vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0.03$ ; druga vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0.016$ ). Sa druge strane, nije uočena statistički značajna razlika između zapaženih i očekivanih nivoa somatske nestabilnosti u referentnoj grupi (Wilcoxon signed-rank test,  $V=5132$ ,  $p=0.18$ ), kao ni u kontrolnoj grupi (Wilcoxon signed-rank test,  $V=7$ ,  $p=0.625$  za obe vremenske tačke) (Slika 4.8, Tabela 4.3). Zanimljivo je da se bolesnica sa jednim *de novo* nastalim CTC prekidom (DF5-2) odlikovala nižim nivoom zapažene somatske nestabilnosti od očekivane u obema vremenskim tačkama, za razliku od njene sestre (DF5-3) sa sličnom veličinom ekspanzije i sličnim uzrastom uzorkovanja, ali bez prekida (Slika 4.9, Tabela 4.3), što je potvrdilo početno zapaženje nakon LR-PCR analize kod ova dva bolesnika. Ovi rezultati ukazuju na to da su varijantne *DMPK* ekspanzije stabilnije u odnosu na ekspanzije sa čistim CTG ponovcima u ćelijama krvi, kao i da se ova osobina održava tokom vremena.

**Tabela 4.3.** Zapažene i očekivane vrednosti nivoa somatske nestabilnosti varijantnih i čistih *DMPK* ekspanzija u uzorcima krvi u dvema vremenskim tačkama i zapažene vrednosti nivoa somatske nestabilnosti u uzorcima bukalne sluznice.

ID bolesnika	Krv t1						Krv t2						Bukalni bris t2				
	AS	M	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	SI	E*	AS	M	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	SI	E*	AS	M	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	SI
DF1-1	61,5	670	459	920	461	842	65,5	701	443	979	536	873	65,5	732	581	975	394
DF1-2	34,5	454	348	608	260	407	38,5	527	384	670	286	483	38,5	543	433	678	245
DF1-3	35,5	684	441	840	399	505	39,5	745	469	941	472	571	39,5	786	609	950	341
DF2-1	45,5	492	371	697	326	539	48	472	350	688	338	530	48	NA	NA	NA	NA
DF3-1	50	384	266,5	562,5	296	394	52,5	394	289	560	271	455	52,5	NA	NA	NA	NA
DF3-2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,5	222	187	285	98	157	31,5	NA	NA	NA	NA
DF5-2	26,5	283	235	337	102	209	30,5	330	262	420	158	265	30,5	326	269	401	132
DF5-3*	23,5	454	314	587	273	282	27,5	568	422	758	336	403	27,5	560	420	701	281
MD70*	50,5	168	106	259	153	58	61,5	219	146	421	275	148	61,5	NA	NA	NA	NA
MD179*	14,5	427	326	522	196	226	23	546	415	688	273	353	23	NA	NA	NA	NA
MD180*	22,5	611	400	785	385	341	30,5	785	462	1062	600	460	30,5	NA	NA	NA	NA

t1 i t2 – prva i druga vremenska tačka, redom; AS – uzrast uzorkovanja u godinama; M, 10<sup>th</sup> i 90<sup>th</sup> – medijana, 10. percentil i 90. percentil dužine alela izvedeni iz više od 200 alela po uzorku; SI – zapaženi nivo somatske nestabilnosti određen kao razlika u broju ponovaka između 10. i 90. percentila dužine alela; E\* – očekivani nivo somatske nestabilnosti u skladu sa modelom linearne regresije 8\* (Tabela 8.2.1) koji pokazuje korelaciju nivoa somatske nestabilnosti, 10. percentila dužine alela i uzrasta uzorkovanja; \* – kontrola grupa; NA – nedostupan podatak.



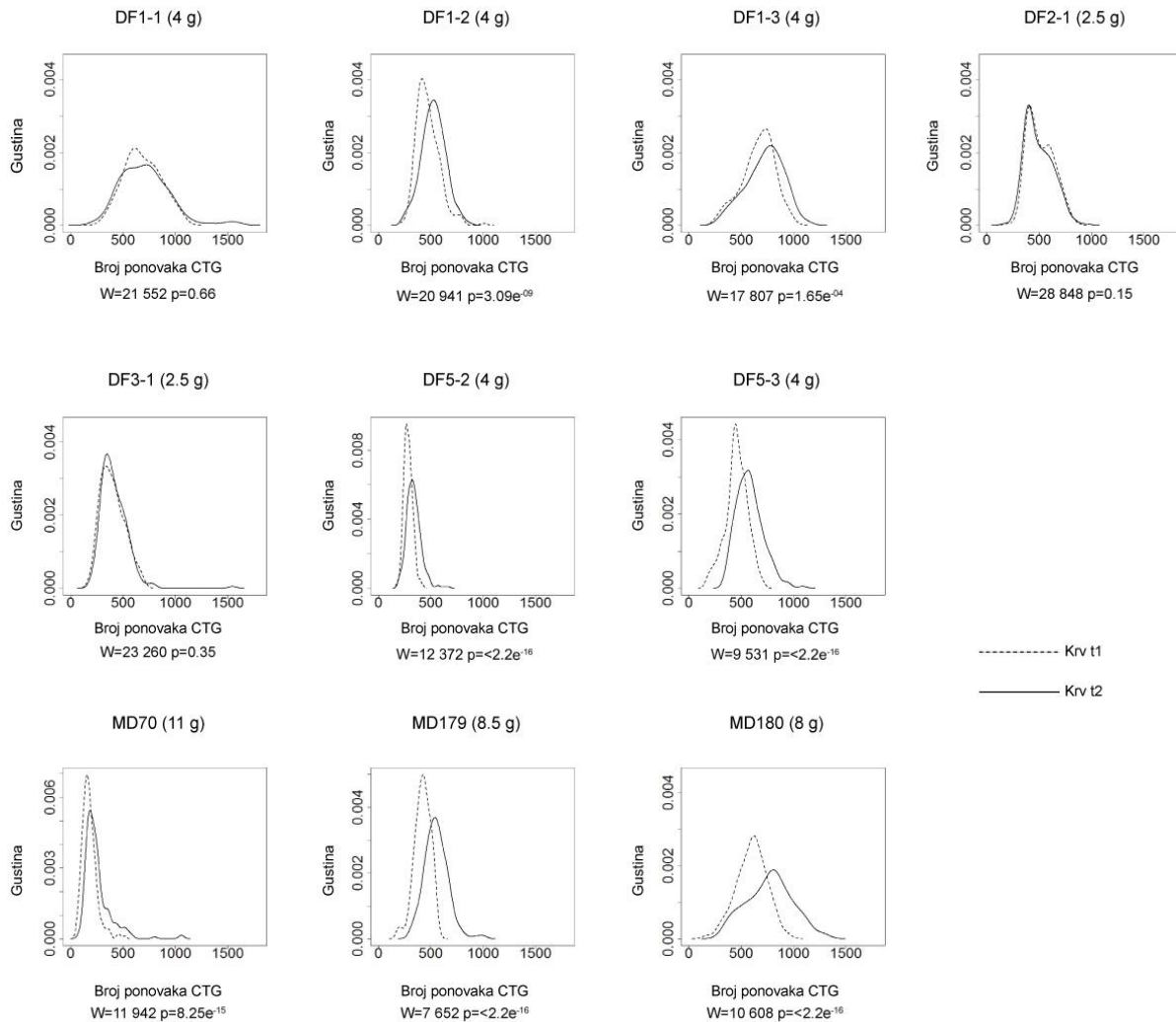
**Slika 4.8. DM1 bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikuju se nižim nivoom somatske nestabilnosti u ćelijama krvi u odnosu na bolesnike sa čistim ekspanzijama.** Grafici predstavljaju korelaciju nivoa somatske nestabilnosti (eng. *somatic instability*, SI), 10. percentila dužine alela (eng. *the 10th percentile*, 10thp) kao mere za dužinu progenitornog alela (Higham, 2013), i uzrasta uzorkovanja (eng. *age at sampling*, AS) prema modelu 8\*. Analizirana grupa DM1 bolesnika uključila je bolesnike sa varijantnim ekspanzijama i bolesnike sa čistim ekspanzijama (kontrolna grupa) iz ove studije, kao i 136 bolesnika iz referentne grupe (Morales et al., 2012). Zabeležen nivo SI u krvi procenjen je kao opseg između 10. i 90. percentila distribucije učestalosti alela (Morales et al., 2012). Bolesnici sa varijantnim ekspanzijama prikazani su slovom X, a kontrolna grupa slovom O, u prvoj (krv t1) i drugoj vremenskoj tački (krv t2) (2,5-4 godine kasnije za bolesnike sa varijantnim ekspanzijama i 4-11 godina kasnije za kontrolnu grupu). Bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se većom rezidualnom varijansom, i medijana njihovih standardizovanih reziduala SI bila je statistički značajno niža u poređenju sa referentnom grupom. Kontrolna grupa nije pokazala razliku.

Bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se većom rezidualnom varijansom somatske nestabilnosti prema modelu 8\* (Tabela 8.2.1), koja predstavlja meru za individualno-specifičnu somatsku nestabilnost koja se ne objašnjava dužinom progenitornog alela i uzrastom uzorkovanja. Njihovi standardizovani reziduali imali su negativan predznak. Medijana standardizovanih reziduala bila je statistički značajno niža kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama u poređenju sa referentnom grupom (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=727$ ,  $p=1,2e^{-3}$ ; druga vremenska tačka:  $W=864$ ,  $p=2,8e^{-4}$ ) (Slika 4.8).

Suprotno, medijana standardizovanih reziduala somatske nestabilnosti u kontrolnoj grupi nije se statistički značajno razlikovala od medijane u referentnoj grupi (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=221$ ,  $p=0,53$ ; druga vremenska tačka:  $W=253$ ,  $p=0,82$ ) (Slika 4.8). S obzirom na to da su prekidi u *DMPK* ekspanziji zajednički genetički faktor za bolesnike koji pokazuju veće međuindividualne razlike u nivou somatske nestabilnosti (sa negativnim standardizovanim rezidualima), ovi rezultati ukazuju na to da varijantni ponovci u *DMPK* ekspanziji mogu biti individualno-specifični faktori sa značajnim doprinosom smanjenom nivou mitotičke nestabilnosti kod DM1 bolesnika.

#### **4.4.4. Somatska nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija tokom vremena**

Poređenjem distribucija učestalosti alela u ćelijama krvi iz dveju vremenskih tačaka tokom intervala od 2,5-4 godine nije uočena statistički značajna promena kod bolesnika DF1-1, DF2-1 i DF3-1 (Slika 4.9, Tabela 4.4), ukazujući na relativnu stabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija tokom vremena. Sa druge strane, zapažen je statistički značajan pomeraj u distribuciji ka većim dužinama alela kod bolesnika DF1-2, DF1-3 i DF5-2 (Slika 4.9, Tabela 4.4), ukazujući na to da je nivo somatske nestabilnosti kod ovih bolesnika bio dovoljan da dovede do pomeraja distribucije učestalosti alela ka većim ekspanzijama. Kao što se i očekivalo, kod kontrolne grupe je zapažen statistički značajan pomeraj u distribucijama ka većim dužinama alela tokom vremenskog intervala od 4-11 godina (Slika 4.9, Tabela 4.4).



**Slika 4.9. Somatska nestabilnost *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi tokom vremena.**

Grafici gustine pokazuju distribucije učestalosti *DMPK* alela u ćelijama krvi u prvoj vremenskoj tački (t1, isprekidane linije) i drugoj vremenskoj tački (t2, pune linije). Sve distribucije učestalosti alela dobijene su na osnovu određivanja veličine barem 200 alela, a njihova poređenja su izvršena Wilcoxon-Mann-Whitney testom (prikazane su vrednosti W i p). Među bolesnicima sa varijantnim ponovcima, DF1-1, DF2-1 i DF3-1 nisu pokazali razliku u distribucijama učestalosti alela tokom ispitivanog vremenskog intervala, dok su DF1-2, DF1-3, DF3-2 i DF5-2 pokazali statistički značajnu razliku. Kao što je očekivano, bolesnici sa čistim ekspanzijama (DF5-3 – sestra DF5-2, MD70, MD179 i MD180), pokazali su statistički značajnu razliku u distribucijama učestalosti alela tokom ispitivanog vremenskog intervala. Vremenski interval u godinama (g) između uzorkovanja u tačkama t1 i t2 naznačen je u zagradama, pored identifikacionog broja bolesnika.

**Tabela 4.4.** Poređenje distribucija učestalosti alela kod bolesnika sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama dobijenih iz uzoraka krvi u dvema vremenskim tačkama, i zapaženih i očekivanih promena veličine ekspanzije tokom vremena.

ID bolesnika	Mod t1	Mod t2	Mod (5' kraj) t1	Mod (5' kraj) t2	Wilcoxon-Mann-Whitney test		Vreme između dva uzorkovanja (godine)	Zapaženo povećanje	Očekivano povećanje	Očekivano povećanje (5' kraj)	Wilcoxon signed-rank test	
					W	P vrednost					V	P vrednost
DF1-1	612	720	577	685	21 552	0,66	4	108	147	142		
DF1-2	417	527	382	492	20 941	<b>3,09e<sup>-09</sup></b>	4	110	119	114		
DF1-3	732	779	697	744	17 807	<b>1,65e<sup>-04</sup></b>	4	47	165	160		
DF2-1	410	401	325	316	28 848	0,15	2,5	-9	62	50	0	<b>0,02</b>
DF3-1	335	345	296	306	23 260	0,35	2,5	10	51	46		
DF5-2	267	324	238	295	12 372	<b>&lt;2,2e<sup>-16</sup></b>	4	57	97	93		
DF5-3*	445	565	445	565	9 531	<b>&lt;2,2e<sup>-16</sup></b>	4	120	123	123		
MD70*	158	186	158	186	11 492	<b>8,25e<sup>-15</sup></b>	11	28	340	340	0	0,125
MD179*	427	540	427	540	7 652	<b>&lt;2,2e<sup>-16</sup></b>	8,5	113	287	287		
MD180*	622	806	622	806	10 608	<b>&lt;2,2e<sup>-16</sup></b>	8	184	297	297		

Mod – modalna dužina alela u broju ponovaka; t1 i t2 – prva i druga vremenska tačka, redom; W – statistika Wilcoxon-Mann-Whitney testa korišćenog za poređenje distribucija učestalosti alela u dvema vremenskim tačkama kod svakog bolesnika; V – statistika Wilcoxon signed-rank testa korišćenog za poređenje zapaženih i očekivanih povećanja veličine ekspanzije tokom vremena, kao i zapaženih i očekivanih povećanja veličine 5' kraja ekspanzije tokom vremena u svakoj grupi bolesnika (dobijene su identične vrednosti); \* – kontrolna grupa.

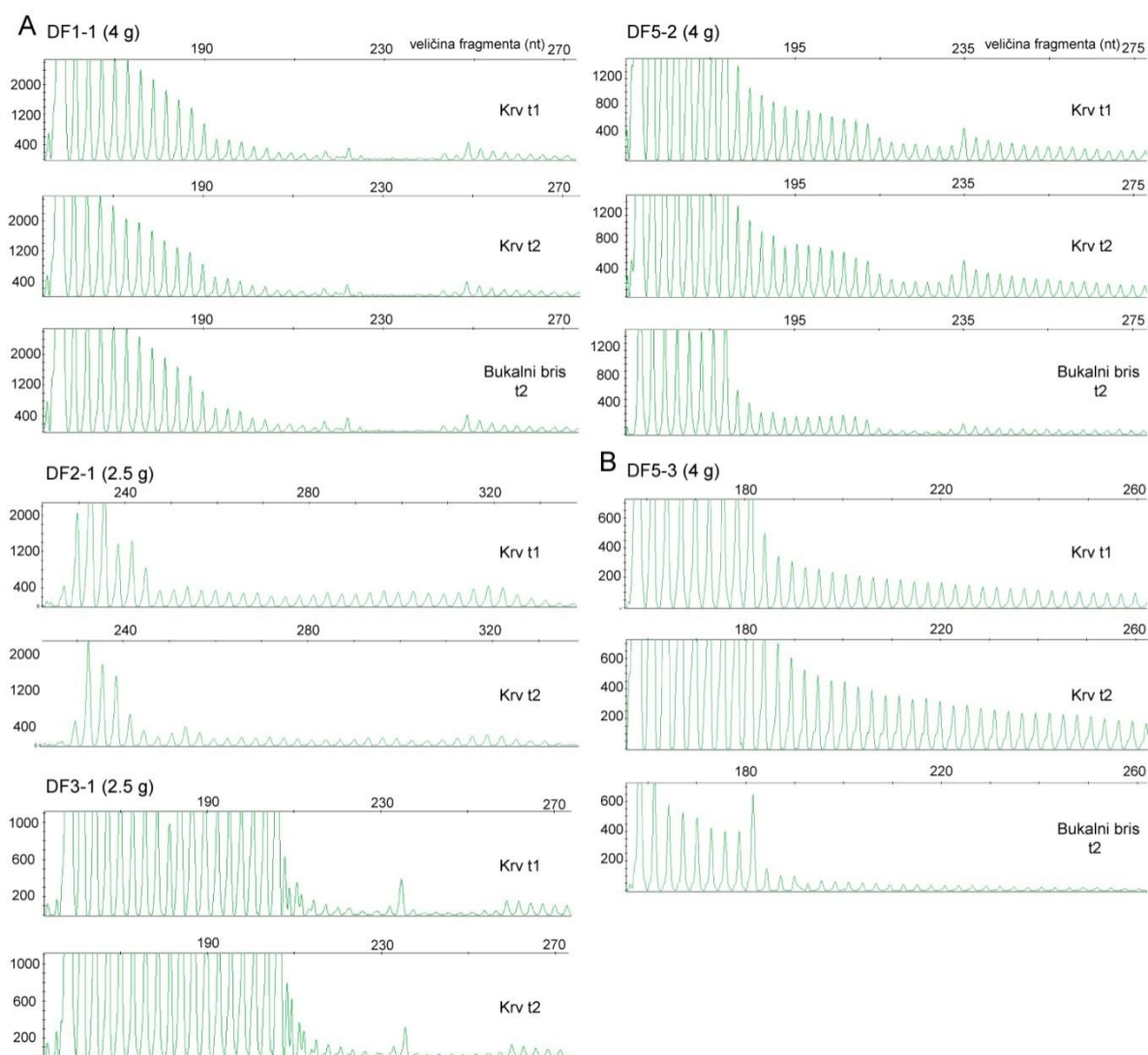
Zapaženo povećanje veličine ekspanzije tokom vremena izračunato je kao razlika između modalnih dužina alela u dvema vremenskim tačkama kako za cele varijantne *DMPK* ekspanzije, tako i za njihove 5' krajeve, pri čemu su dobijene vrednosti bile identične. Očekivano povećanje veličine ekspanzije tokom vremena izračunato je korišćenjem jednačine modela linearne regresije za čiste *DMPK* ekspanzije, koji pokazuje korelaciju između povećanja veličine ekspanzije, početne veličine ekspanzije u broju ponovaka (IE) i vremena između uzorkovanja u godinama (T): povećanje =  $-90 + 37 \times T + 0.146 \times IE$  (Martorell et al., 1998). Kao mera IE korišćena je modalna veličina distribucije učestalosti alela dobijene analizom više od 200 alela po uzorku.

Kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama zapaženo povećanje u veličini alela tokom vremena bilo je statistički značajno niže od očekivanog prema modelu linearne regresije za čiste *DMPK* ekspanzije koji povećanje veličine ekspanzije koreliše sa modalnom dužinom alela i vremenskim intervalom između uzorkovanja (Martorell et al., 1998) (Wilcoxon signed-rank test,  $V=0$ ,  $p=0.03$ ) (Tabela 4.4). Kontrolna grupa nije pokazala statistički značajnu razliku (Wilcoxon signed-rank test,  $V=0$ ,  $p=0.13$ ) (Tabela 4.4). Obe sestre iz porodice DF5 odlikovale su se pomerajem u distribuciji ka većim dužinama alela tokom istog vremenskog perioda od četiri godine. Međutim, bolesnica DF5-2 sa jednim *de novo* nastalim CTC prekidom, pokazala je manje povećanje veličine ekspanzije tokom vremena u poređenju sa DF5-3, sa sličnom veličinom ekspanzije, ali bez prekida (Slika 4.9). Ovi rezultati sugerišu da se bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikuju sporijom progresijom u povećanju veličine ekspanzija u odnosu na bolesnike sa čistim ekspanzijama tokom vremena u ćelijama krvi.

#### **4.4.5. Mutaciona dinamika 3' i 5' krajeva varijantnih *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama**

U cilju ispitivanja uticaja prekida na pokazani niži nivo i sporiju progresiju somatske nestabilnosti *DMPK* lokusa, zasebno je okarakterisana mutaciona dinamika 3' kraja ekspanzije, koji sadrži varijantne ponovke, i 5' kraja, tj. preostalog dela ekspanzije.

Za svakog ispitivanog bolesnika, nizvodni RP-PCR profili bili su identični u ćelijama krvi i bukalne sluznice, kao i u ćelijama krvi uzorkovanim u dvema vremenskim tačkama (Slika 4.10). Tako, ćelije krvi iz dveju vremenskih tačaka i ćelije bukalne sluznice odlikovale su se istovetnom strukturom nizova CCGCTG heksamera kod članova porodice DF1, kao i kod bolesnice DF5-2 sa jednim CTC ponovkom. Istovetne strukture kratkih i dugih CCG blokova tokom vremena bile su detektovane u ćelijama krvi kod bolesnika DF3-1 i DF2-1, redom. Dobijeni rezultati ukazuju na izraženu somatsku stabilnost različitih tipova i obrazaca prekida na 3' kraju *DMPK* ekspanzija u ispitivanim tkivima i tokom vremena u ćelijama krvi.



**Slika 4.10. Somatska stabilnost varijantnih ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija između tkiva i tokom vremena.** (A) Identični nizvodni RP-PCR profili u uzorcima krvi u prvoj (t1) i drugoj vremenskoj tački (t2) i u uzorcima bukalnog brisa bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama. RP-PCR profili su dobijeni korišćenjem kliznog prajmera P4CTG-for, koji hibridizuje sa perfektnim CTG ponovcima. Izuzetak su bili profili bolesnika DF2-1 dobijeni korišćenjem prajmera P5CCG, koji hibridizuje sa CCG ponovcima u bloku od 36 perfektnih CCG ponovaka. (B) Nizvodni RP-PCR profili u uzorku krvi u prvoj (t1) i drugoj vremenskoj tački (t2) i uzorku bukalnog brisa bolesnika DF5-3 sa čistom *DMPK* ekspanzijom. Profili su dobijeni korišćenjem prajmera P4CTG-for. Prikazani su bolesnici za koje su odgovarajući uzorci bili dostupni. Izuzetak su bolesnici DF1-2 i DF1-3, s obzirom na to da su njihovi profili iz svih analiziranih uzoraka bili identični profilima njihove majke DF1-1, usled identičnog *wild-type* alela od 5 ponovaka CTG i istog obrasca prekida. Vremenski interval u godinama (g) između uzorkovanja u tačkama t1 i t2 naznačen je u zagradama, pored identifikacionog broja bolesnika.



Zanimljivo je da su preostali delovi ekspanzije (5' krajevi) pokazali niži nivo zapažene somatske nestabilnosti od očekivanog za odgovarajuću dužinu čistih *DMPK* alela i uzrast uzorkovanja prema modelu 8\*\* (Wilcoxon signed-rank test, prva vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0,03$ ; druga vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0,04$ ) (Tabela 4.5). Ni u kontrolnoj, kao ni u referentnoj grupi nije uočena statistički značajna razlika prema modelu 8\*\* (podaci nisu prikazani). U skladu sa rezultatima za cele varijantne *DMPK* ekspanzije, poređenje distribucija učestalosti 5' krajeva u dvema vremenskim tačkama nije pokazalo statistički značajnu promenu kod DF1-1, DF2-1 i DF3-1, dok je kod DF1-2, DF1-3 i DF5-2 uočen statistički značajan pomerač ka većim dužinama (Tabela 4.3). Preostali delovi ekspanzije su takođe pokazali statistički značajno manje povećanje veličine ekspanzije od očekivanog prema modelu linearne regresije za čiste *DMPK* ekspanzije koji povećanje veličine ekspanzije koreliše sa modalnom dužinom alela i vremenskim intervalom između uzorkovanja (Martorell et al., 1998) (Wilcoxon signed-rank test,  $V=0$ ,  $p=0,04$ ) (Tabela 4.3). Manji nivo i sporija progresija somatske nestabilnosti 5' krajeva varijantnih *DMPK* ekspanzija nagoveštavaju stabilisajući efekat varijantnih ponovaka ne samo na 3' kraju, već i na preostali deo *DMPK* ekspanzija. Sveukupno, iz rezultata karakterizacije dinamike nestabilnosti 3' i 5' krajeva proizilazi da su varijantni ponovci *cis*-faktori sa stabilisućim efektom na *DMPK* lokus u ćelijama krvi.

**Tabela 4.5.** Zapaženi i očekivani nivoi somatske nestabilnosti 5' krajeva varijantnih *DMPK* ekspanzija u dvema vremenskim tačkama.

ID bolesnika	Krv t1						Krv t2					
	AS	M	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	SI	E*	AS	M	10 <sup>th</sup>	90 <sup>th</sup>	SI	E*
DF1-1	61,5	635	424	885	461	812	65,5	666	408	944	536	838
DF1-2	34,5	419	313	573	260	368	38,5	492	349	635	286	449
DF1-3	35,5	649	406	805	399	482	39,5	710	434	906	472	551
DF2-1	45,5	407	286	612	326	408	48	387	265	603	338	383
DF3-1	50	345	227,5	523,5	296	314	52,5	355	250	521	271	378
DF3-2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,5	NA	148	246	98	98
DF5-2	26,5	254	206	308	102	171	30,5	302	233	391	158	227

t1 i t2 – prva i druga vremenska tačka, redom; AS – uzrast uzorkovanja u godinama; M, 10<sup>th</sup> i 90<sup>th</sup> – medijana, 10. percentil i 90. percentil dužine alela izvedeni iz više od 200 alela po uzorku; SI – zapaženi nivo somatske nestabilnosti određen kao razlika u broju ponovaka između 10. i 90. percentila dužine alela; E\* – očekivani nivo somatske nestabilnosti u skladu sa modelom linearne regresije 8\*\* (Tabela 8.2.2) koji pokazuje korelaciju nivoa somatske nestabilnosti, 10. percentila dužine alela i uzrasta uzorkovanja; NA – nedostupan podatak.

Veličine 5' krajeva varijantnih *DMPK* ekspanzija dobijene su oduzimanjem odgovarajućih delova sa varijantnim ponovcima na 3' kraju od svakog mutiranog alela detektovanog *single-molecule* SP-PCR-om.

## 4.5. Metilacioni status varijantnih *DMPK* ekspanzija

U cilju ispitivanja potencijalnih mehanizama kojim varijantni ponovci utiču na stabilnost *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi, analiziran je metilacioni status CpG ostrvaca koji okružuju *DMPK* ekspanziju, kao i metilacioni status varijantnih CCG ponovaka, koji je u ovom radu prvi put analiziran.

### 4.5.1. Metilacioni status CpG ostrvaca u regionima uzvodno i nizvodno od varijantne *DMPK* ekspanzije

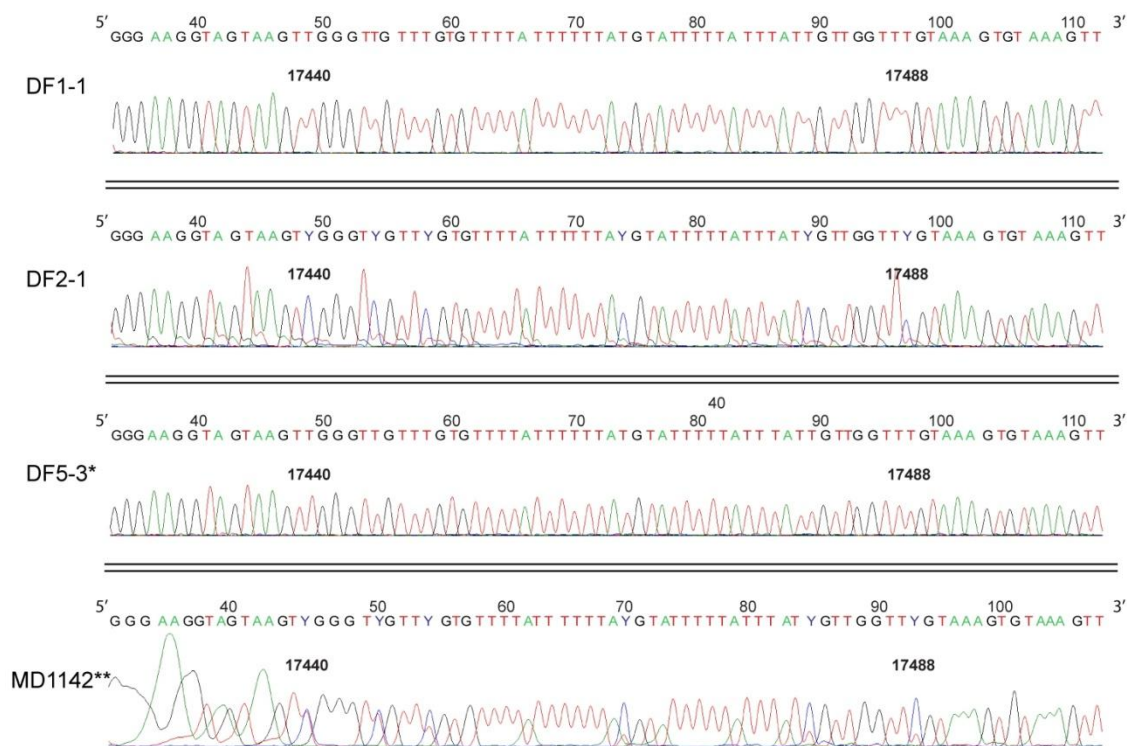
U skladu sa literaturom, kod bolesnika sa juvenilno-adultnom formom DM1 i čistim *DMPK* ekspanzijama detektovano je odsustvo metilacije u CpG ostrvcima u regionima uzvodno i nizvodno u odnosu na CTG ponovke, dok je kod bolesnika sa kongenitalnom formom detektovano prisustvo metilacije (Barbe et al., 2017; Steinbach et al., 1998) (Slike 4.11 i 4.12). Ovim je bisulfitno sekvenciranje za ispitivane regione smatrano optimizovanim i bilo je od značaja za dalje tumačenje rezultata. Naime, imajući u vidu da se gen *DMPK* nalazi na autozomnom hromozomu i da okolina CTG ponovaka u *wild-type* alelima nije metilovana, očekivalo bi se da se prisustvo metilacije u mutiranim *DMPK* alelima detektuje u vidu preklopljenih signala C i T. Međutim, kod osobe sa kongenitalnom formom DM1 detektovan je samo signal C za većinu analiziranih CpG ostrvaca (Slike 4.11 i 4.12). Bisulfitnim sekvenciranjem samo *wild-type* alela (korišćenjem prajmera CTCF1 F1 i CTCF2 R, od kojih jedan hibridizuje uzvodno, a drugi nizvodno od CTG ponovaka) detektovani su samo signali T (rezultat nije prikazan), čime je potvrđeno da signali C potiču od mutiranog *DMPK* alela. Ovakav rezultat se može objasniti različitom zastupljenošću četiri nukleotida u matičnim lancima nakon bisulfitne konverzije. U skladu sa rezultatima za bolesnike sa kongenitalnom formom, prisustvo preklopljenih signala T i C smatrano je znakom heterogene metilacije u datom CpG ostrvcetu na mutiranom *DMPK* alelu, čak i u slučajevima kad su se signali razlikovali u intenzitetu. Dakle, iako bisulfitno sekvenciranje nije kvantitativna metoda i daje informaciju da li je dato CpG ostrvce metilovano ili nemetilovano, moguće je bilo doneti zaključak da li je dato CpG ostrvce heterogeno metilovano. Najzad, prisustvo signala C veoma niskog intenziteta u odnosu na signal T nije

bilo moguće razlikovati između šuma reakcije bisulfitnog sekvenciranja i eventualnog niskog stepena metilacije, zbog čega se zaključak o niskom stepenu metilacije ili odsustvu metilacije u nekim uzorcima ne može smatrati nedvosmislenim.

Bisulfitno sekvenciranje regiona uzvodno u odnosu na CTG ponovke u genu *DMPK*, koje uključuje mesto CTCF1, pokazalo je odsustvo metilacije CpG ostrvaca kod bolesnika sa varijantnim CCG i CTC ponovcima (Slika 4.11). Izuzetak je bila porodica DF2 (bolesnici DF2-1 i DF2-2) u kojoj su uglavnom detektovani signali C i ređe signali C preklapljeni sa signalom T niskog intenziteta, što je ukazivalo na to da je većina CpG ostrvaca u uzvodnom regionu potpuno metilovana, dok su retka heterogeno metilovana (Slika 4.11). Ovaj rezultat je prvo zapažanje metilacije CpG ostrvaca uzvodno od ponovaka kod bolesnika sa juvenilno-adultnom formom DM1.

Analiza CpG ostrvaca u regionu nizvodno od CTG ponovka u genu *DMPK*, koje uključuje mesto CTCF2, pokazala je odsustvo metilacije kod bolesnice DF5-2 koja poseduje jedan *de novo* CTC prekid (Slika 4.12). Suprotno, kod porodice DF2 i bolesnika DF4-1 primećeno je prisustvo metilacije CpG ostrvaca u nizvodnom regionu, uključujući i ona u mestu CTCF2 (Slika 4.12). Prisustvo signala T veoma niskog intenziteta u odnosu na signal C visokog intenziteta ukazivalo je na verovatnu heterogenu metilaciju svih CpG ostrvaca nizvodno od ponovaka u njihovim mutiranim *DMPK* alelima. Kod ostalih bolesnika sa varijantnim CCG ponovcima nije mogao da se izvede nedvosmisleni zaključak. Naime, dobijene sekvence ukazivale su ili na odsustvo ili na nizak stepen metilacije (Slika 4.12).





**Slika 4.12. Reprezentativne sekvenze regiona nizvodno od (CTG)<sub>n</sub> niza u genu *DMPK* dobijene bisulfinim sekvenciranjem.** Bolesnici DF1-1 i DF5-3 ne poseduju metilaciju CpG ostrvaca, na šta ukazuje odsustvo signala za C nukleotid (nakon bisulfitne konverzije predstavlja poziciju 5-metil C). Bolesnici DF2-1 i MD1142 poseduju metilovana CpG ostrvca u kojima je metilovani C označen sa Y (C ili T) i predstavljen ili signalom za C nukleotid, ili češće sa dva signala: jedan za C nukleotid i jedan za T nukleotid (nakon bisulfitne konverzije predstavlja poziciju nemetilovanog C). \* - osoba sa čistom *DMPK* ekspanzijom i juvenilno-adultnom formom bolesti; \*\* - osoba sa čistom *DMPK* ekspanzijom i kongenitalnom formom bolesti. Pozicije prvog i poslednjeg prikazanog CpG ostrvceta označene su prema referentnoj sekvenci NG\_009784.1.

Prvi put zabeležena metilacija CpG ostrvaca u uzvodnom regionu od CTG ponovaka u genu *DMPK*, kao i retko zabeležena metilacija u nizvodnom regionu kod juvenilno-adultnih bolesnika porodice DF2 (Slike 4.11 i 4.12) dovedena je u vezu sa prisustvom velikog bloka od 36-40 CCG ponovaka na 3' kraju njihovih ekspanzija. Naime, pretpostavljeno je da bi metilacija u regionima koji okružuju ekspanziju mogla biti posledica efekta širenja metilacije inicirane na samim CCG ponovcima.

#### 4.5.2. Metilacioni status varijantnih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama

Metilacija varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija do sada nije ispitivana. Za tu svrhu dizajniran je metil-specifičan RP-PCR sa setom kliznih prajmera specifičnih za različite obrasce nemetilovanih i eventualno metilovanih CCG ponovaka kod ispitivanih DM1 bolesnika (Slika 3.3, Tabela 3.3). Primenom ove metode otkriveno je da CCG ponovci na 3' kraju *DMPK* ekspanzije mogu biti metilovani. Mogućnost lažno-pozitivnih rezultata u svim analizama metil-specifičnog RP-PCR-a bila je isključena istovremenom analizom kontrolnih uzoraka: odsustvo specifičnih signala kod nekonvertovane genomske DNK ukazalo je na specifičnost dizajniranih prajmera za bisulfitno-konvertovanu DNK (rezultati nisu prikazani), dok je odsustvo specifičnih RP-PCR signala sa odgovarajućim kliznim prajmerom na konvertovanoj genomskoj DNK bolesnika sa čistom *DMPK* ekspanzijom ukazalo na verodostojnost dobijenih rezultata o metilaciji CCG ponovaka u varijantnim *DMPK* ekspanzijama (Slika 4.13).

Upotrebom kliznog prajmera DM1\_for\_k1 analiziran je status metilacije CCG ponovaka u CCGCTG heksamerima. Dobijeni profili ukazali su na metilaciju CCG ponovaka u okviru dva kratka niza CCGCTG heksamera kod svih članova porodice DF1, kao i u okviru blisko lokalizovanih CCGCTG heksamera kod bolesnika DF4-1 (Slika 4.13).

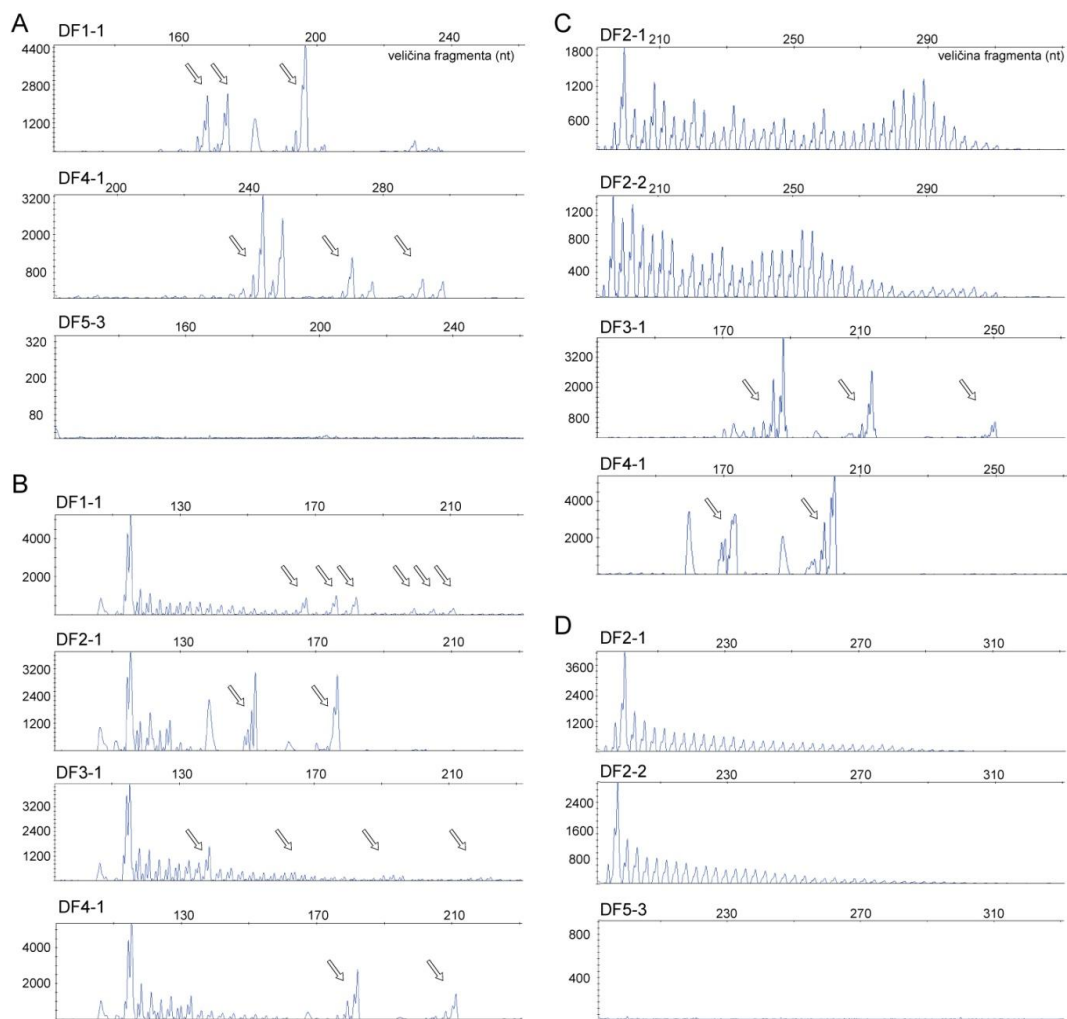
Upotrebom kliznog prajmera DM1\_for\_k2, analiziran je status metilacije pojedinačnih CCG ponovaka na 3' kraju varijantnih *DMPK* ekspanzija. Dobijeni profil signala ukazao je na metilovane pojedinačne CCG ponovke kod bolesnika iz porodica DF2 i DF3, koji su prisutni na krajnjem 3' delu ekspanzije (Slika 4.13). Osim toga, dobijeni RP-PCR profili ukazali su na metilaciju prvih CCG ponovaka u okviru dva manja CCG bloka kod bolesnika DF4-1, i potvrdili su metilaciju CCG ponovaka u okviru heksamera CCGCTG kod bolesnika iz porodice DF1 i bolesnika DF4-1, uočenu korišćenjem kliznog prajmera DM1\_for\_k1 (Slika 4.13).

Prajmer DM1\_for\_k3 iskorišćen je za detekciju metilacije CCG ponovaka u okviru kratkih CCG blokova. Dva specifična signala kod oba bolesnika iz porodice DF3 ukazala su na metilaciju citozina u okviru dva (CCG)<sub>3</sub> bloka na 3' kraju ekspanzije (Slika 4.13). Takođe, prisustvo manjih signala veće dužine kod osobe DF3-1 ukazalo je na moguće prisustvo dodatnih kratkih CCG blokova, uzvodno od onih koji su detektovani Sangerovim sekvenciranjem (Slika 4.4). Profil dobijenih signala potvrdio je metilaciju CCG ponovaka u okviru dva kratka CCG bloka kod osobe DF4-1 (Slika 4.13). Za bolesnike iz porodice DF2 dobijena je serija signala na udaljenosti od 3 bp, koja je nagovestila metilaciju citozina u okviru velikih CCG blokova ((CCG)<sub>36</sub> kod DF2-1 i (CCG)<sub>40</sub> kod DF2-2) na 3' kraju ekspanzije (Slika 4.13). Neobični profili, u smislu odsustva opadajućih signala udaljenosti 3 bp (lestvičast profil), kod obe osobe mogu se objasniti neperfektnom hibridizacijom prajmera koji se 5' krajem vezuje za nemetilovane, a 3' krajem za metilovane ponovke.

Korišćenjem kliznog prajmera DM1\_for\_TCG potvrđena je metilacija CCG ponovaka u okviru velikih CCG blokova kod članova porodice DF2, jer su dobijeni očekivani lestvičasti profili, u skladu sa vezivanjem ovog prajmera za pravilne nizove od šest metilovanih CCG ponovaka (Slika 4.13).

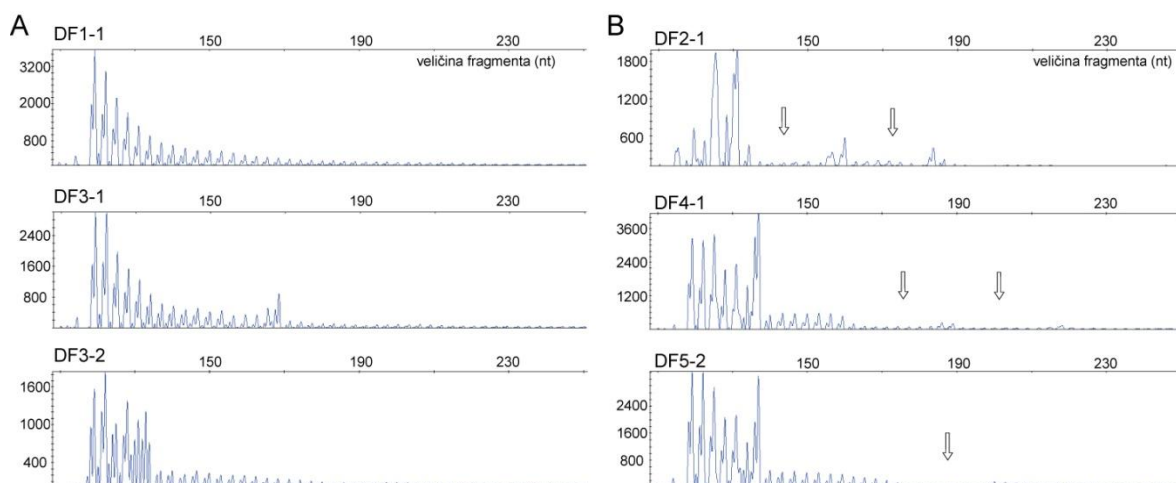
Imajući u vidu da prethodno korišćeni klizni prajmeri mogu da detektuju samo metilovane CCG ponovke, svi bolesnici analizirani su na eventualno prisustvo heterogene metilacije korišćenjem metil-specifičnog RP-PCR-a sa kliznim prajmerom DM1\_for\_TTG, koji hibridizuje sa nemetilovanim CCG ponovcima, a ujedno i sa pravilnim nizom CTG ponovaka. Iako metil-specifičan RP-PCR nije kvantitativna metoda, u konkretnom slučaju postojanje heterogene metilacije utiče na efikasnost vezivanja DM1\_for\_TTG i time može pružiti opštu informaciju o proporciji metilovanih varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi ispitivanih bolesnika.





**Slika 4.13. Metilacija CCG ponovaka na 3' kraju varijantnih *DMPK* ekspanzija pokazana metil-specifičnim RP-PCR-om. (A)** Korišćenjem kliznog prajmera DM1\_for\_k1, koji hibridizuje sa metilovanim CCG ponovkom u CCGCTG heksameru *DMPK* ekspanzije, uočeni su pojedinačni signali koji odgovaraju poziciji CCGCTG heksamera u varijantnim *DMPK* ekspanzijama DF1-1 i DF4-1, dok kod osobe sa perfektnim (CTG)<sub>n</sub> nizom (DF5-3) nisu dobijeni signali. **(B)** Korišćenjem kliznog prajmera DM1\_for\_k2, koji se 3' krajem vezuje za metilovan citozin, dobijeni su pojedinačni signali koji odgovaraju pozicijama pojedinačnih metilovanih CCG ponovaka u porodici DF2 i DF3, zatim pozicijama CCG ponovaka u okviru dva manja CCG bloka i CCGCTG heksamera kod DF4-1, kao i pozicijama CCGCTG heksamera kod DF1-1. **(C)** Upotrebom kliznog prajmera DM1\_for\_k3, koji se svojim 3' krajem vezuje za tri uzastopna metilovana CCG ponovka, detektovani su pojedinačni signali koji odgovaraju pozicijama metilovanih CCG ponovaka u okviru kratkih CCG blokova na 3' kraju ekspanzije kod DF3-1, kao i u okviru dva kratka CCG bloka kod DF4-1. Takođe, profil sa serijom signala udaljenih 3 bp u porodici DF2 (DF2-1 i DF2-1) ukazao je na metilaciju u okviru velikog perfektnog CCG bloka. **(D)** Upotrebom kliznog prajmera DM1\_for\_TCG koji se vezuje za niz od šest metilovanih CCG ponovaka, dobijeni lestvičasti profili sa signalima na svaka 3 bp potvrdili su metilaciju velikog CCG bloka u porodici DF2. Odsustvo signala kod osobe sa čistom *DMPK* ekspanzijom (DF5-3) potvrdilo je specifičnost RP-PCR reakcije. Profili drugih članova porodice DF1 (DF1-2 i DF1-3) i DF3 (DF3-2) bili su identični profilima kod DF1-1 i DF3-1, redom.

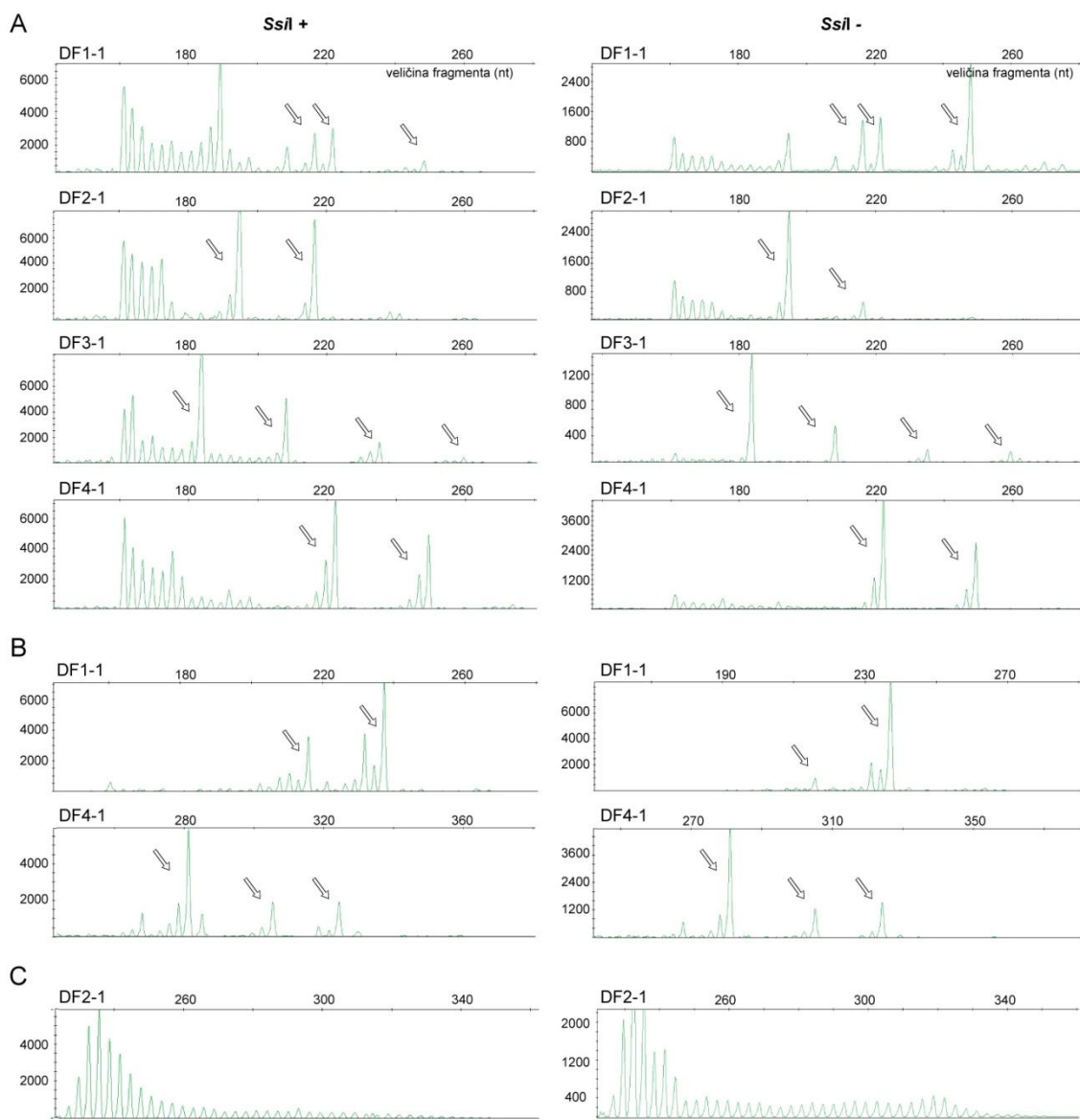
S tim u vezi, kod bolesnika iz porodice DF2 i osobe DF4-1, RP-PCR profili sa kliznim prajmerom DM1\_for\_TTG odlikovali su se značajnim padom u intenzitetu signala i velikim prazninama (Slika 4.14), ukazujući na to da skoro sve ćelije krvi sadrže metilovane varijantne *DMPK* ekspanzije. Sa druge strane, profili bolesnika iz porodica DF1 i DF3 bili su lestvičasti, tj. odlikovali su se serijom opadajućih signala bez uočenih nepravilnosti (Slika 4.14), koje se kod navedenih bolesnika pojavljuju i u RP-PCR profilima iz nekonvertovane genomske DNK (Slike 4.1 i 4.2). Ovaj rezultat ukazuje na to da navedeni bolesnici imaju veću proporciju ćelija krvi sa nemetilovanim varijantnim *DMPK* ekspanzijama.



**Slika 4.14. Heterogena metilacija CCG ponovaka na 3' kraju varijantnih *DMPK* ekspanzija pokazana metil-specifičnim RP-PCR-om.** Metil-specifični RP-PCR profili dobijeni korišćenjem prajmera DM1\_for\_TTG, koji hibridizuje sa nemetilovanim CCG ponovcima, a ujedno i sa perfektnim nizom CTG ponovaka, pružili su opštu informaciju o stepenu metilacije CCG ponovaka na 3' kraju ekspanzije. **(A)** Dobijeni lestvičasti profili kod bolesnika DF1-1, DF3-1 i DF3-2 ukazali su na postojanje značajne proporcije alela sa nemetilovanim CCG ponovcima. **(B)** Značajni pad u intenzitetu signala i velike praznine u profilima bolesnika DF2-1 i DF4-1 ukazali su na to da su CCG ponovci u skoro svim alelima metilovani. Pad u intenzitetu signala kod bolesnika DF5-2, koji je analiziran kao kontrola koja ne poseduje CCG ponovke, nastao je usled prisustva pojedinačnog CTC prekida i neperfektno hibridizacije kliznog prajmera DM1\_for\_TTG. Profili drugih članova porodice DF1 (DF1-2 i DF1-3) i DF2 (DF2-2) bili su identični profilima kod DF1-1 i DF2-1, redom.

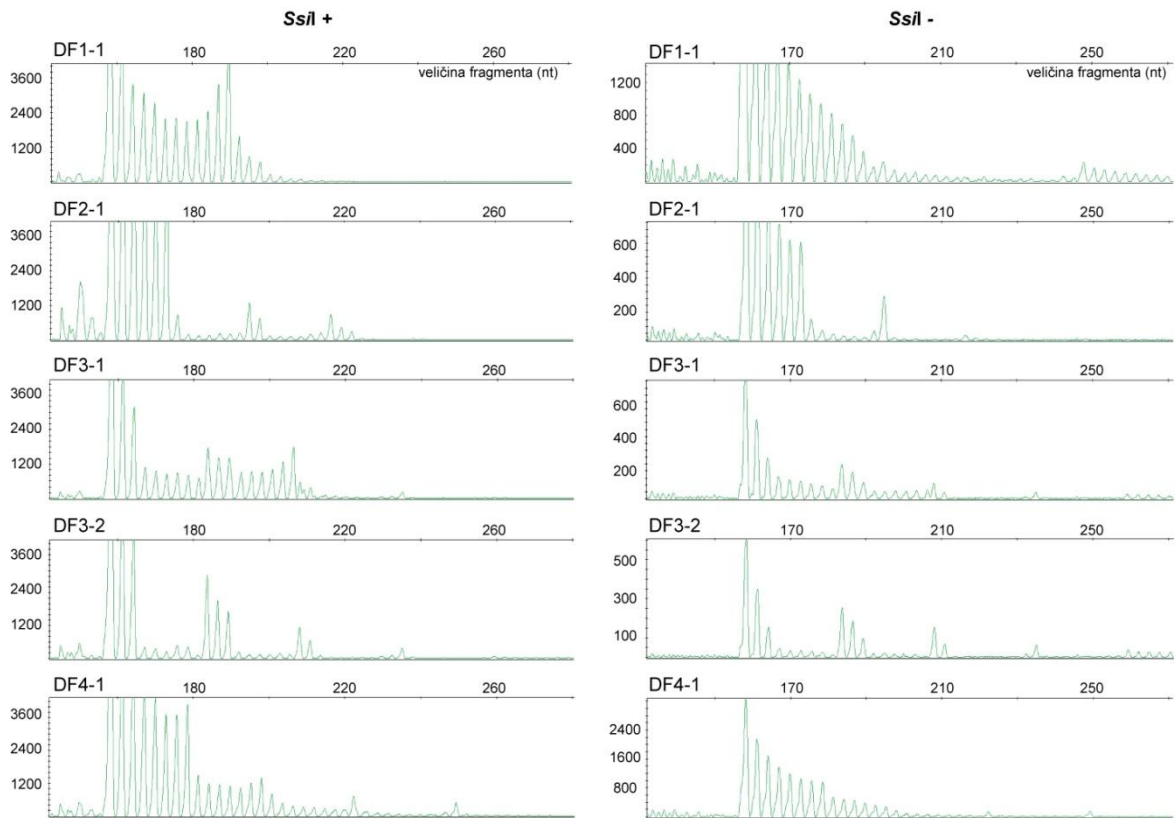
Prvi put u ovom radu opisana (heterogena) metilacija CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama dodatno je potvrđena korišćenjem nizvodnog RP-PCR-a u kome je matrica bila genomska DNK digerirana enzimom *SsiI* osetljivim na metilaciju.

Nizvodni RP-PCR, rađen sa tri različita klizna prajmera specifična za CCG ponovke (GC1\_CC, GC1\_CCG i P5CCG) (Tabela 3.1), rezultovao je signalima istih dužina iz *SsiI* digerirane i nedigerirane DNK, čime je potvrđena metilacija samih CCG ponovaka (Slika 4.15). Postojanje razlika u intenzitetu specifičnih signala između digerirane i nedigerirane DNK mogle su odražavati razlike u stepenu metilacije između bolesnika, ali su mogle nastati i usled razlika u efikasnosti umnožavanja proizvoda različitih dužina, zbog čega se intenzitet dobijenih signala nije smatrao indikacijom za stepen metilacije kod datog bolesnika. Upotrebom prajmera GC1\_CC, DNK digerirana enzimom *SsiI* dala je specifične signale kao i nedigerirana DNK kod svih bolesnika sa CCG varijantnim ponovcima (Slika 4.15). S obzirom na to da enzim *SsiI* digerira nemetilovanu CCGC sekvencu, ovi rezultati potvrđuju prisustvo metilacije CCG ponovaka u okviru različitih obrazaca na 3' kraju *DMPK* ekspanzija. Upotrebom prajmera GC1\_CCG, dobijeni su specifični obrasci signala uporedivi između *SsiI* digerirane i nedigerirane DNK kod bolesnika iz porodice DF1 i osobe DF4-1, čime je potvrđena metilacija CCG ponovaka u CCGCTG heksamerima (Slika 4.15). Konačno, upotrebom prajmera P5CCG dobijena je opadajuća serija signala kako iz *SsiI* digerirane, tako i iz nedigerirane DNK kod oba bolesnika iz porodice DF2 (Slika 4.15). Dobijeni rezultat ukazuje na uspešnu hibridizaciju kliznog prajmera za CCG ponovke, čime je potvrđena njihova metilacija u okviru blokova (CCG)<sub>36</sub> i (CCG)<sub>40</sub> kod bolesnika DF2-1 i DF2-2, redom.



**Slika 4.15. Metilacija CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija potvrđena RP-PCR-om sa kliznim prajmerima specifičnim za različite obrasce CCG ponovaka i genomskom DNK digeriranom enzimom *SsiI* kao matricom.** Nizvodni RP-PCR profili kod bolesnika sa varijantnim ponovcima dobijeni iz DNK digerirane enzimom *SsiI* (levo), u poređenju sa profilima dobijenim iz nedigerirane DNK (desno). (A) Upotrebom prajmera GC1\_CC, koji svojim 3' krajem hibridizuje za pojedinačne CCG ponovke, dobijeni su isti obrasci signala iz digerirane i nedigerirane DNK kod svih bolesnika, čime je potvrđeno prisustvo metilacije CCG ponovaka. Profili drugih članova porodice DF1 (DF1-2 i DF1-3), DF2-2 i DF3-2 bili su identični profilima kod DF1-1, DF2-1 i DF3-1, redom. (B) Upotrebom prajmera GC1\_CCG, koji hibridizuje za CCGCTG heksamere, dobijeni su isti obrasci signala kod DF1-1 i DF4-1, čime je potvrđena metilacija CCG ponovaka u CCGCTG heksamerima. Profili kod DF1-2 i DF1-3 bili su identični profilima kod DF1-1. (C) Upotrebom prajmera P5CCG, koji hibridizuje za niz CCG ponovaka, dobijena je serija signala iz digerirane i nedigerirane DNK kod DF2-1, čime je dokazano prisustvo metilacije u velikom CCG bloku. Profil DF2-2 bio je identičan profilu DF2-1. Prisustvo signala različitog intenziteta u profilima digerirane i nedigerirane DNK kod datog bolesnika ne može se nedvosmileno tumačiti kao indicacija za heterogenu metilaciju.

Slično metil-specifičnom RP-PCR-u sa kliznim prajmerom DM1\_for\_TTG, intenzitet dobijenih RP-PCR signala sa kliznim prajmerom specifičnim za perfektne CTG ponovke (P4CTG-for, Tabela 3.1), mogao se smatrati indikacijom stepena metilacije kod datog bolesnika. Naime, iako ni ova metoda nije kvantitativna, za očekivati je da digestija varijantnih *DMPK* alela odražava stepen metilacije CCG ponovaka u varijantnim *DMPK* ekspanzijama. Korišćenjem kliznog prajmera P4CTG-for, najmanja odstupanja u nizvodnim RP-PCR profilima iz *Ssi*I digerirane u odnosu na nedigeriranu DNK bila su kod bolesnika iz porodice DF2 i osobe DF4-1 (Slika 4.16). Prisustvo signala uporedivog intenziteta sa karakterističnim padovima u intenzitetu signala i velikim prazninama u profilima sa digeriranom i nedigeriranom DNK ukazalo je na očuvanost CCG ponovaka. S obzirom na to da enzim *Ssi*I digerira nemetilovanu CCGC sekvencu, dobijeni rezultati su potvrdili visoku proporciju ćelija krvi sa metilovanim CCG ponovcima kod bolesnika DF2-1, DF2-2 i DF4-1, primećenu i metil-specifičnim RP-PCR-om sa kliznim prajmerom DM1\_for\_TTG. Nizvodni RP-PCR profili kod bolesnika iz porodica DF1 i DF3 odlikovali su se serijom opadajućih signala manje dužine i većeg intenziteta u digeriranoj u odnosu na nedigeriranu DNK, što se može objasniti vezivanjem prajmera P4CTG-for i njegovim „klizanjem” duž čistog (CTG)<sub>n</sub> niza na 3' kraju ekspanzije, nakon poslednjeg CCG prekida (Slika 4.16). Dobijeni profili iz digerirane DNK ukazali su na delovanje enzima *Ssi*I i posledično na prisustvo nemetilovanih CCG ponovaka u varijantnim *DMPK* alelima. Međutim, prisustvo kraćih praznina praćenih novom serijom od nekoliko ili više opadajućih signala moglo se objasniti vezivanjem kliznog prajmera pre poslednjeg detektovanog CCG prekida (Slika 4.16). Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatom metil-specifičnog RP-PCR-a sa kliznim prajmerom DM1\_for\_TTG i ukazuje na to da kod bolesnika iz porodica DF1 i DF3 postoji određena proporcija ćelija krvi sa metilovanim CCG ponovcima u varijantnim ekspanzijama.



**Slika 4.16. Heterogena metilacija CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija potvrđena RP-PCR-om sa prajmerom specifičnim za perfektni niz CTG ponovaka i genomskom DNK digeriranom enzimom *SsiI* kao matricom.** RP-PCR profili kod bolesnika sa varijantnim ponovcima dobijeni iz DNK digerirane enzimom *SsiI* (**levo**) u poređenju sa RP-PCR profilima dobijenim iz nedigerirane DNK (**desno**). Najmanja odstupanja u dužini signala između profila kod DF2-1 i DF4-1 ukazuju na očuvanost CCG prekida usled inhibicije enzima *SsiI* većinskom proporcijom metilovanih *DMPK* varijantnih ekspanzija. Sa druge strane, kraće serije opadajućih signala i njihov veliki intenzitet kod DF1-1 i porodice DF3 ukazale su na delovanje enzima *SsiI*, odnosno prisustvo nemetilovanih CCG ponovaka u varijantnim *DMPK* ekspanzijama. Ipak, prisustvo kratkih praznina, koje prate nove serije opadajućih signala, ukazuje na postojanje izvesne proporcije *DMPK* ekspanzija sa metilovanim CCG ponovcima. Profili drugih članova porodica DF1 (DF1-2 i DF1-3) i DF2 (DF2-2) bili su identični profilima DF1-1 i DF2-1, redom.

### 4.5.3. Povezanost metilacije varijantnih ponovaka na 3' kraju ekspanzije i metilacije CpG ostrvaca u regionima nizvodno i uzodno od ponovaka u genu *DMPK*

Na slici 4.17 predstavljeni su veličina ekspanzije, struktura ponovljenog niza u genu *DMPK*, i status metilacije okolnih CpG ostrvaca kod analiziranih bolesnika sa varijantnim ekspanzijama i juvenilno-adultnom formom DM1 i kod dva kontrolna bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (jednog sa juvenilno-adultnom i jednog sa kongenitalnom formom). Iako korišćene metode za analizu metilacije CCG ponovaka nisu kvantitativne, kod bolesnika koji poseduju pravilni niz od 36 i 40 CCG ponovaka (DF2-1 i DF2-2) i kod bolesnika koji poseduje veći broj rasutih CCGCTG heksamera i kraće nizove pravilnih CCG ponovaka (DF4-1), uočeni su većinski metilovani CCG ponovci (Slika 4.17). Sa druge strane kod bolesnika koji imaju manji broj CCGCTG heksamera (porodica DF1) i bolesnika koji imaju kraće nizove pravilnih CCG ponovaka i nekoliko rasutih CCG ponovaka (porodica DF3), uočen je manji stepen metilacije CCG ponovaka (Slika 4.17). Ovi rezultati ukazuju na to da bi stepen metilacije CCG ponovaka na 3' kraju *DMPK* ekspanzija najpre mogao da zavisi od strukture CCG ponovaka, u kojoj je ukupna zastupljenost CCG ponovaka važan faktor.

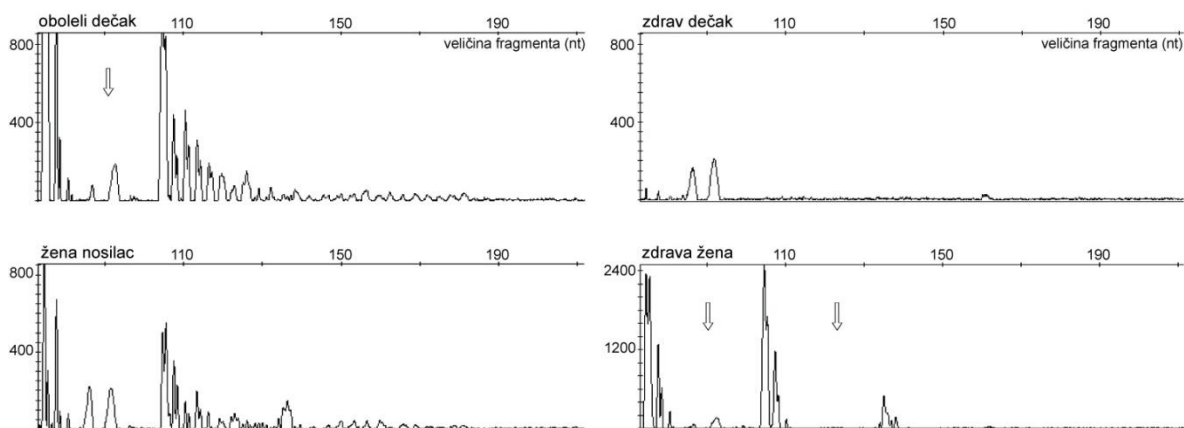
Zanimljivo je da je metilacija okolnih CpG ostrvaca, detektibilna bisulfitnim sekvenciranjem, kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama uočena samo kod onih koji imaju većinski metilovane CCG ponovke (DF2-1, DF2-2 i DF4-1), pri čemu je metilacija uzvodnog regiona uočena samo kod bolesnika DF2-1 i DF2-2 (Slika 4.17). Navedena zapaženja sugerišu da stepen metilacije okolnih CpG ostrvaca, slično stepenu metilacije samih CCG ponovaka, zavisi od zastupljenosti i strukture CCG ponovaka u (CTG)<sub>n</sub> nizu gena *DMPK*. Tako, najsnažniji signal za metilaciju CpG ostrvaca bili su pravilni nizovi od 36 i 40 CCG ponovaka kod bolesnika DF2-1 i DF2-2, redom. Imajući u vidu različite veličine ekspanzija (Tabela 4.2) i uzrasta uzorkovanja analiziranih bolesnika (14-61,5 godina), izgleda da veličina ekspanzije i starosna dob nemaju bitan uticaj na metilaciju varijantnih CCG ponovaka i okolnih CpG ostrvaca. Sveukupno, zapažanja o metilaciji CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama i njihovih uzvodnih i nizvodnih CpG ostrvaca navode na pretpostavku da bi metilacija mogla da se inicira na samim CCG ponovcima, dok je metilacija okolnih CpG ostrvaca posledica njenog loknog širenja (eng. *methylation spreading*).





#### 4.5.4. Validacija metil-specifičnog RP-PCR-a dizajniranog za ispitivanje metilacionog statusa varijantnih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama

Verodostojnost rezultata metil-specifičnog RP-PCR-a, dizajniranog za detekciju metilovanih CCG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama, potvrđena je analizom metilacije CGG ponovaka u genu *FMRI* metil-specifičnim RP-PCR-om prema protokolu iz studije Zhou i saradnika (2006). Kod dečaka sa FRAXA sindromom, ekspanzija od preko 200 CGG ponovaka u genu *FMRI* na hromozomu X je u potpunosti metilovana, dok su *wild-type* aleli kod zdravih dečaka nemetilovani (Hansen, Gartler, Scott, Chen, & Laird, 1992). Upotrebom kliznog prajmera mTPR (Tabela 3.4), dobijeni su obrasci signala karakteristični za trinukleotidnu ekspanziju kod obolelih dečaka, što je potvrdilo očekivanu metilaciju CGG ponovaka (Slika 4.18). Profil se odlikovao prisustvom praznine od 24 bp na 5' kraju ekspanzije, koja nastaje usled prisustva jednog AGG prekida u CGG ekspanziji. Sa druge strane, kod zdravog dečaka nisu detektovani signali, u skladu sa očekivanim odsustvom metilacije (Slika 4.18).

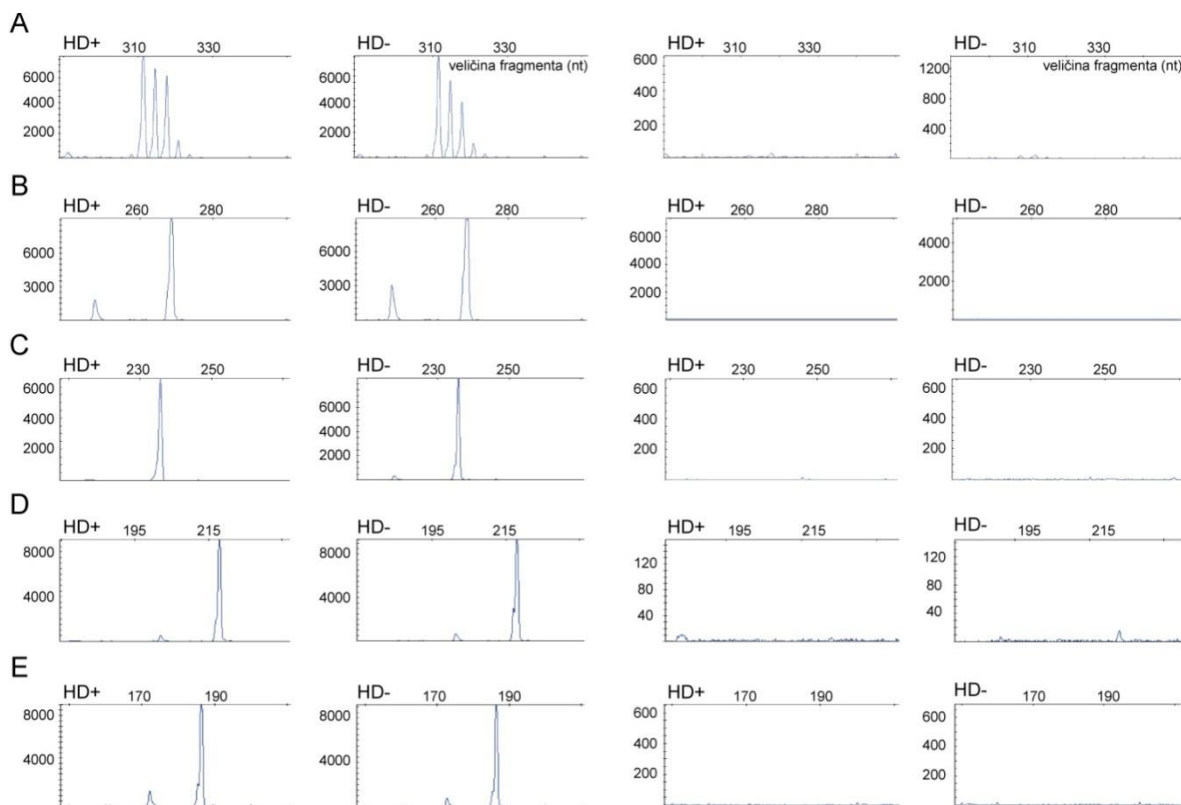


**Slika 4.18. Metilacioni status CGG ponovaka u *FMRI* alelima ispitivan metil-specifičnim RP-PCR-om.** Metil-specifični RP-PCR profili *FMRI* alela kod FRAXA bolesnika (**levo**) i zdravih osoba (**desno**). Upotrebom kliznog prajmera mTPR, koji hibridizuje sa metilovanim CGG ponovcima, dobijeni su obrasci signala karakteristični za ekspanziju kod obolelog, ali ne i zdravog dečaka, čime je potvrđena metilacija CGG ponovaka samo na ekspanzovanom *FMRI* alelu. Pad u intenzitetu signala dužine 24 bp kod obolelog dečaka (označeno strelicom) ukazuje na prisustvo jednog AGG varijantnog ponovaka. Upotrebom istog kliznog prajmera, dobijeni su lestvičasti obrasci opadajućih signala kod žene heterozigotnog nosioca ekspanzije, čime je potvrđena metilacija CGG ponovaka na ekspanzovanom *FMRI* alelu. Profil metil-specifičnog RP-PCR-a kod zdrave žene karakterisao se specifičnim obrascem signala sa dve praznine od 24 bp (označeno strelicama), koji ukazuje na metilovani *wild-type* alel sa dva pojedinačna AGG varijantna ponovaka na inaktiviranom hromozomu X.

Žene poseduju dva hromozoma X, od kojih je jedan nasumično inaktiviran, tako da su *FMRI* aleli na inaktiviranom hromozomu X metilovani. S tim u vezi, metil-specifični RP-PCR dao je proizvode i kod zdravih žena, specifičnog obrasca signala sa dve praznine od 24 bp, nastale usled prisustva dva AGG prekida na *wild-type* alelima (Slika 4.18). Kod žena heterozigotnih nosilaca *FMRI* ekspanzije, dobijeni su lestvičasti profili u skladu sa očekivanom metilacijom CGG ponovaka na ekspanzovanom alelu (Slika 4.18).

Potvrda verodostojnosti rezultata, ali i provera dizajna metil-specifičnog RP-PCR-a za varijantne *DMPK* ekspanzije sa CCG ponovcima, dobijena je analizom metilacije tri niza neperfektnih CCG ponovaka koji se nalaze nizvodno od ekspanzijama sklonih CAG ponovaka u genu *HTT*. U dizajniranom metil-specifičnom RP-PCR-u, upotrebom kliznog prajmera DM1\_for\_TCG (Tabela 3.3), nisu detektovani specifični signali koji bi ukazivali na metilaciju CCG ponovaka ni kod HD bolesnika, ni kod zdravih osoba (Slika 4.19). Korišćenjem kliznog prajmera DM1\_for\_TTG (Tabela 3.3), uočeni su specifični signali kod svih testiranih osoba, potvrđujući odsustvo metilacije CCG ponovaka. Ovaj rezultat je ukazao na to da prvi niz CCG ponovaka nizvodno od CAG ponovaka u genu *HTT* nije metilovan bez obzira na to da li je broj CAG ponovaka u normalnom opsegu variranja ili ekspanzovan (Slika 4.19). Metil-specifičnim RP-PCR-om analizirana su još 2 kratka nizvodna regiona sa ukupno 16 potencijalnih mesta metilacije. Kao i u prethodnom slučaju, korišćenjem prajmera koji hibridizuju za metilovane sekvence (HD\_k1\_CG - HD\_k4\_CG, Tabela 3.5), nisu dobijeni specifični signali ni kod HD bolesnika ni kod zdravih osoba (Slika 4.19). Sa druge strane, u RP-PCR reakcijama sa kliznim prajmerima koji hibridizuju za nemetilovane sekvence (HD\_k1\_TG - HD\_k4\_TG, Tabela 3.5), dobijeni su specifični signali odgovarajuće dužine kod svih analiziranih osoba (Slika 4.19). Ukupno, ovi rezultati pokazuju da CpG mesta nizvodno od CAG ponovaka u genu *HTT* ne podležu metilaciji.

Odsustvo metilacije CCG ponovaka u regionu gena *HTT*, koji je po strukturi ponovaka sličan strukturi *DMPK* ekspanzije sa varijantnim CCG ponovcima, ujedno ukazuje na to da bi za iniciranje metilacije CCG ponovaka od značaja mogli biti sledeći faktori: pravilnost CCG nizova, dužina CTG/CAG niza i kontekst okolnih sekvenci.



**Slika 4.19. Odsustvo metilacije CCG ponovaka nizvodno od ekspanzijama sklonih CAG ponovaka u genu *HTT* pokazano metil-specifičanim RP-PCR-om.** Profili metil-specifičnog RP-PCR-a regiona nizvodno od ekspanzije CAG ponovaka u genu *HTT* kod HD bolesnika i zdravih osoba. Sve reakcije su rađene paralelno sa dva različita tipa kliznih prajmera, koji hibridizuju za nemetilovana (**levo**) ili metilovana (**desno**) CpG ostrvca. (**A**) Upotrebom prajmera DM1\_for\_TCG, koji hibridizuje za metilovane CCG ponovke, nisu detektovani specifični signali ni kod jedne ispitivane osobe. Međutim, korišćenjem prajmera DM1\_for\_TTG, koji hibridizuje za nemetilovane CCG ponovke, uočeni su specifični signali kod svih ispitivanih osoba, čime je pokazano da prvi niz CCG ponovaka nizvodno od CAG ponovaka u genu *HTT* nije metilovan bez obzira na broj CAG ponovaka. (**B-E**) U daljim reakcijama metil-specifičnog RP-PCR-a analizirana su još 4 kratka nizvodna regiona sa ukupno 16 CpG ostrvaca. Korišćenjem četiri prajmera koji hibridizuju za metilovana CpG ostrvca (HD\_k1\_CG - HD\_k4\_CG) nisu dobijeni specifični signali ni kod jedne ispitivane osobe. Sa druge strane, korišćenjem prajmera koji hibridizuju za nemetilovana CpG ostrvca (HD\_k1\_TG - HD\_k4\_TG) dobijeni su specifični signali kod svih ispitivanih osoba, čime je pokazano da drugi i treći niz CCG ponovaka nizvodno od CAG ponovaka u *HTT* genu ne podležu metilaciji.

## **4.6. Korelacija genotipa i fenotipa kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama**

Kliničke karakteristike bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama identifikovanim u ovoj studiji sumirane su u Tabeli 4.6.

### **4.6.1. Povezanost varijantnih ponovaka sa mišićnom zahvaćenošću i stepenom miotonije kod DM1 bolesnika**

Prvi pregled 5 od 9 bolesnika ukazao je na moguću DM2 dijagnozu. U odnosu na grupu od 234 DM1 bolesnika iz Srpskog registra za miotonične distrofije (podatak iz septembra 2017. godine), u kojoj se kod samo jednog bolesnika prvobitno sumnjalo na DM2, klinička sumnja na DM2 je bila statistički značajno češća kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama (Fišerov egzaktni test,  $p=1,1e^{-7}$ ). Pored kliničkih simptoma koji se ne smatraju tipičnim za DM1 (Poglavlje 4.1), većina bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovala se sporom progresijom mišićne slabosti i manje izraženom perkusionom miotonijom. Perkusiona miotonija je bila statistički značajno manje izražena kod DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima (medijana,  $Mdn=2$ ) u poređenju sa bolesnicima sa neprekinutim  $(CTG)_n$  nizom ( $Mdn=9$ ) (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $W=597.5$ ,  $p=4e^{-4}$ ). Naprotiv, razlika u stepenu aktivne miotonije između bolesnika sa varijantnim ( $Mdn=4$ ) i čistim *DMPK* ekspanzijama ( $Mdn=5$ ) bila je na granici značajnosti (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $W=466.5$ ,  $p=0.08$ ). Uočena razlika u stepenu miotonije između bolesnika sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama ne može se objasniti dužinom progenitornog alela, s obzirom na to da modeli linearne regresije nisu pokazali statističku značajnu korelaciju između dužine progenitornog alela (procenjenog kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu) i stepena perkusione miotonije ( $F(1,83)=0.04$ ,  $p=0.85$ ), kao i stepena aktivne miotonije ( $F(1,83)=0.06$ ,  $p=0.8$ ) (Tabela 4.7, Slika 4.20). Svi testirani bolesnici sa varijantnim ponovcima pokazali su normalne rezultate kognitivnog testiranja merene baterijom testova ACE-R (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6.** Kliničke karakteristike DM1 bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama.

<b>Karakteristike/Identifikacioni broj bolesnika</b>	<b>DF1-1</b>	<b>DF1-2</b>	<b>DF1-3</b>	<b>DF2-1</b>	<b>DF2-2</b>	<b>DF3-1</b>	<b>DF3-2</b>	<b>DF4-1</b>	<b>DF5-2</b>	<b>DF5-3<sup>a</sup></b>
<b>Tip varijantnih ponovaka</b>	CCG	CCG	CCG	CCG	CCG	CCG	CCG	CCG	CTC	odsutni
<b>Uzrast početka bolesti</b>	39	30	15	40	12	45	31	39	22	21
<b>Ptoza</b>	++	-	-	++	+	+	+	+	+	+
<b>Slabost sternokleidomastoidnog mišića</b>	+++	++	+	+	-	++	-	+++	-	+
<b>Mišićna snaga<sup>b</sup></b>										
<i>proksimalno GE</i>	4	5	5	4	5	5	5	4	5	5
<i>distalno GE</i>	3	4	4	3	5	5	5	3	4	4
<i>proksimalno DE</i>	3	5	5	4	5	4	5	4	5	5
<i>distalno DE</i>	2	4	4	4	5	5	5	4	5	5
<b>Aktivna miotonija/perkusiona miotonija (s)</b>	4/7	4/0	8/0	9/2	0/2	3/2	0/0	4/10	2/3	6/6
<b>Druge mišićno-skeletne karakteristike</b>	-	bez hipotrofije mišića, hipertrofija listova	hipertrofija listova	„krljata” lopatica desno	-	-	segmentna hipotrofija vastus medialis desno	-	-	-
<b>Katarakta</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<b>Frontalna ćelavost</b>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<b>Neploidnost</b>	-	-	+	-	NA	-	-	NA	-	-
<b>Metaboličke promene</b>	glukozna inetolerancija	-	-	-	-	Hipotireoza	-	hipertireoza, hiperparatireodizam	-	-
<b>Kardiološki simptomi</b>	sinusna bradikardija, regurgitacija mitralnih zalistaka	-	-	granični PR interval, produžena LV relaksacija	-	produžena LV relaksacija	-	granična LV hipertrofija	granični PR interval	-
<b>Spirometrija</b>	normalna	Normalna	normalna	normalna	normalna	Normalna	normalna	blaga restrikcija, FVC 86%	normalna	normalna
<b>ACE-R rezultat</b>	NA	85	99	95	NA	NA	NA	89	91	NA

- odsutna, + blaga, ++ umerena, +++ ozbiljna; LV – leva komora; NA – nedostupan podatak; FVC – forsirani vitalni kapacitet; ACE-R – Addenbrooke’s Cognitive Examination – Revised (ukupan rezultat niži od 82 smatran je patološkim).

Snaga najslabijih proksimalnih i distalnih mišića ruku i nogu ocenjivana je od 0 do 5 korišćenjem skale Medical Research Council (MRC).

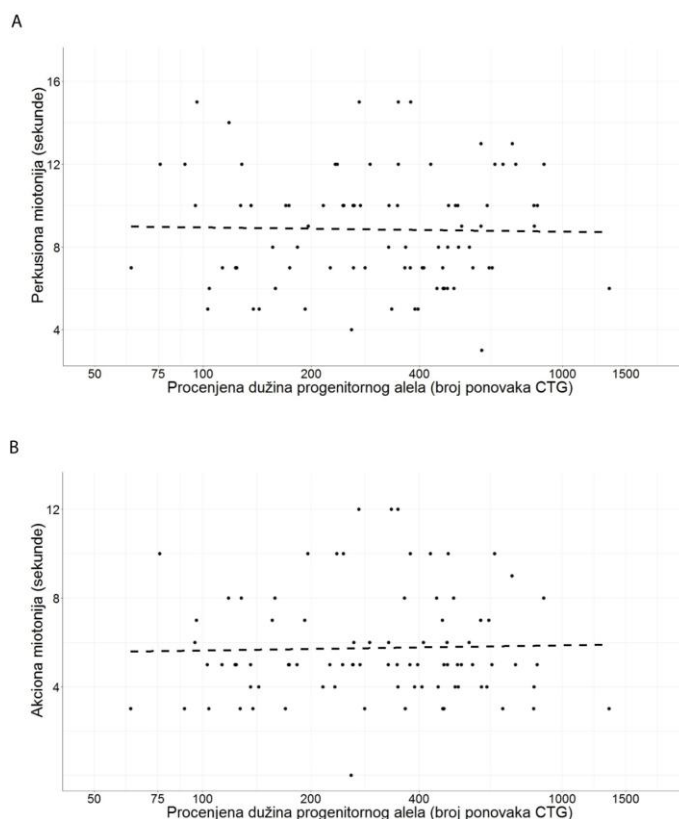
<sup>a</sup> Bolesnik bez varijantne ekspanzije prikazan zbog poređenja sa sestrom (DF5-2) koja ima prekid.

<sup>b</sup> Predstavljena je snaga najslabijeg mišića.

**Tabela 4.7.** Korelacija stepena perkusione (PM) i aktivne (AM) miotonije sa procenjenjenom dužinom progenitornog alela (PAL).

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
PM = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(\text{PAL})$	Intercept	$\beta_0 = 9,3558$	2,6152	3,577	$5,8e^{-4}$	-0,01	0,85
	$\log_{10}(\text{PAL})$	$B_1 = -0,2051$	1,0473	-0,196	0,85		
AM = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(\text{PAL})$	Intercept	$\beta_0 = 5,1609$	2,2979	2,246	0,03	-0,01	0,8
	$\log_{10}(\text{PAL})$	$B_1 = 0,234$	0,9203	0,254	0,8		

Modeli linearne regresije urađeni su na grupi od 85 DM1 bolesnika za koje su genetički podaci bili dostupni iz baze Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dok su podaci za stepen perkusione i aktivne miotonije preuzeti iz Srpskog registra za miotonične distrofije „Aktenahten”. PAL je procenjen kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu.



**Slika 4.20.** Odsustvo korelacije između stepena perkusione (A) i aktivne (B) miotonije sa dužinom progenitornog alela u grupi DM1 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama iz Srbije (n=85). Dužina progenitornog alela procenjena je kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu i predstavljena je na logaritamskoj (baza 10) skali. Isprekidane linije predstavljaju regresione linije odgovarajućih lineranih modela (Tabela 4.7) koji nisu bili statistički značajni na grupi od 85 DM1 bolesnika sa čistim ekspanzijama (p=0.85 i p=0.8, redom).

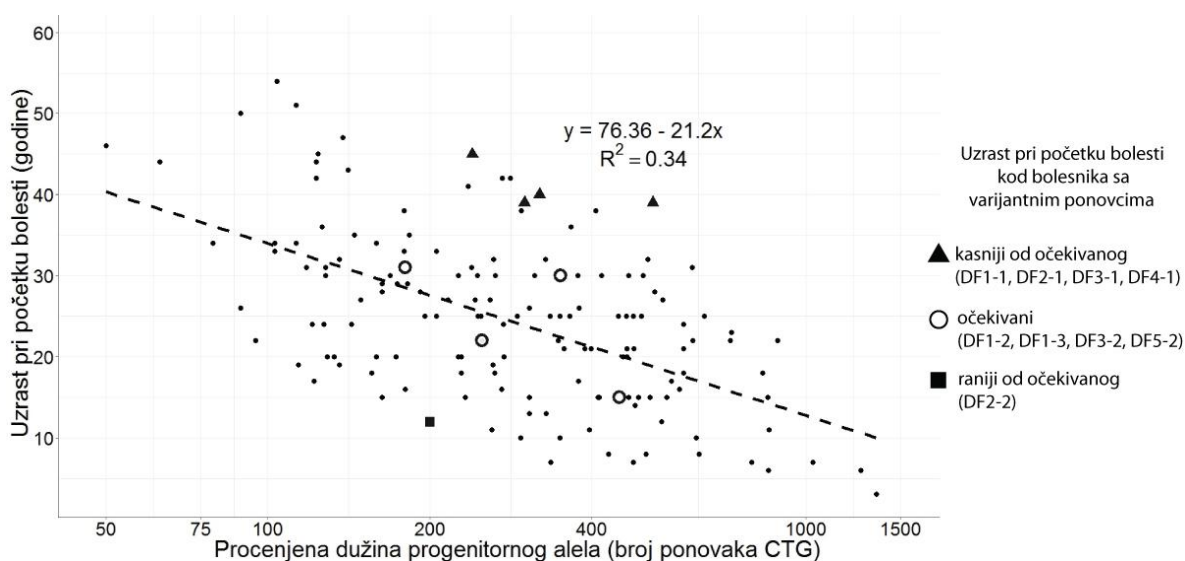
#### 4.6.2. Uticaj varijantnih ponovaka na uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika

Uticaj veličine *DMPK* ekspanzije na uzrast početka bolesti ispitan je linearnom regresijom na grupi od 143 bolesnika sa čistim CTG ponovcima. Uočena je statistički značajna negativna korelacija između uzrasta početka bolesti i dužine progenitornog alela, procenjenog kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu ( $F(1,141)=74.44$ , adjusted  $r^2=0.34$ ,  $p=1.18e^{-14}$ ) (Tabela 4.8, Slika 4.21). Prema dobijenom modelu, dužina progenitornog alela objašnjava 34% ukupne varijabilnosti u uzrastu početka bolesti kod DM1 bolesnika. Kod bolesnika DF4-1, i prve ispitivane generacije u porodicama DF1, DF2, i DF3 (bolesnici DF1-1, DF2-1 i DF3-1), od kojih svi poseduju CCG varijantne ponovke, uzrast početka bolesti je bio kasniji nego što se očekuje na osnovu dužine njihovih progenitornih alela prema dobijenom modelu linearne regresije (39 naspram očekivanih 22 kod DF4-1, 39 naspram očekivanih 19 kod DF1-1, 40 naspram očekivanih 23 kod DF2-1 i 45 naspram očekivanih 26 kod DF3-1) (Slika 4.21). Sa druge strane, bolesnik DF2-2 karakterisao se čak ranijim početkom bolesti nego što se očekuje na osnovu dužine progenitornog alela prema modelu (12 naspram očekivanih 28), dok je uzrast početka bolesti kod DF1-2, DF1-3, DF3-2 i DF5-2 bio u opsegu očekivanih vrednosti (30 naspram očekivanih 22, 15 naspram očekivanih 20, 31 naspram očekivanih 29 i 22 naspram 26, redom). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika između zapaženih i očekivanih vrednosti uzrasta početka bolesti u grupi bolesnika sa varijantnim ponovcima prema dobijenom modelu linearne regresije (Wilcoxon signed-rank test,  $V=35$ ,  $p=0,15$ ). Dobijeni rezultat ukazuje na to da se zapažen kasniji početak bolesti kod jednog broja bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama ne može objasniti dužinom progenitornog alela.

**Tabela 4.8.** Korelacija uzrasta početka bolesti (AgeOnset) sa procenjenom dužinom progenitornog alela (PAL).

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
AgeOnset = $\beta_0$	Intercept	$\beta_0 = 76,36$	6,053	12,616	$<2e^{-16}$	0,34	<b>1,18e<sup>-14</sup></b>
+ $\beta_1 \log_{10}(\text{PAL})$	$\log_{10}(\text{PAL})$	$B_1 = -21,2$	2,457	-8,628	$1,18e^{-14}$		

Model linearne regresije urađen je na grupi od 143 DM1 bolesnika za koje su genetički podaci bili dostupni iz baze Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dok su podaci za uzrast početka bolesti preuzeti iz Srpskog registra za miotonične distrofije „Aktenahten”. PAL je procenjen kao donja granica razmaza na LR-PCR-baziranom Southern blotu.



**Slika 4.21.** Negativna korelacija između dužine progenitornog alela i uzrasta početka bolesti u grupi DM1 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama iz Srbije (n=143). Dužina progenitornog alela procenjena je kao donja granica razmaza na LR-PCR baziranom Southern blotu i predstavljena je na logaritamskoj (baza 10) skali. Isprekidana linija predstavlja liniju modela linearne regresije koji je statistički značajan ( $p=1.18e^{-14}$ ) i objašnjava 34% ukupne varijabilnosti u uzrastu početka bolesti ( $R^2(\text{adj}) = 0.34$ ). Među bolesnicima sa varijantnim ponovcima, četvoro (crni trouglovi) je imalo kasniji uzrast početka bolesti nego što bi se prema modelu očekivalo na osnovu dužine progenitornog alela.



#### **4.6.3. Uticaj somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija na međuindividualne razlike u uzrastu početka bolesti kod DM1 bolesnika**

Na osnovu prethodno dobijenih rezultata, pristupilo se ispitivanju da li pokazan niži nivo somatske nestabilnosti kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama (Poglavlje 4.4.3) utiče na uzrast početka bolesti. U ovim analizama je za procenu dužine progenitornog alela uzet 10. percentil distribucije učestalosti alela, dobijene kvantifikacijom somatske nestabilnosti *DMPK* alela u ćelijama krvi primenom *single-molecule* SP-PCR-a (Tabela 8.2.4). Za procenu očekivanog uzrasta početka bolesti korišćeni su retestirani modeli linearne regresije 10\* i 11\* dobijeni na referentnoj grupi od 121 DM1 bolesnika sa čistim ekspanzijama kod kojih je, takođe, urađena kvantifikacija somatske nestabilnosti u ćelijama krvi primenom *single-molecule* SP-PCR-a (Morales et al., 2012). Prema modelu 10\*, koji uzrast početka bolesti koreliše sa dužinom progenitornog alela (Tabela 8.2.3), zapažen uzrast početka bolesti bio je od 11 do 23 godine kasniji od očekivanog kod 4 od 7 bolesnika sa varijantnim ponovcima (DF1-1, DF1-2, DF2-1 i DF3-1) (Tabela 4.9).

Model 11\*, koji uzrast početka bolesti koreliše sa dužinom progenitornog alela i rezidualnom varijansom somatske nestabilnosti dobijene iz modela 8\* (Tabela 8.2.3), pružio je nešto bolju predikciju, ali zapažen uzrast početka bolesti je i dalje bio kasniji od očekivanog (7-20 godina) kod prethodno spomenutih bolesnika (Tabela 4.9). Oba modela su pokazala blisku predikciju uzrasta početka bolesti u kontrolnoj grupi od četiri DM1 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (Tabela 4.9). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika između zapaženih i očekivanih vrednosti uzrasta početka bolesti ni u grupi bolesnika sa varijantnim ponovcima ni u kontrolnoj grupi prema modelima 10\* i 11\* (Tabela 4.9). Rezultat vezan za model 10\* je u skladu sa rezultatom dobijenim u prethodno predstavljenom modelu linearne regresije, koji koreliše uzrast početka bolesti sa dužinom progenitornog alela u grupi bolesnika iz Srbije (Poglavlje 4.6.2) i potvrđuje da dužina progenitornog alela ne objašnjava zapažen kasniji početak bolesti kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama.

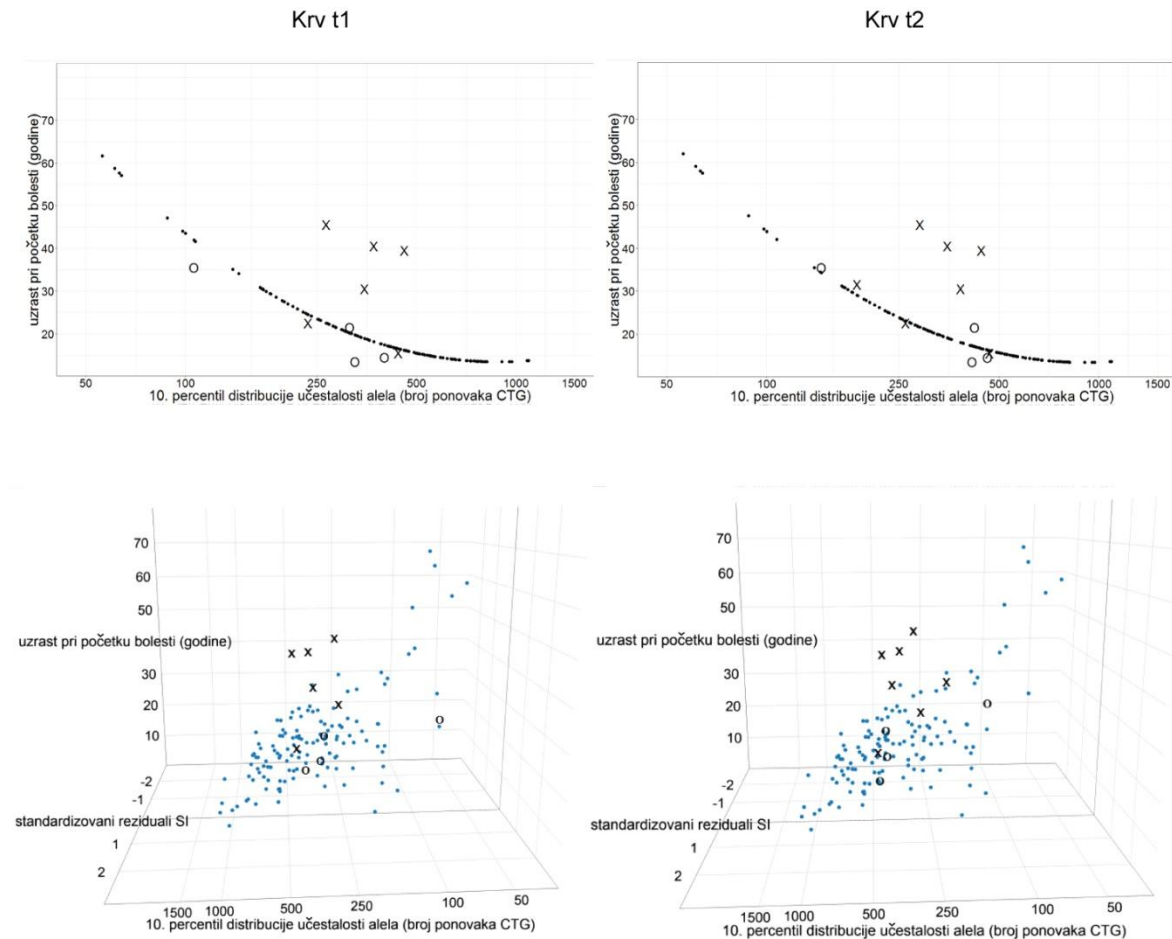
**Tabela 4.9.** Poređenje zapaženog i očekivanog uzrasta početka bolesti kod bolesnika sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama u skladu sa analizama u dvema vremenskim tačkama.

ID bolesnika	AO	Očekivani AO							
		Krv t1				Krv t2			
		E(10*)	WSRT	E(11*)	WSRT	E(10*)	WSRT	E(11*)	WSRT
DF1-1	39,5	16,2		21,9		16,6		21,3	
DF1-2	30,5	18,9		23,5		18,0		23,3	
DF1-3	15,5	16,5	V=18	18,9	V=17	16,1	V=25	18,0	V=22
DF2-1	40,5	18,2		23,2		19,1		23,7	
DF3-1	45,5	22,5	P=0,16	25,8	P=0,22	21,6	P=0,08	27,1	P=0,2
DF3-2	31,5	NA		NA		29,0		34,0	
DF5-2	22,5	24,6		31,7		23,1		28,4	
DF5-3*	21,5	20,2		20,6		17,1		19,0	
MD70*	35,5	41,9	V=1	34,0	V=3	34,3	V=5	29,5	V=6
MD179*	13,5	19,7	P=0,25	20,9	P=0,63	17,2	P=1	19,8	P=0,88
MD180*	14,5	17,4		16,3		16,2		13,8	

AO – zabeležen uzrast početka bolesti u godinama (saopšten od strane bolesnika); t1 i t2 – prva i druga vremenska tačka, redom; E(10\*) – očekivan uzrast početka bolesti prema modelu linearne regresije 10\*, koji pokazuje korelaciju između uzrasta početka bolesti i 10. percentila dužine alela (Tabela 8.2.3); E(11\*) – očekivan uzrast početka bolesti prema modelu linearne regresije 11\*, koji pokazuje korelaciju između uzrasta početka bolesti, 10. percentila dužine alela i rezidualne varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti prema modelu linearne regresije 8\* (koja se ne objašnjava 10. percentilom dužine alela i uzrastom početka bolesti) (Tabela 8.2.3); WSRT – Wilcoxon signed-rank test; V – statistika Wilcoxon signed-rank testa korišćena za poređenje zabeleženog i očekivanog uzrasta početka bolesti u svakoj grupi bolesnika. \* – kontrolna grupa.

U cilju ispitivanja međuindividualne varijabilnosti uzrasta početka bolesti, razmatrana je rezidualna varijansa u modelima 10\* i 11\* (Tabela 8.2.3). Prema modelu 10\*, bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se značajno većom rezidualnom varijansom. Naime, medijana standardizovanih reziduala bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama bila je statistički značajno veća nego u referentnoj grupi (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=147$ ,  $p=0,01$ ; druga vremenska tačka:  $W=171$ ,  $p=0,008$ ) (Slika 4.22). Kontrolna grupa nije pokazala statistički značajnu razliku (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=289$ ,  $p=0,51$ ; druga vremenska tačka:  $W=218$ ,  $p=0,74$ ) (Slika 4.22). Ovaj rezultat je ukazao na to da kod bolesnika sa varijantnim ponovcima, pored dužine progenitornog alela, postoje dodatni faktori sa značajnim doprinosom individualno-specifičnim razlikama u uzrastu početka bolesti.

S tim u vezi, dalje je razmatran model 11\* koji kao promenljivu, pored dužine progenitornog alela, uključuje rezidualnu varijansu somatske nestabilnosti prema modelu 8\* (mera za individualno-specifičnu somatsku nestabilnost koja se ne objašnjava dužinom progenitornog alela i uzrastom uzorkovanja). Zanimljivo je da, suprotno modelu 10\*, nije dobijena statistički značajna razlika u medijanama standardizovanih reziduala između bolesnika sa varijantnim ponovcima i referentne grupe (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=207$ ,  $p=0,08$ ; druga vremenska tačka:  $W=252$ ,  $p=0,07$ ) (Slika 4.22). Kontrolna grupa opet nije pokazala statistički značajnu razliku (Wilcoxon-Mann-Whitney test, prva vremenska tačka:  $W=249$ ,  $p=0,93$ ; druga vremenska tačka:  $W=204$ ,  $p=0,6$ ) (Slika 4.22). Ovaj rezultat ukazuje na to da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti mogu objasniti individualno-specifične razlike u uzrastu početka bolesti, zapažene kod bolesnika sa varijantnim ponovcima prema modelu 10\*.



**Slika 4.22. Varijantni ponovci su pozitivni genetički modifikatori uzrasta početka bolesti kod DM1 bolesnika.** Grafici korelacije uzrasta početka bolesti sa 10. percentilom dužine alela, kao merom za dužinu progenitornog alela (Higham, 2013), prema modelu 10\* (**gornji grafici**), i dodatno sa standardizovanim rezidualima somatske nestabilnosti prema modelu 11\* (**donji grafici**). Analizirana grupa DM1 bolesnika uključila je ispitivane bolesnike sa varijantnim ekspanzijama, ispitivane bolesnike sa čistim ekspanzijama (kontrolna grupa), i 121 simptomatskog bolesnika sa čistim ekspanzijama iz referentne grupe (Morales et al., 2012). Zabeležene vrednosti uzrasta početka bolesti (saopštene od strane bolesnika) prikazane su slovom X kod bolesnika sa varijantnim ekspanzijama, a slovom O kod kontrolne grupe, u prvoj (krv t1) i drugoj vremenskoj tački (krv t2) (2.5-4 godine kasnije za bolesnike sa varijantnim ekspanzijama i 4-11 godina kasnije za kontrolnu grupu). Bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se većom međuindividualnom varijabilnošću u uzrastu početka bolesti prema modelu 10\*, s obzirom na to da su pokazali veću rezidualnu varijansu i medijana njihovih standardizovanih reziduala bila je statistički značajno veća u poređenju sa referentnom grupom (**gornji grafici**). Uključivanje rezidualne varijanse somatske nestabilnosti kao promenljive (model 11\*) za rezultat je imalo odsustvo statistički značajne razlike u medijanama standardizovanih reziduala između bolesnika sa varijantnim ekspanzijama i referentne grupe (**donji grafici**), ukazujući na to da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti imaju veći uticaj na uzrast početka bolesti kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama. Jedan od faktora koji značajno doprinosi individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti su upravo varijantni ponovci (Slika 4.8). Kontrolna grupa nije pokazala razlike u skladu sa obama modelima.

Dodatno, medijana standardizovanih reziduala uzrasta početka bolesti u modelu 11\* bila je statistički značajno niža nego u modelu 10\* kod bolesnika sa varijantnim ponovcima (Wilcoxon signed-rank test, prva vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0,03$ ; druga vremenska tačka:  $V=0$ ,  $p=0,02$ ), dok to nije bio slučaj ni u kontrolnoj (Wilcoxon signed-rank test, prva vremenska tačka:  $V=6$ ,  $p=0,88$ ; druga vremenska tačka:  $V=6$ ,  $p=0,88$ ), ni u referentnoj grupi (Wilcoxon signed-rank test,  $V=3854$ ,  $p=0,67$ ). U skladu sa ovim rezultatom, individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti imaju veći uticaj na uzrast početka bolesti kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama. S obzirom na to da je prethodno pokazano da varijantni ponovci, stabilizacijom *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama, značajno doprinose individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti, posredno se može zaključiti da su varijantni ponovci faktori sa pozitivnim modifikujućim efektom na uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika.

## 5. Diskusija

Miotonična distrofija tip 1 je jedna od fenotipski najvarijabilnijih monogenских bolesti. Broj CTG ponovaka u *DMPK* ekspanzijama je glavni faktor koji određuje težinu kliničke slike DM1 bolesnika (De Antonio et al., 2016), a pretpostavlja se da dodatni faktori, kao što su genetički, epigenetički i/ili sredinski, mogu modifikovati efekat uzročne mutacije (Lamar & McNally, 2014).

Pre nepunih deset godina otkriveno je da izvestan broj DM1 bolesnika poseduje varijantne ponovke u *DMPK* ekspanzijama (Musova et al., 2009), za koje se do tada smatralo da se sastoje od perfektnih CTG ponovaka. Studije koje su usledile pokazale su da 3-5% DM1 bolesnika poseduje varijantne *DMPK* ekspanzije (Botta et al., 2017; Braida et al., 2010; Santoro et al., 2013). S obzirom na to da većina ovih bolesnika ispoljava neobične ili blage kliničke simptome i da kongenitalna forma nije opisana u takvim porodicama, varijantni ponovci se od samog otkrića razmatraju kao mogući genetički modifikatori DM1 fenotipa. Imajući u vidu da je DM1 retka bolest i da bolesnici sa varijantnim ponovcima čine manje od 5% DM1 bolesnika, klinički opis i molekularno-genetička karakterizacija svakog takvog bolesnika je značajna za sakupljanje podataka na osnovu kojih bi se rasvetlio efekat varijantnih ponovaka na nestabilnost *DMPK* ekspanzija, molekularnu patogenezu i, posledično, na kliničku prezentaciju. Ovakva saznanja doprinose objašnjenju izuzetno širokog fenotipskog spektra DM1, a njihov aplikativni značaj je u pružanju adekvatnog genetičkog saveta takvim porodicama, unapređenju načina regrutovanja bolesnika za kliničke studije i otvaranju mogućnosti za dizajn novih terapeutika.

U ovoj doktorskoj tezi urađena je pretraga varijantnih *DMPK* ekspanzija u reprezentativnoj grupi DM1 bolesnika iz Srbije. Identifikovani bolesnici su, zatim, detaljno molekularno-genetički i klinički okarakterisani. Dobijeni rezultati ukazuju na to da su CCG najčešći tip identifikovanih varijantnih ponovaka, kao i da varijantni ponovci imaju stabilisajući efekat na međugeneracijsku i somatsku nestabilnost *DMPK* ekspanzija. Dalje, prvi put je pokazano da je mutaciona dinamika varijantnih *DMPK* ekspanzija

tkivno-specifična, da su obrasci prekida stabilni u somatskim tkivima tokom vremena, da prekidi u *DMPK* ekspanzijama doprinose kasnijem ispoljavanju simptoma bolesti i da je mehanizam kojim ovo postižu genetička stabilizacija *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama. Najzad, ispitivanjem metilacije varijantnih *DMPK* ekspanzija otkriveno je da su sami varijantni CCG ponovci metilovani u ćelijama krvi, na osnovu čega je pretpostavljeno da je metilacija CpG ostrvaca uzvodno i nizvodno od ponovaka posledica lokalnog širenja metilacije, koja se inicira na samim ponovcima. Sveukupno, rezultati ove doktorske teze podvlače klinički značaj varijantnih ponovaka kao modifikatora fenotipa DM1, koji se ogleda kako kroz stabilnija međugeneracijska prenošenja *DMPK* ekspanzija nezavisno od pola roditelja tako i u njihovom stabilišućem efektu na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama, koji se odražava na progresiju bolesti.

### **5.1. Tipovi, obrasci i lokacija varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama**

*DMPK* ekspanzije sa prekidima na 3' kraju (CTG)<sub>n</sub> niza zabeležene su kod ~3% od 242 DM1 bolesnika iz Srbije. Od devet identifikovanih bolesnika, jedan je imao CTC prekid, dok su ostali imali CCG prekide. Familijarna segregaciona analiza pokazala je da je CTC prekid nastao *de novo*, što je bio prvi zabeležen slučaj *de novo* nastale varijantne *DMPK* ekspanzije. Identifikovan CTC prekid je verovatno rezultat tačkaste mutacije u čistom (CTG)<sub>n</sub> nizu, što govori u prilog hipotezi da su bazne zamene u perfektnim CTG ponovcima verovatniji izvor varijantnih ekspanzija, nego da one nastaju povećanjem broja ponovaka u dugim *wild-type* alelima sa prekidima (Brida et al., 2010). Nakon retkih događaja baznih zamena, manje promene u broju ponovaka usled proklizavanja DNK lanca (eng. *DNA strand slippage*) najverovatnije dovode do širenja varijantnih ponovaka duž *DMPK* ekspanzija. Ovu hipotezu dodatno podržavaju sasvim nedavno zabeležene porodice sa *de novo* nastalim varijantnim CCG ponovcima na 3' kraju *DMPK* ekspanzijama, u kojima su pojedinačno prisutni CCG ponovci najverovatnije spontano nastali baznom zamenom, dok su dugi nizovi CCGCTG heksamera kod dva bolesnika nastali horizontalnim širenjem varijantnih ponovaka (Cumming et al., 2018).

Kod DM1 bolesnika sa CCG prekidima, direktnim sekvenciranjem RP-PCR proizvoda, identifikovani su različiti obrasci ovih ponovaka na samom 3' kraju *DMPK* ekspanzija: pojedinačno rasuti ili kraći i duži perfektni nizovi CCG ponovaka, i pojedinačni ili pravilni nizovi CCGCTG heksamera. Osim toga, profili varijantnih *DMPK* ekspanzija, dobijeni Southern blotom nakon restriktione digestije LR-PCR proizvoda enzimom *SsiI*, ukazivali su na verovatno prisustvo dodatnih CCG ponovaka, pored onih detektovanih na samom 3' kraju ekspanzija, barem kod porodice DF2. Ovo zapažanje potvrđeno je direktnim sekvenciranjem relativno kratke, cele ekspanzije kod bolesnika DF2-2, koje je otkrilo postojanje bloka od ~40 perfektnih CCG ponovaka, pored dva pojedinačna ponovka na samom 3' kraju. Prisustvo bloka od ~36 CCG ponovaka potvrđeno je, zatim, i kod njenog oca (DF2-1) sa znatno dužom ekspanzijom, korišćenjem specifičnog kliznog prajmera za RP-PCR koji detektuje perfektne CCG ponovke.

Procenjena učestalost, tip i lokacija varijantnih ponovaka u saglasnosti su sa malim brojem publikovanih studija na grupama DM1 bolesnika iz Italije, Francuske, Škotske i Republike Češke (Botta et al., 2017; Braida et al., 2010; Cumming et al., 2018; Musova et al., 2009; Santoro et al., 2013). Sa druge strane, obrasci prekida jedinstveni su za svakog ispitivanog bolesnika ponaosob, od kojih neki imaju pojedinačni varijantni ponovak, dok neki imaju veoma složene obrasce. Sveukupno, ova studija sa prethodno citiranim ukazuje na to da su na 3' kraju *DMPK* ekspanzija CCG najčešće identifikovani prekidi, bilo kao pojedinačni, manji ili veći perfektni nizovi, ili pojedinačni ili pravilni nizovi CCGCTG heksamera.

Prisustvo varijantnih ponovaka na 5' kraju *DMPK* ekspanzija kod ispitivanih DM1 bolesnika iz Srbije nije zapaženo, i u skladu je sa generalno manjom učestalošću prekida na 5' kraju u odnosu na 3' kraj. Prekidi na 5' kraju opisani su kod svega desetak DM1 bolesnika iz Italije i Francuske (Botta et al., 2017; Tome et al., 2018). Uopšteno govoreći, učestalost varijantnih *DMPK* ekspanzija bi mogla biti i veća s obzirom na to da njihovo prisustvo u središnjem delu *DMPK* ekspanzija može ostati neotkriveno usled tehničkih ograničenja najčešće korišćene metode RP-PCR-a (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011). Ovaj problem bi mogao da se prevaziđe korišćenjem *single-molecule real-time*



(SMRT) sekvenciranja, koje predstavlja novu generaciju sekvenciranja sa prosečnom dužinom očitane sekvence od 10 do 16 kb i pogodno je za sekvenciranje GC bogatih i ponovljenih sekvenci DNK (Ardui, Ameer, Vermeesch, & Hestand, 2018). Iako ova tehnologija još uvek ima visok stepen greške (13-15%) (Ardui et al., 2018), njenom primenom je nedavno određena struktura varijantnih CCG ponovaka na 3' kraju tri *de novo* varijantne *DMPK* ekspanzije (Cumming et al., 2018).

## **5.2. Mejotička nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija i uticaj pola**

Međugeneracijska prenošenja mutiranih *DMPK* alela zavisna su od pola roditelja prenosioca. Najčešće su praćena promenom u broju CTG ponovaka koja teži daljim ekspanzijama, posebno kada je prenosilac majka sa juvenilno-adultnom formom DM1 (Harley et al., 1993; Lavedan et al., 1993; Rakocevic-Stojanovic et al., 2005). Kontrakcije se retko zapažaju i uglavnom se prenose preko oca (Ashizawa et al., 1994), dok su reverzije izuzetno retke (Brunner, Jansen, et al., 1993). Nasuprot čistim *DMPK* ekspanzijama, u ovom radu je pokazano da su prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija češće praćena stabilnim prenošenjem ili kontrakcijama među generacijama, i da ne zavise od pola roditelja prenosioca. Konkretno, praćenjem međugeneracijskih prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija zabeležena su dva stabilna prenošenja, ili čak kontrakcije, preko majke sa juvenilno-adultnom formom DM1 (porodica DF1), kao i dve kontrakcije od kojih jedna preko oca i jedna preko majke, takođe sa juvenilno-adultnom formom DM1 (porodice DF2 i DF3). Međugeneracijske promene u veličini varijantnih *DMPK* ekspanzija određene su poređenjem veličine progenitornog (potencijalno nasleđenog) alela u ćelijama krvi, procenjenog kao oštra donja granica opsega ekspanzije dobijena LR-PCR-baziranim Southern blotom (Monckton et al., 1995). Na izvesnu nesigurnost u interpretaciji dinamike međugeneracijske nestabilnosti ponovaka mogla je uticati somatska nestabilnost, koja je zavisna od uzrasta i sklona daljim ekspanzijama tokom života bolesnika. Naime, procena međugeneracijske promene u broju CTG ponovaka se zasnivala na analizama mutiranih *DMPK* alela iz ćelija krvi, tako da je promena u veličini ekspanzije predstavljala rezultat mejotičke nestabilnosti kod roditelja prenosioca, ali i mitotičke nestabilnosti u ćelijama krvi roditelja i potomaka. Zbog navedenog, ostaje otvoreno pitanje da li je veličina progenitornog alela zaista odgovarajuća mera za veličinu alela nasleđenog od roditelja.

Poređenjem 20 opisanih međugeneracijskih pronošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija (ova studija; Botta et al., 2017; Braida et al., 2010; Musova et al., 2009) sa pronošenjima čistih *DMPK* ekspanzija (ova studija; Ashizawa et al., 1994) pokazano je da se varijantne ekspanzije češće stabilno prenose ili kontrahuju i da promene u njihovoj veličini ne zavise od roditelja prenosioca. Prema navedenim nalazima, varijantni ponovci stabilizuju *DMPK* ekspanzije u polnim ćelijama. Izraženija mejotička stabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija, posebno u ženskim mejozama, može objasniti odsustvo kongenitalne forme u DM1 porodicama sa prekidima (Braida et al., 2010; Tome et al., 2018), a koju tipično prenose majke sa juvenilno-adultnom formom DM1 (Ashizawa et al., 1994). Pored DM1, stabilizujući efekat prekida na međugeneracijsko pronošenje ekspanzija opisan je kod još dve bolesti nestabilnih ekspanzija ponovaka, SCA10 i SCA17 (Gao et al., 2008; Matsuura et al., 2006).

Molekularni mehanizmi mejotičke nestabilnosti mutiranih *DMPK* alela nisu dovoljno istraženi. Uopšteno govoreći, sklonost nekog niza ponovaka ka ekspanziji ili kontrakciji, kako u polnim tako i u somatskim ćelijama, je posledica njegove primarne sekvence, koja omogućava formiranje različitih ne-B sekundarnih DNK struktura i lokacije u genomu, u smislu efekata okolnih sekvenci i udaljenosti od mesta početka replikacije (Pearson, Nichol Edamura, & Cleary, 2005). Ne-B sekundarne strukture mogu nastati u svim procesima koji podrazumevaju razdvajanje lanaca molekula DNK: replikacija, popravke oštećenja DNK, rekombinacija i transkripcija. Još uvek nije razjašnjeno zašto postoje razlike u dinamici nestabilnosti *DMPK* alela u muškim i ženskim polnim ćelijama. Osim veličine ekspanzije, smatra se da na njih mogu uticati faktori specifični za pol, koji čine sastavni deo mehanizama uključenih u metabolizam DNK (Savic Pavicevic et al., 2013).

DM1, kao i većina bolesti nestabilnih ekspanzija ponovaka, odlikuje se anticipacijom, gde se teži simptomi bolesti pojavljuju u ranijem uzrastu u svakoj sledećoj generaciji. U osnovi ovog fenomena leže mejotička nestabilnost mutiranih alela, sklonih daljim ekspanzijama, kao i korelacija između broja ponovaka sa uzrastom početka bolesti (Hamshere et al., 1999; Harley et al., 1993; Salehi et al., 2007; Savic et al., 2002) i težinom

kliničke slike (De Antonio et al., 2016). Takođe, opisane su retke međugeneracijske kontrakcije *DMPK* ekspanzija praćene anticipacijom, posebno nakon prenošenja sa majke (Ashizawa et al., 1994). Zanimljivo je da je u ovoj studiji anticipacija, definisana kao raniji uzrast početka bolesti, zapažena u svim ispitivanim međugeneracijskim prenošenjima varijantnih *DMPK* ekspanzija koja nisu praćena povećanjem broja ponovaka (porodice DF1, DF2, DF3). Slično, Botta i saradnici (2017) zapažaju raniji uzrast početka bolesti nakon kontrakcija u dvema porodicama sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama. Međutim, zanimljiva je i činjenica da nije primećena kongenitalna forma bolesti u četirima generacijama velike DM1 porodice, u kojoj su varijantni *DMPK* aleli trpeli samo male ekspanzije (Braidia et al., 2010). Osim toga, pokazano je da su skoro sva međugeneracijska smanjenja u veličini varijantnih *ATXN10* ekspanzija, povezanih sa SCA10, praćena ranijim uzrastom početka bolesti (McFarland et al., 2013). Sa druge strane, anticipacija nije zapažena u SCA17 porodicama sa varijantnim *TBP* ekspanzijama (Gao et al., 2008). Sveukupno, nalazi kod DM1 i SCA10 porodica sa varijantnim ekspanzijama otvaraju pitanje postojanja dodatnih faktora, pored povećanja broja ponovaka, koji utiču na ispoljavanje anticipacije u porodicama sa bolestima nestabilnih ekspanzija ponovaka.

### **5.3. Mitotička nestabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija: tkivna specifičnost, stepen nestabilnosti i progresija tokom vremena**

Razmaz na LR-PCR-baziranom Southern blotu nedvosmisleno je ukazao da se varijantne *DMPK* ekspanzije, kao i čiste, odlikuju somatskom nestabilnošću. Laboratorijski veoma zahtevnom metodom *single-molecule* SP-PCR-a urađena je detaljna kvantifikacija nivoa somatskog mozaicizma kod DM1 bolesnika, što je omogućilo ispitivanje efekata varijantnih ponovaka na somatsku nestabilnost, a zatim i na uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima u poređenju sa reprezentativnom referentnom grupom od ~130 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama. Procena dužine progenitornog alela kao oštre donje granice opsega ekspanzije, prilikom korišćenja *single-molecule* SP-PCR-a, nije bila dovoljno jasna i nedvosmislena kao kada je korišćen LR-PCR. Iz tog razloga, korišćen je 10. percentil distribucije učestalosti alela (Higham, 2013) i dobijene su slične dužine progenitornih alela. Ovakav način procene dužine progenitornog alela

zahtevao je da se u referentnoj grupi bolesnika ponovo testiraju korišćeni modeli linearne regresije (Morales et al., 2012), uzimajući u obzir 10. percentil distribucije učestalosti alela kao promenljive. Retestirani modeli linearne regresije objasnili su skoro identičan procenat varijabilnosti somatske nestabilnosti i uzrasta početka bolesti kao i originalni modeli (Morales et al., 2012). Na ovaj način, pokazano je da je 10. percentil dobra i objektivna mera dužine progenitornog alela, kao i da originalno proučavana velika grupa bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (Morales et al., 2012) može biti korišćena kao reprezentativna referentna grupa za poređenja somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija i uzrasta početka bolesti kod DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima. S obzirom na to da je ograničen broj bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama bio dostupan za ovu studiju, kvantifikacija somatske nestabilnosti u dvema vremenskim tačkama, praćena istim rezultatima u statističkim analizama, bila je potvrda za verodostojnost dobijenih rezultata. Testiranje kontrolne grupe DM1 bolesnika, koji nisu posedovali prekide u ekspanziji i nisu bili upareni po veličini ekspanzije i uzrastu uzorkovanja, pokazalo je da primenjeni modeli linearne regresije dobro uklapaju (fituju) podatke (Martorell et al., 1998; Morales et al., 2012). Time je analiza kontrolne grupe dodatno potvrdila verodostojnost dobijenih rezultata i pokazala odsustvo mogućih razlika specifičnih za populacije u odnosu na referentnu grupu.

Primenjen pristup u izučavanju somatske nestabilnosti i uzrasta početka bolesti kroz detaljnu kvantifikaciju somatskog mozaicizma i korišćenje podataka velike referentne grupe sa čistim *DMPK* ekspanzijama, nudi prednost za buduće studije na većem broju DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima, jer ne zahteva istovremenu analizu bolesnika sa čistim ekspanzijama uparenu po veličini ekspanzije i uzrastu uzorkovanja. Sličan pristup izučavanju somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija koristili su Braida i saradnici (2010), sa razlikom u načinu procene dužine progenitornog alela (Monckton et al., 1995) i bez korišćenja kontrolne grupe. Dve sasvim nedavno objavljene studije poredile su profile SP-PCR-a (Tome et al., 2018), odnosno stepen somatske nestabilnosti određen razlikom između modalne i progenitorne dužine alela (Cumming et al., 2018), kod nekoliko bolesnika sa prekidima u odnosu na nekoliko bolesnika sa čistim ekspanzijama, uparenih

po veličini ekspanzije i uzrastu. Međutim, ograničenje ovakvog pristupa je dostupnost bolesnika sa varijantnim i čistim ekspanzijama uparenih po veličini ekspanzije i starosnoj dobi, i što je važnije, zanemarivanje postojanja velike varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti, koja nije određena samo veličinom ekspanzije i starosnom dobi. U tom smislu, važna dodatna prednost našeg pristupa jeste poređenje somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija sa somatskom nestabilnošću čistih ekspanzija iz velike grupe bolesnika, koja sigurno bolje odražava varijabilnost u somatskoj nestabilnosti koja se zapaža kod DM1 bolesnika.

Uočene distribucije učestalosti alela, koje se odlikuju nagnutošću ka većim dužinama alela i razlikama između dveju vremenskih tačaka u ćelijama krvi, kao i između ćelija krvi i bukalne sluznice kod svakog bolesnika, ukazuju na to da somatski mozaicizam varijantnih *DMPK* ekspanzija ima odlike slične čistim ekspanzijama: sklonost ka daljem povećanju broja ponovaka tokom života bolesnika, zavisnost od starosne dobi bolesnika i tkivnu specifičnost (Martorell et al., 1998; Monckton et al., 1995; Wong et al., 1995). Međutim, osnovna razlika u njihovoj mutacionoj dinamici u somatskim ćelijama je da su varijantne *DMPK* ekspanzije stabilnije. Rezultati ove studije pokazuju da se *DMPK* ekspanzije sa prekidima odlikuju različitom mutacionom dinamikom u ćelijama krvi i bukalne sluznice, na koju verovatno utiču tip i struktura varijantnih ponovaka, ali i dodatni faktori karakteristični za ispitivane porodice. Zbog malog broja analiziranih bolesnika i dostupnih uzoraka, tkivna-specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih ekspanzija zahteva dalje izučavanje. Imajući u vidu manje izražene mišićne simptome kod bolesnika sa prekidima, posebno bi od značaja bilo okarakterisati mutacionu dinamiku varijantnih ekspanzija u ćelijama skeletnih mišića.

Bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovali su se nižim nivoom heterogenosti dužine alela u ćelijama krvi nego što se očekuje za odgovarajuće dužine progenitornih alela sa čistim CTG ponovcima i uzrast uzorkovanja, prema modelu koji koreliše somatsku nestabilnost sa veličinom ekspanzije i uzrastom uzorkovanja (model 8\*). Negativni standardizovani reziduali ovog modela, dobijeni za većinu bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama dodatno potvrđuju sniženi nivo somatske nestabilnosti i

ukazuju na postojanje individualno-specifičnih faktora koji doprinose sniženom nivou somatske nestabilnosti. S obzirom na to da su varijantni ponovci zajednička odlika ovih bolesnika, uočene individualno-specifične razlike mogu se pripisati upravo varijantnim ponovcima, pre svega, usled njihovog stabilizujućeg efekta na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama. Prethodno navedeni rezultat ukazuje na to da se varijantni ponovci mogu smatrati individualno-specifičnim, genetičkim modifikatorima somatske nestabilnosti mutiranih *DMPK* alela. Sličan rezultat zabeležen je za članove porodice sa *DMPK* ekspanzijama sa višestrukim GGC i CCG prekidima na 3' kraju u odnosu na referentnu grupu koja je korišćena i u ovoj studiji (Braidia et al., 2010), iako se ne može isključiti efekat drugih faktora karakterističnih za ovu porodicu, koji potencijalno utiču na varijabilnost u somatskoj nestabilnosti (Morales et al., 2012).

Rezultati naše studije dalje pokazuju da se bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikuju manjim povećanjem veličine ekspanzije u ćelijama krvi tokom vremena nego što se očekuje za odgovarajuće dužine čistih *DMPK* alela i vremenski interval između uzorkovanja. Tri ispitivana bolesnika odlikovala su se čak relativnom stabilnošću varijantnih *DMPK* ekspanzija tokom vremena. Bolesnica sa jednim *de novo* nastalim CTC prekidom (DF5-2) pokazala je manje povećanje veličine ekspanzije tokom istog vremenskog intervala u poređenju sa sestrom (DF5-3), koja ima sličnu veličinu ekspanzije, ali bez prekida. Manje povećanje u veličini ekspanzije kod naših bolesnika sa prekidima na 3' kraju ekspanzije u skladu je sa nalazom za dva DM1 bolesnika sa prekidima na 5' kraju ekspanzije (Tome et al., 2018).

Sveukupno, nalazi naše studije proširuju prethodna saznanja o mutacionoj dinamici varijantnih *DMPK* ekspanzija i, zajedno sa prethodnim studijama (Braidia et al., 2010; Cumming et al., 2018; Tome et al., 2018), ukazuju na to da različiti tipovi i strukture varijantnih ponovaka na oba kraja ekspanzije, uključujući i pojedinačne *de novo* nastale prekide, doprinose genetičkoj stabilnosti *DMPK* lokusa u somatskim ćelijama. Prekidi su, takođe, identifikovani i u ekspanzijama povezanim sa SCA8 (Hu et al., 2017; Moseley et al., 2000), SCA10 (Matsuura et al., 2006) i SCA17 (Gao et al., 2008). Međutim, njihov uticaj na somatsku nestabilnost proučavan je samo kod SCA17 bolesnika, gde je pokazana veća stabilnost *TBP* ekspanzija sa CAA prekidima u odnosu na čiste ekspanzije (Gao et al., 2008).

#### **5.4. Efekat varijantnih ponovaka na stabilizaciju i metilaciju *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama**

Veća stabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama je posledica *in cis* stabilizujućeg efekta varijantnih ponovaka na samom 3' kraju ekspanzije, ali i preostalog dela (5' kraja) varijantne ekspanzije. Preciznije, uočene su identične strukture prekida na 3' kraju *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi i bukalne sluznice, kao i u ćelijama krvi tokom vremena. Ova odlika somatskih tkiva je u suprotnosti sa germinativnim tkivima, s obzirom na to da su zabeležene međugeneracijske promene u strukturi prekida (naša porodica DF2 i dve porodice opisane u studiji Musova et al. (2009)). Iako varijantni ponovci ne ukidaju u potpunosti nestabilnost *DMPK* lokusa u somatskim ćelijama, preostali deo varijantnih ekspanzija je, takođe, stabilniji nego što se očekuje za odgovarajuću veličinu *DMPK* alela sa čistim CTG ponovcima i uzrast uzorkovanja. Ovo zapažanje je opisano za *DMPK* ekspanzije sa višestrukim GGC i CCG prekidima (Braidia et al., 2010), i u skladu sa našim saznanjima, moglo bi da predstavlja opštu osobinu *DMPK* ekspanzija sa različitim tipom i obrascima prekida, barem na 3' kraju. Osim toga, ova stabilnost održava se tokom vremena u ćelijama krvi, imajući u vidu da se 5' kraj varijantnih *DMPK* ekspanzija odlikovao manjim povećanjem veličine ekspanzije tokom vremena nego što se očekuje na osnovu dužine čistih *DMPK* ekspanzija i vremenskog intervala između uzorkovanja. Faktori koji doprinose individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti kod DM1 bolesnika uglavnom nisu poznati. Rezultati ove studije ukazuju na to da su varijantni ponovci *in cis* delujući genetički faktori koji stabilišu *DMPK* lokus u somatskim ćelijama, i time doprinose individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti kod DM1 bolesnika. Među genetičkim faktorima koji stabilišu *DMPK* lokus u somatskim ćelijama, prethodno je jedino opisana tačkasta varijanta u genu *MSH3* (deo sistema za reparaciju pogrešnih baznih parova) kao *in trans* delujući modifikator (Morales et al., 2016).

Sposobnost varijantnih ponovaka da utiču na strukturu mutagenih intermedijera formiranih od strane CTG/CAG ponovaka, kao što su proklizane DNK (eng. *slipped DNAs*) i R petlje (eng. *R-loops*) (Axford et al., 2013; Pearson et al., 2002; Reddy et al., 2014), je najverovatniji mehanizam kojim se održava lokalna stabilnost onog dela *DMPK* ekspanzije koji sadrži prekide. Nakon topljenja DNK, ekspanđovani CTG/CAG ponovci inherentno formiraju strukture ukosnica i malih petlji (eng. *loop outs and slip outs*) koje povećavaju sklonost ka nastajanju proklizanih DNK (Pearson & Sinden, 1996; Pearson et al., 2002). Osim toga, mogu se formirati stabilni DNK-RNK hibridi (R petlje) različitih konfiguracija tokom procesa unidirekcionne i bidirekcionne transkripcije duž nestabilnih ponovaka (Reddy et al., 2014; Su & Freudenreich, 2017), koja odlikuje kako čiste tako i prekinute CTG nizove u *DMPK* lokusu (Cho et al., 2005; Tome et al., 2018). Obrada R petlji može doprineti nestabilnosti lokusa ili direktno ili posredno, formiranjem struktura proklizanih DNK nakon uklanjanja RNK iz DNK-RNK hibrida. Nemogućnost sistema za popravku pogrešno sparenih baza, kao i drugih sistema za poravku DNK, da otklone strukture proklizanih DNK, naročito one strukture koje sadrže grupisane male petlje (Panigrahi, Slean, Simard, Gileadi, & Pearson, 2010), može dovesti do promene u dužini ponovljenog niza (Schmidt & Pearson, 2016). Proklizane DNK koje sadrže grupisane male petlje različitih dužina zabeležene su u različitim tkivima DM1 bolesnika (Axford et al., 2013), što podržava njihovu ulogu u somatskoj nestabilnosti. Usled različitog kapaciteta baznog sparivanja, varijantni ponovci imaju destabilišući efekat na male petlje, smanjujući na taj način ukupnu količinu proklizanih DNK i ograničavajući ukupan broj specifično formiranih izomera (Pearson et al., 1998). Dodatno, u ćelijama kvasca prisustvo varijantnih ponovaka u ukosnicama može olakšati popravku ovih struktura nakon prepoznavanja pogrešnih baznih parova usled prisustva prekida (Rolfmeier, Dixon, & Lahue, 2000).

Mehanizmi koji doprinose povećanoj stabilnosti dela varijantne *DMPK* ekspanzije koji ne sadrži ponovke (5' kraj) nisu poznati i mogu uključivati neke od epigenetičkih mehanizama. Može se pretpostaviti da varijantni ponovci menjaju pozicioniranje nukleozoma, s obzirom na to da su CTG ponovci u *DMPK* lokusu snažni signali za pozicioniranje nukleozoma (Y. H. Wang, Amirhaeri, Kang, Wells, & Griffith, 1994), dok



CAT prekidi u *ATXN1* ekspanzijama značajno smanjuju njihovu sposobnost formiranja nukleozoma (Mulvihill, Nichol Edamura, Hagerman, Pearson, & Wang, 2005). Zanimljivo je da CCG/GGC ponovci, najčešći u varijantnim *DMPK* ekspanzijama, preferencijalno isključuju formiranje nukleozoma (Mulvihill et al., 2005; Y. H. Wang, Gellibolian, Shimizu, Wells, & Griffith, 1996). Izmenjeno pozicioniranje nukleozoma može uticati na verodostojnost procesa metabolizma DNK uključenih u nestabilnost ponovaka (Cleary & Pearson, 2003), kao i na delovanje okolnih *cis* elemenata koji doprinose nestabilnosti *DMPK* lokusa (Brock, Anderson, & Monckton, 1999; Gourdon et al., 1997).

Imajući u vidu da su CTG ponovci u genu *DMPK* umetnuti u veliko CpG ostrvo na hromozomskom lokusu 19q13.3, u kome su geni gusto raspoređeni (Brock, Anderson, & Monckton, 1999), varijantni ponovci bi svoj uticaj na somatsku stabilnost *DMPK* ekspanzija mogli ostvarivati kroz povezanost sa metilacijom DNK, još jednim epigenetičkim mehanizmom. Zaista, polarizovana hipermetilacija CpG ostrvaca u nizvodnom regionu od CTG ponovaka opisana je kod DM1 bolesnika sa različitim obrascima CCG ponovaka na 3' kraju ekspanzije (Santoro et al., 2015). Imajući u vidu da se hipermetilacija nizvodnog regiona retko zapaža kod juvenilno-adultnih DM1 bolesnika (Barbe et al., 2017), rezultat Santoroa i saradnika (2015) povezuje prisustvo CCG ponovaka sa promenom epigenetičkih oznaka u *DMPK* lokusu. Sa druge strane, hipermetilacija okolnih CpG ostrvaca nije detektovana u dvema DM1 porodicama sa relativno stabilnim i malim ekspanzijama koje su posedovale tri CCG, odnosno pojedinačni CAG prekid na 5' kraju (Tome et al., 2018). Ovi rezultati nagoveštavaju da bi metilacija DNK u *DMPK* lokusu sa varijantnim ponovcima mogla da zavisi od tipa, obrasca i lokacije (5' ili 3' kraj) varijantnih ponovaka, kao i od veličine ekspanzije. S obzirom na to da se navedene *DMPK* ekspanzije sa varijantnim ponovcima na 5' kraju odlikuju većom somatskom stabilnošću i odsustvom hipermetilacije, pretpostavljeno je da metilacija DNK verovatno nije jedini mehanizam somatske stabilizacije varijantnih *DMPK* ekspanzija (Tome et al., 2018). Zbog malog broja ispitanih bolesnika, sledeća pitanja vezana za izmenjenu strukturu hromatina ostaju otvorena: 1) da li je ona uzrok povećane genetičke stabilnosti, 2) da li je ona posledica prisustva varijantnih ponovaka i 3) da li je ona jednostavno posledica efekata

širenja metilacije DNK inicirane na nekom drugom mestu. Pretpostavka o doprinosu metilacije DNK povećanoj stabilnosti CTG ponovaka podržana je rezultatima dobijenim u *E. coli*-baziranom *in vivo* metilacionom sistemu. Naime, metilacija CpG ostrvaca u okolnim sekvencama, u kloniranim fragmenatima DM1 bolesnika, imala je blago-stabilišući efekat na CTG ekspanzije, koji se ogledao u smanjenju broja velikih delecija i češćoj stabilnoj propagaciji retkih velikih ekspanzija (Nichol & Pearson, 2002). Prvi odgovori na druga dva pitanja dobijeni su upravo kroz ovu studiju, jer rezultati ukazuju na to da se DNK metilacija koncentriše na samim CCG ponovcima, odakle se može širiti u uzvodnim i nizvodnim regionima u odnosu na ekspanziju u *DMPK* lokusu, zavisno od obrasca i zastupljenosti CCG ponovaka.

U ovoj studiji otkriveno je da su sami varijantni CCG ponovci na 3' kraju *DMPK* ekspanzija metilovani. Iako su korišćene metode kvalitativne, moglo se uočiti da su varijantni CCG ponovci heterogeno metilovani u ćelijama krvi, pri čemu relativan stepen metilacije zavisi od zastupljenosti i obrasca samih CCG ponovaka. Tako, većinski metilovani CCG ponovci detektovani su kod bolesnika sa pravilnim CCG nizom od nekoliko desetina ponovaka (porodica DF2) i bolesnika sa rasutim CCGCTG heksamerima i kraćim nizovima perfektnih CCG ponovaka (bolesnik DF4-1), dok su delimično metilovani CCG ponovci zapaženi kod bolesnika sa manjim brojem CCGCTG heksamera (porodica DF1) i manjim brojem perfektnih CCG nizova (porodica DF3). Za razliku od heterogene metilacije CCG ponovaka u varijantnim *DMPK* ekspanzijama, ponovci u *FMRI* ekspanzijama dužim od 200 ponovaka i *C9ORF72* ekspanzijama dužim od 90 ponovaka su većinski metilovani i prisutni su kod skoro svih bolesnika (Oberle et al., 1991; Xi et al., 2015). Iako rezultati ukazuju na to da veličina varijantnih *DMPK* ekspanzija izgleda ne utiče na stepen metilacije CCG ponovaka, na osnovu analiziranih slučajeva nije moguće sa sigurnošću doneti zaključak. U skladu sa zapažanjem za metilaciju CCG i G4C2 ponovaka u *FMRI* i *C9ORF72* ekspanzijama (Oberle et al., 1991; Xi et al., 2015), metilacija CCG ponovaka u genu *DMPK* je takođe nezavisna od starosti bolesnika.

U *DMPK* lokusu sa varijantnim ekspanzijama, heterogena metilacija DNK detektovana je i u okolnim CpG ostrvcima. Zapažanje da relativni stepen metilacije okolnih CpG ostrvaca zavisi od zastupljenosti i obrasca CCG ponovaka, baš kao i sama metilacija CCG ponovaka, navodi na poveznost ovih procesa, zbog čega je pretpostavljeno da se metilacija DNK inicira i koncentriše na samim CCG ponovcima, odakle se lokalno širi na uzvodna i nizvodna CpG ostrvca. Tako se kod bolesnika sa većinski metilovanim CCG ponovcima (porodica DF2), 5' ivica metilovanog regiona nalazila u uzvodnim CpG ostrvcima, sa zahvaćenim mestom CTCF1, dok je 3' ivica dosegla nizvodna CpG ostrvca sa zahvaćenim mestom CTCF2. Kod ostalih bolesnika, u skladu sa tipom i zastupljenošću CCG ponovaka i slično zapažanjima Santoroa i saradnika (2015), metilacija je bila prisutna samo u nizvodnim CpG ostrvcima ili nije detektovana. Zapažanja na analiziranim bolesnicima, kao i zapažanja na novoidentifikovanim bolesnicima sa varijantnim CCG ponovcima koja nisu predstavljena u ovom radu, sugerišu da sama veličina varijantne *DMPK* ekspanzije izgleda ne utiče na lokalno širenje metilacije, što je u suprotnosti sa pretpostavkom Tome i saradnika (2018).

Širenje epigenetičkih oznaka, uključujući metilaciju DNK, je poznat fenomen (Jones & Takai, 2001). Povezanost procesa metilacije ponovaka i okolnih sekvenci opisano je za lokuse *C9ORF72* i *FMRI*, kod kojih i sami ponovci podležu metilaciji (Oberle et al., 1991; Xi et al., 2015). U *FMRI* lokusu DNK metilacija se širi od 5' uzvodnog regiona ka nizvodnom promotoru i CGG ponovcima (Naumann, Hochstein, Weber, Fanning, & Doerfler, 2009). Sličnije metilaciji u *DMPK* lokusu sa varijantnim ekspanzijama, metilacija u *C9ORF72* lokusu koncentriše se na samim ponovcima na 5' kraju ekspanzije, njena 5' ivica može dosezati do uzvodnih CpG ostrvaca, dok se njena 3' ivica nalazi negde u okviru same ekspanzije (Xi et al., 2015; Xi et al., 2013). Sveukupno, rezultati vezani za *C9ORF72* i *DMPK* ekspanzije ukazuju na sposobnost GC-bogatih ponovaka da iniciraju (zasejavaju) DNK metilaciju, koja se može lokalno širiti na način specifičan za dati lokus.

Mehanizmi DNK metilacije kako u čistim *DMPK* ekspanzijama, povezanim sa kongenitalnom formom bolesti (Barbe et al., 2017; Steinbach et al., 1998), tako i u varijantnim *DMPK* ekspanzijama juvenilno-adultnih bolesnika, još uvek nisu poznati i ne moraju nužno biti isti. Jedan od potencijalnih mehanizama vezan je za bidirekcionu transkripciju kroz ponovke u *DMPK* lokusu i male interferirajuće RNK, koje se stvaraju sa prepisanih transkripata (Cho et al., 2005; Tome et al., 2018).

Metilacija GC bogatih ponovaka i okolnih sekvenci mogla bi da predstavlja dodatni mehanizam molekularne patogeneze. Fenotipske posledice statusa metilacije ispitivane su kod FRAXA, ALS i FTD. Kognitivna narušenja kod FRAXA dečaka ne zavise od veličine ekspanzije (de Vries et al., 1996), već od statusa metilacije CGG ponovaka (Wohrle et al., 1998). Studije na malim grupama bolesnika ukazuju na to da 5' (uzvodna) metilacija u genu *C9ORF72* inverzno koreliše sa trajanjem bolesti kod ALS bolesnika (Xi et al., 2013), dok je, suprotno, kod FTD bolesnika asocirana sa dužim preživljavanjem (Russ et al., 2015). Za donošenje zaključka o efektu metilacije *DMPK* lokusa na fenotip bolesnika sa varijantnim ponovcima, potrebna je njena karakterizacija na većoj grupi bolesnika sa detaljnim fenotipskim podacima. Međutim, svakako je zanimljivo da je metilacija zapažena kod DM1 bolesnika sa najtežom formom bolesti (kongenitalnom) i kod bolesnika sa varijantnim ponovcima, čiji je fenotip blaži nego što se očekuje na osnovu veličine ekspanzije.

## **5.5. Uticaj varijantnih ponovaka na kliničku prezentaciju miotonične distrofije tip 1**

Naši rezultati podržavaju zapažanje da bolesnici sa varijantnim ponovcima ispoljavaju blaže i/ili neobične simptome (Botta et al., 2017; Musova et al., 2009). Iako je klinička prezentacija kod većine ukazivala na DM1, iznenađujuća je činjenica da je kod nekoliko bolesnika primećena hipertrofija listova (DF1-2 i DF1-3) i izraženija slabost proksimalne muskulature (DF3-1 i DF4-1), simptomi tipični za DM2 (Udd & Krahe, 2012). Na primer, bolesnici DF3-1 i DF4-1 bili su klinički suspekti na DM2 i da su bili testirani samo na DM2 mutaciju, prava dijagnoza bi bila propuštena. Dodatno, bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama imali su sporiju progresiju mišićne slabosti i samo blagu perkusionu

miotoniju, koja je po pravilu veoma izražena kod DM1 (Miller, 2008). Prema našim rezultatima, početna klinička sumnja na DM2 i odsustvo ili blaga perkusiona miotonija bili su statistički češće zastupljeni u grupi bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama nego u grupi sa čistim. Kognitivno narušenje nije primećeno ni kod jednog bolesnika koji je prošao neuropsihološko testiranje korišćenjem baterije testova ACE-R (srednja vrednost 91.8), iako čak dve trećine DM1 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama ima kognitivno narušenje sa srednjom ACE-R vrednošću od 79 poena (Peric et al., 2015). Studija na DM1 bolesnicima sa varijantnim ponocima iz Italije ističe odsustvo kognitivnih simptoma kao jedini atipični simptom (Santoro et al., 2013).

Upadljivo je bilo da su se četiri (DF1-1, DF2-1, DF3-1, DF4-1) od devet ispitivanih bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama odlikovala relativno kasnim uzrastom početka bolesti. Ipak, prema modelima linearne regresije koji korelišu uzrast početka bolesti sa veličinom progenitornog alela nije bilo razlike između zapaženog i očekivanog uzrasta početka bolesti. Dobijeni rezultati ne iznenađuju, ako se ima u vidu da se uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika odlikuje velikom varijabilnošću, a da dužina progenitornog alela, prema primenjenim modelima linearne regresije, objašnjava 34%, odnosno 49% te varijabilnosti. Dakle, pored broja ponovaka u genu *DMPK*, postoje i drugi faktori koji utiču na uzrast početka bolesti kod datog DM1 bolesnika. Tako, pretpostavka da se DM1 simptomi klinički ispoljavaju kada dovoljan broj ćelija stekne dovoljno duge ekspanzije da uzrokuju disfunkciju na nivou tkiva, potvrđena je studijom na grupi bolesnika koja je pokazala da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija doprinose varijabilnosti uzrasta početka bolesti (Morales et al., 2012). Slična pretpostavka predložena je za HD i poznata je kao model somatskog praga (Budworth et al., 2015). Ona podrazumeva da se HD simptomi javljaju nakon što somatski nestabilne CAG ekspanzije u genu *HTT* počnu da proizvode protein i/ili RNK dovoljne dužine da ispolje toksičan efekat. Model somatskog praga je, takođe, potvrđen studijom na bolesnicima koja je pokazala da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti *HTT* ekspanzija doprinose varijabilnosti uzrasta početka bolesti (Swami et al., 2009).

U ovom radu je pokazano da individualno-specifične razlike u nivou somatske nestabilnosti daju veći doprinos uzrastu početka bolesti kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama u odnosu na one sa čistim. Uopšteno govoreći, DM1 bolesnici sa varijantnim ponovcima imaju predispoziciju da bolest razviju kasnije, usled sporijeg povećanja veličine ekspanzija u somatskim ćelijama. S obzirom na to da varijantni ponovci značajno doprinose individualno-specifičnim razlikama u nivou somatske nestabilnosti i stabilišu *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama, ova studija je prva koja ukazuje na to da su varijantni ponovci faktori koji pozitivno modifikuju uzrast početka bolesti.

Kasniji uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika sa varijantnim ponovcima zabeležen je i u drugim studijama (Botta et al., 2017; Musova et al., 2009), kao i kod SCA8 bolesnika sa prekidima u *ATXN8OS* ekspanzijama (Hu et al., 2017). Kod HD bolesnika, uticaj varijabilnosti u nivou somatske nestabilnosti na varijabilnost uzrasta početka bolesti pokazan je u primarno zahvaćenom tkivu (korteks) (Swami et al., 2009). Sa druge strane, u ovoj i u drugim studijama, kod DM1 bolesnika analize su vršene u ćelijama krvi, dok je primarno zahvaćeno tkivo mišića i ono se odlikuje izraženijom somatskom nestabilnošću u odnosu na ćelije krvi (Nakamori et al., 2013; Zatz et al., 1995). Međutim, ispitivanje genetičkih modifikatora u nezahvaćenom tkivu može se opravdati pretpostavkom da su genetički faktori zajednički za sva tkiva. Postojanje dodatnih faktora koji utiču na individualno-specifične razlike u uzrastu početka bolesti moglo bi takođe objasniti zašto je međugeneracijska nestabilnost, sklona daljim kontrakcijama u porodicama DF1, DF2 i DF3 iz ove studije i u dvema porodicama opisanim u studiji Botte i saradnika (2017), ipak bila praćena genetičkom anticipacijom, odnosno ranijim uzrastom početka bolesti.

Rezultat ove studije da prekidi u ekspanziji mogu pozitivno modulirati uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika, usled stabilišućeg efekta na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama, u skladu je sa nalazom da supresija somatske nestabilnosti CAG ekspanzija značajno odlaže početak simptoma u mišjim HD modelima, koji poseduju deleciju određenih gena uključenih u procese reparacije DNK (*Ogg1*, *Msh2* i *Msh3*) (Budworth et al., 2015; Dragileva et al., 2009; Wheeler et al., 2003). Osim toga, kod HD bolesnika i bolesnika sa drugim poliglutaminskim bolestima, tačkaste varijante u genima za

proteine uključene u procese reparacije DNK identifikovane su kao genetički modifikatori uzrasta početka bolesti, najverovatnije uticajem na somatsku nestabilnost (Bettencourt et al., 2016; Genetic Modifiers of Huntington's Disease, 2015).

Pored stabilizujućeg efekata varijantnih ponovaka na *DMPK* lokus u somatskim ćelijama, pokazanog u ovoj studiji, drugi molekularni mehanizmi kojima varijantni ponovci doprinose neobičnoj kliničkoj prezentaciji nisu poznati. Pretpostavljeno je da bi promene u sekvenci (CTG)<sub>n</sub> niza mogle izmeniti osobine strukture ukosnica koje formira mutirana RNK, delujući tako na njenu toksičnu funkciju i, posledično, na fenotip. Međutim, bioinformatička predviđanja su pokazala da različiti obrasci CCG i CTG ponovaka formiraju slične sekundarne strukture RNK, bez efekta na afinitet za vezivanje proteina MBNL (Braidia et al., 2010). Ovaj nalaz podržavaju rezultati studije koja je pokazala postojanje nukleusnih fokusa u mišićnim biopsijama DM1 bolesnika sa varijantnim ekspanzijama, kao i njihovu kolokalizaciju sa proteinima MBNL (Santoro et al., 2013). Osim toga, na istim uzorcima pokazan je i poremećaj u splajsovanju različitih transkripata, koji je postuliran kao glavni mehanizam DM1 patogeneze (Udd & Krahe, 2012). Ipak, obrasci prekida opisani u ovoj studiji su jedinstveni za svakog bolesnika, zbog čega su neophodne dodatne studije koje bi ispitale njihov efekat na formiranje nukleusnih fokusa, mogućnost zarobljavanja drugih RNK-vezivnih proteina, kao i posledice na metabolizam RNK.

## **5.6. Aplikativan značaj studije**

Imajući u vidu da je DM1 retka bolest, što obično podrazumeva da su male grupe bolesnika sa često oskudnim fenotipskim podacima dostupne za ispitivanja, genetička karakterizacija strukture, mutacione dinamike i stepena metilacije *DMPK* ekspanzija sa varijantnim ponovcima, praćene detaljnim fenotipskim opisom svakog takvog retkog bolesnika su od kliničkog značaja za genetičko testiranje, adekvatno genetičko savetovanje, predviđanje toka bolesti i regrutovanje bolesnika za kliničke studije. Takođe, ukoliko se dokaže da varijantni ponovci mogu modifikovati fenotipski efekat uzročne mutacije, rasvetljavanje mehanizama kojima se to postiže može voditi ka ispitivanju novih terapijskih pristupa.

Uticaj varijantnih ponovaka u *DMPK* ekspanzijama na RP-PCR, koji se rutinski koristi za genetičko testiranje DM1, kao i kliničke odlike bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama, kao što su blaži tok bolesti i posebno predispozicija za kasniji početak bolesti, imaju važne aplikacije za genetičko testiranje. U nizvodnim RP-PCR reakcijama, dobijeni profili su se kod svih ispitivanih bolesnika odlikovali određenim nepravilnostima (velike praznine, padovi u intenzitetu signala, itd.). Sa druge strane, uzvodni RP-PCR profili rezultovali su lestvičastim signalima karakterističnim za čiste (CTG)<sub>n</sub> nizove. Kao što je prethodno opisano, prekidi u ekspanziji mogu ometati vezivanje prajmera koji su komplementarni ponovcima, što dovodi do neobičnih RP-PCR profila ili čak lažno-negativnih rezultata (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011). Na primer, kod bolesnika iz porodice DF2, RP-PCR sa 3' kraja bio je negativan, dok je RP-PCR sa 5' kraja potvrdio *DMPK* ekspanziju. Osim toga, naš protokol za LR-PCR-bazirani Southern blot (Savic et al., 2002) nije potvrdio postojanje ekspanzije u ovoj porodici. Pretpostavljeno je da bi prisustvo više CCG ponovaka uzvodno od samog 3' kraja ekspanzije, odnosno visok GC sastav mogao biti uzrok otežanog umnožavanja ekspanzovanih alela. Primenom protokola optimizovanog za umnožavanje *FMR1* ekspanzija (Saluto et al., 2005), uspešno su detektovane *DMPK* ekspanzije u porodici DF2, koje su posedovale blok od 36-40 CCG ponovaka, koji je otežavao njihovu detekciju. Na osnovu prethodno navedenog, RP-PCR reakcije bi trebalo izvoditi u oba smera kako bi se povećala pouzdanost i tačnost genetičkog testiranja (Radvansky, Ficek, Minarik, et al., 2011). U slučaju dvosmislenih rezultata, neophodno je primeniti dodatnu metodu (npr. Southern blot) u cilju potvrde ili isključivanja DM1 dijagnoze. Dodatni problem u vezi sa bolesnicima sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama predstavlja njihova atipična klinička prezentacija. Iz tog razloga, standardna molekularno-genetička analiza, koja bi mogla dati negativan rezultat, zajedno sa relativno slabom kliničkom sumnjom, može dovesti do nepostavljanja dijagnoze ovim bolesnicima.

Na osnovu dosadašnjeg malog broja klinički okarakterisanih DM1 bolesnika sa prekidima, nije moguće napraviti konsenzus oko genetičkog saveta. Trenutni podaci ukazuju na to da bi progresija bolesti i prenošenje varijantnih *DMPK* ekspanzija mogli značajno odstupati od čistih ekspanzija, što može biti od značaja prilikom pružanja



genetičkog saveta. Takođe, kliničke studije za nove terapeutike obično uključuju mali broj bolesnika, zbog čega bi bolesnici sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama u takvim grupama mogli biti statistički *outlajeri* u pogledu težine kliničke slike, utičući na taj način na interpretaciju rezultata (Cumming et al., 2018). Farmakološki tretman koji stabilise ekspanzije u somatskim ćelijama tokom života sprečavao je pad motorike kod HD mišjeg modela (Budworth et al., 2015). Naši rezultati o uzrastu početka bolesti kod DM1 bolesnika sa prekidima u ekspanziji i smanjeni nivo somatske nestabilnosti ukazuju na značaj somatske nestabilnosti za tok bolesti i podržavaju ispitivanje farmakoloških agenasa koji, kroz suzbijanje somatskih ekspanzija, imaju potencijal da odlože progresiju bolesti.

## 6. Zaključci

Varijantni ponovci u *DMPK* ekspanzijama su od svog otkrića pre deset godina prepoznati kao potencijalni modifikatori fenotipa miotonične distrofije tip 1, čime su postali veoma aktuelna tema u studijama vezanim za ovu naslednu bolest. Rezultati ove doktorske teze pružili su relevantne dokaze o kliničkom značaju varijantnih ponovaka kao genetičkih modifikatora miotonične distrofije tip 1, objašnjavajući time izraženu fenotipsku varijabilnost određenog broja bolesnika. Pored toga, ova doktorska teza otvorila je bazična pitanja vezana za ulogu epigenetičkih mehanizama u stabilizaciji *DMPK* lokusa i, uopšteno, za epigenetičke procese koji se odigravaju u delovima genoma sa jednostavnim ponovljenim sekvencama.

U skladu sa postavljenim ciljevima, glavni zaključci ove doktorske teze su:

- 1) *DMPK* ekspanzije sa prekidima na 3' kraju (CTG)<sub>n</sub> niza zabeležene su kod ~3% bolesnika u grupi od 242 bolesnika iz Srbije.
- 2) Osam od devet identifikovanih bolesnika imali su CCG ponovke, organizovane kao pojedinačne, kratke ili duge pravilne nizove, i/ili kao pojedinačne ili pravilne nizove CCGCTG heksamera. Kod preostalog bolesnika, prvi put je opisana *DMPK* ekspanzija sa *de novo* nastalim CTC ponovkom.
- 3) Različiti tipovi i obrasci varijantnih ponovaka stabilišu *DMPK* ekspanzije u polnim ćelijama, što je zapaženo kroz češća stabilna prenošenja i kontrakcije varijantnih *DMPK* ekspanzija, posebno kada je majka prenosilac.
- 4) Različiti tipovi i obrasci varijantnih ponovaka, uključujući i pojedinačni *de novo* nastali prekid, *in cis* doprinose stabilnosti *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama, što se detektuje kao niži nivo somatske nestabilnosti i manje povećanje veličine ekspanzija tokom vremena u odnosu na bolesnike sa čistim ekspanzijama.

- 5) Otkriveno je da su sami CCG ponovci u *DMPK* ekspanzijama i okolna CpG ostrvaca metilovani. Metilacija oba tipa sekvenci je heterogena i zavisi od strukture CCG ponovaka, zbog čega je pretpostavljeno da se metilacija inicira i koncentriše u okviru samih CCG ponovaka i, zatim, lokalno širi, zahvatajući uzvodna i nizvodna CpG ostrvca. Ostaje otvoreno pitanje da li je metilacija DNK potencijalni mehanizam koji doprinosi stabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija.
- 6) Opšta klinička prezentacija većine bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama ukazivala je na DM1. Ipak, neki su imali blaže kliničke simptome od očekivih, kao što su kasniji uzrast početka bolesti, manji stepen zahvaćenosti mišića, manji stepen perkusione miotonije, odsustvo kognitivnog narušenja, i/ili atipične simptome, koji su često pre ukzaivali na miotoničnu distrofiju tip 2. Dalje razjašnjenje koji simptomi DM1 i u kojoj meri su posledica prisustva varijantnih ponovaka, zahteva studije na većoj grupi bolesnika.
- 7) Usled svog stabilišućeg efekta na *DMPK* lokus u somatskim ćelijama, varijantni ponovci predisponiraju DM1 bolesnike da razviju bolest kasnije od proseka, što potvrđuje njihovu ulogu modifikatora DM1 fenotipa.

## 7. Literatura

- Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R., & Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res*, *46*(5), 2159-2168. doi: 10.1093/nar/gky066
- Arsenault, M. E., Prevost, C., Lescault, A., Laberge, C., Puymirat, J., & Mathieu, J. (2006). Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions. *Neurology*, *66*(8), 1248-1250. doi: 10.1212/01.wnl.0000208513.48550.08
- Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M., Barcelo, J. M., Brunner, H., Cobo, A. M., . . . et al. (1994). Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, *54*(3), 414-423.
- Ashizawa, T., Dubel, J. R., & Harati, Y. (1993). Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology*, *43*(12), 2674-2678.
- Axford, M. M., Wang, Y. H., Nakamori, M., Zannis-Hadjopoulos, M., Thornton, C. A., & Pearson, C. E. (2013). Detection of slipped-DNAs at the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy type I disease locus in patient tissues. *PLoS Genet*, *9*(12), e1003866. doi: 10.1371/journal.pgen.1003866
- Barbe, L., Lanni, S., Lopez-Castel, A., Franck, S., Spits, C., Keymolen, K., . . . Pearson, C. E. (2017). CpG Methylation, a Parent-of-Origin Effect for Maternal-Biased Transmission of Congenital Myotonic Dystrophy. *Am J Hum Genet*, *100*(3), 488-505. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.033
- Barcelo, J. M., Mahadevan, M. S., Tsilfidis, C., MacKenzie, A. E., & Korneluk, R. G. (1993). Intergenerational stability of the myotonic dystrophy protomutation. *Hum Mol Genet*, *2*(6), 705-709.
- Bettencourt, C., Hensman-Moss, D., Flower, M., Wiethoff, S., Brice, A., Goizet, C., . . . Jones, L. (2016). DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol*, *79*(6), 983-990. doi: 10.1002/ana.24656
- Botta, A., Rossi, G., Marcaurelio, M., Fontana, L., D'Apice, M. R., Brancati, F., . . . Novelli, G. (2017). Identification and characterization of 5' CCG interruptions in complex DMPK expanded alleles. *Eur J Hum Genet*, *25*(2), 257-261. doi: 10.1038/ejhg.2016.148

- Braida, C., Stefanatos, R. K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H. J., Niel, F., . . . Monckton, D. G. (2010). Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet*, *19*(8), 1399-1412. doi: 10.1093/hmg/ddq015
- Brock, G. J., Anderson, N. H., & Monckton, D. G. (1999). Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum Mol Genet*, *8*(6), 1061-1067.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., . . . et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, *69*(2), 385.
- Brunner, H. G., Bruggenwirth, H. T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B. C., Hoppe, R. L., . . . et al. (1993). Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet*, *53*(5), 1016-1023.
- Brunner, H. G., Jansen, G., Nillesen, W., Nelen, M. R., de Die, C. E., Howeler, C. J., . . . Smeets, H. J. (1993). Brief report: reverse mutation in myotonic dystrophy. *N Engl J Med*, *328*(7), 476-480. doi: 10.1056/NEJM199302183280705
- Budworth, H., Harris, F. R., Williams, P., Lee, D. Y., Holt, A., Pahnke, J., . . . McMurray, C. T. (2015). Suppression of Somatic Expansion Delays the Onset of Pathophysiology in a Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS Genet*, *11*(8), e1005267. doi: 10.1371/journal.pgen.1005267
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., & Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(12), 5695-5699.
- Cho, D. H., Thienes, C. P., Mahoney, S. E., Analau, E., Filippova, G. N., & Tapscott, S. J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell*, *20*(3), 483-489. doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.002
- Cleary, J. D., & Pearson, C. E. (2003). The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res*, *100*(1-4), 25-55. doi: 10.1159/000072837
- Cumming, S. A., Hamilton, M. J., Robb, Y., Gregory, H., McWilliam, C., Cooper, A., . . . Monckton, D. G. (2018). De novo repeat interruptions are associated with reduced somatic instability and mild or absent clinical features in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet*, *26*(11), 1635-1647. doi: 10.1038/s41431-018-0156-9

- De Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., . . . French Myotonic Dystrophy Clinical, N. (2016). Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev Neurol (Paris)*, *172*(10), 572-580. doi: 10.1016/j.neurol.2016.08.003
- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., . . . Liebaers, I. (2004). Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet*, *75*(2), 325-329. doi: 10.1086/422762
- de Vries, B. B., Wiegers, A. M., Smits, A. P., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H. J., Fryns, J. P., . . . Niermeijer, M. F. (1996). Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet*, *58*(5), 1025-1032.
- Dragileva, E., Hendricks, A., Teed, A., Gillis, T., Lopez, E. T., Friedberg, E. C., . . . Wheeler, V. C. (2009). Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes. *Neurobiol Dis*, *33*(1), 37-47. doi: 10.1016/j.nbd.2008.09.014
- Echenne, B., Rideau, A., Roubertie, A., Sebire, G., Rivier, F., & Lemieux, B. (2008). Myotonic dystrophy type I in childhood Long-term evolution in patients surviving the neonatal period. *Eur J Paediatr Neurol*, *12*(3), 210-223. doi: 10.1016/j.ejpn.2007.07.014
- Filippova, G. N., Thienes, C. P., Penn, B. H., Cho, D. H., Hu, Y. J., Moore, J. M., . . . Tapscott, S. J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet*, *28*(4), 335-343. doi: 10.1038/ng570
- Fleischer, B. (1918). Über myotonische Dystrophie mit Katarakt. *Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie*, *96*(1), 91-133. doi: 10.1007/bf02018704
- Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., . . . et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, *255*(5049), 1256-1258.
- Gagnon, C., Kierkegaard, M., Blackburn, C., Chrestian, N., Lavoie, M., Bouchard, M. F., & Mathieu, J. (2017). Participation restriction in childhood phenotype of myotonic dystrophy type 1: a systematic retrospective chart review. *Dev Med Child Neurol*, *59*(3), 291-296. doi: 10.1111/dmcn.13282
- Gao, R., Matsuura, T., Coolbaugh, M., Zuhlke, C., Nakamura, K., Rasmussen, A., . . . Lin, X. (2008). Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet*, *16*(2), 215-222. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201954

- Gatchel, J. R., & Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, 6(10), 743-755. doi: 10.1038/nrg1691
- Gellera, C., Meoni, C., Castellotti, B., Zappacosta, B., Girotti, F., Taroni, F., & DiDonato, S. (1996). Errors in Huntington disease diagnostic test caused by trinucleotide deletion in the IT15 gene. *Am J Hum Genet*, 59(2), 475-477.
- Genetic Modifiers of Huntington's Disease, C. (2015). Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*, 162(3), 516-526. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.003
- Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S. I., & Monckton, D. G. (2004). Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 277, 61-76. doi: 10.1385/1-59259-804-8:061
- Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A. S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., . . . Hofmann-Radvanyi, H. (1997). Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat Genet*, 15(2), 190-192. doi: 10.1038/ng0297-190
- Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., . . . Pascuzzi, R. M. (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med*, 358(25), 2688-2697. doi: 10.1056/NEJMoa062800
- Hamshere, M. G., Harley, H., Harper, P., Brook, J. D., & Brookfield, J. F. (1999). Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet*, 36(1), 59-61.
- Hansen, R. S., Gartler, S. M., Scott, C. R., Chen, S. H., & Laird, C. D. (1992). Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, 1(8), 571-578.
- Harley, H. G., Rundle, S. A., MacMillan, J. C., Myring, J., Brook, J. D., Crow, S., . . . Harper, P. S. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, 52(6), 1164-1174.
- Harper, P. (2001). Myotonic dystrophy. 3WB Saunders. London, UKrd edn.
- Harper, P. S. (1975). Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. Clinical aspects. *Arch Dis Child*, 50(7), 505-513.
- Higham, C. F. (2013). *Dynamic DNA and human disease: mathematical modelling and statistical inference for myotonic dystrophy type 1 and Huntington disease*. (dissertation thesis), University of Glasgow, Glasgow, UK.

- Howeler, C. J., Busch, H. F., Geraedts, J. P., Niermeijer, M. F., & Staal, A. (1989). Anticipation in myotonic dystrophy: fact or fiction? *Brain*, *112* ( Pt 3), 779-797.
- Hu, Y., Hashimoto, Y., Ishii, T., Rayle, M., Soga, K., Sato, N., . . . Yokota, T. (2017). Sequence configuration of spinocerebellar ataxia type 8 repeat expansions in a Japanese cohort of 797 ataxia subjects. *J Neurol Sci*, *382*, 87-90. doi: 10.1016/j.jns.2017.08.3256
- Huin, V., Vasseur, F., Schraen-Maschke, S., Dhaenens, C. M., Devos, P., Dupont, K., . . . Sablonniere, B. (2013). MBNL1 gene variants as modifiers of disease severity in myotonic dystrophy type 1. *J Neurol*, *260*(4), 998-1003. doi: 10.1007/s00415-012-6740-y
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., . . . Wieringa, B. (1994). Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet*, *54*(4), 575-585.
- Jones, P. A., & Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, *293*(5532), 1068-1070. doi: 10.1126/science.1063852
- La Spada, A. R., & Taylor, J. P. (2010). Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet*, *11*(4), 247-258. doi: 10.1038/nrg2748
- Lamar, K. M., & McNally, E. M. (2014). Genetic Modifiers for Neuromuscular Diseases. *J Neuromuscul Dis*, *1*(1), 3-13. doi: 10.3233/JND-140023
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., . . . Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet*, *52*(5), 875-883.
- Leeflang, E. P., & Arnheim, N. (1995). A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum Mol Genet*, *4*(1), 135-136.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., . . . Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*, *293*(5531), 864-867. doi: 10.1126/science.1062125
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., . . . et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, *255*(5049), 1253-1255.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., . . . Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, *289*(5485), 1769-1773.



- Marchini, C., Lonigro, R., Verriello, L., Pellizzari, L., Bergonzi, P., & Damante, G. (2000). Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy. *Clin Genet*, 57(1), 74-82.
- Martorell, L., Cobo, A. M., Baiget, M., Naudo, M., Poza, J. J., & Parra, J. (2007). Prenatal diagnosis in myotonic dystrophy type 1. Thirteen years of experience: implications for reproductive counselling in DM1 families. *Prenat Diagn*, 27(1), 68-72. doi: 10.1002/pd.1627
- Martorell, L., Gamez, J., Cayuela, M. L., Gould, F. K., McAbney, J. P., Ashizawa, T., . . . Baiget, M. (2004). Germline mutational dynamics in myotonic dystrophy type 1 males: allele length and age effects. *Neurology*, 62(2), 269-274.
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C. A., & Baiget, M. (1997). Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)<sub>n</sub> repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet*, 6(6), 877-880.
- Martorell, L., Monckton, D. G., Gamez, J., Johnson, K. J., Gich, I., Lopez de Munain, A., & Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet*, 7(2), 307-312.
- Martorell, L., Monckton, D. G., Sanchez, A., Lopez De Munain, A., & Baiget, M. (2001). Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation. *Neurology*, 56(3), 328-335.
- Matsuura, T., Fang, P., Pearson, C. E., Jayakar, P., Ashizawa, T., Roa, B. B., & Nelson, D. L. (2006). Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10: repeat purity as a disease modifier? *Am J Hum Genet*, 78(1), 125-129. doi: 10.1086/498654
- McFarland, K. N., Liu, J., Landrian, I., Gao, R., Sarkar, P. S., Raskin, S., . . . Ashizawa, T. (2013). Paradoxical effects of repeat interruptions on spinocerebellar ataxia type 10 expansions and repeat instability. *Eur J Hum Genet*, 21(11), 1272-1276. doi: 10.1038/ejhg.2013.32
- Meola, G., & Cardani, R. (2015). Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1852(4), 594-606. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.019
- Merlevede, K., Vermander, D., Theys, P., Legius, E., Ector, H., & Robberecht, W. (2002). Cardiac involvement and CTG expansion in myotonic dystrophy. *J Neurol*, 249(6), 693-698. doi: 10.1007/s00415-002-0692-6
- Miller, T. M. (2008). Differential diagnosis of myotonic disorders. *Muscle Nerve*, 37(3), 293-299. doi: 10.1002/mus.20923

- Mioshi, E., Dawson, K., Mitchell, J., Arnold, R., & Hodges, J. R. (2006). The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised (ACE-R): a brief cognitive test battery for dementia screening. *Int J Geriatr Psychiatry*, *21*(11), 1078-1085. doi: 10.1002/gps.1610
- Modoni, A., Silvestri, G., Pomponi, M. G., Mangiola, F., Tonali, P. A., & Marra, C. (2004). Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol*, *61*(12), 1943-1947. doi: 10.1001/archneur.61.12.1943
- Monckton, D. G., Wong, L. J., Ashizawa, T., & Caskey, C. T. (1995). Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet*, *4*(1), 1-8.
- Morales, F., Couto, J. M., Higham, C. F., Hogg, G., Cuenca, P., Braida, C., . . . Monckton, D. G. (2012). Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum Mol Genet*, *21*(16), 3558-3567. doi: 10.1093/hmg/dds185
- Morales, F., Vasquez, M., Santamaria, C., Cuenca, P., Corrales, E., & Monckton, D. G. (2016). A polymorphism in the MSH3 mismatch repair gene is associated with the levels of somatic instability of the expanded CTG repeat in the blood DNA of myotonic dystrophy type 1 patients. *DNA Repair (Amst)*, *40*, 57-66. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.01.001
- Moseley, M. L., Schut, L. J., Bird, T. D., Koob, M. D., Day, J. W., & Ranum, L. P. (2000). SCA8 CTG repeat: en masse contractions in sperm and intergenerational sequence changes may play a role in reduced penetrance. *Hum Mol Genet*, *9*(14), 2125-2130.
- Mulvihill, D. J., Nichol Edamura, K., Hagerman, K. A., Pearson, C. E., & Wang, Y. H. (2005). Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome. *J Biol Chem*, *280*(6), 4498-4503. doi: 10.1074/jbc.M413239200
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., . . . Sedlacek, Z. (2009). Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A*, *149A*(7), 1365-1374. doi: 10.1002/ajmg.a.32987
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., . . . Thornton, C. A. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol*, *74*(6), 862-872. doi: 10.1002/ana.23992
- Naumann, A., Hochstein, N., Weber, S., Fanning, E., & Doerfler, W. (2009). A distinct DNA-methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, *85*(5), 606-616. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.018

- Nichol, K., & Pearson, C. E. (2002). CpG methylation modifies the genetic stability of cloned repeat sequences. *Genome Res*, *12*(8), 1246-1256. doi: 10.1101/gr.74502
- O'Hoy, K. L., Tsilfidis, C., Mahadevan, M. S., Neville, C. E., Barcelo, J., Hunter, A. G., & Korneluk, R. G. (1993). Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission. *Science*, *259*(5096), 809-812.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., . . . Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, *252*(5009), 1097-1102.
- Panigrahi, G. B., Slean, M. M., Simard, J. P., Gileadi, O., & Pearson, C. E. (2010). Isolated short CTG/CAG DNA slip-outs are repaired efficiently by hMutSbeta, but clustered slip-outs are poorly repaired. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(28), 12593-12598. doi: 10.1073/pnas.0909087107
- Paulson, H. (2018). Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol*, *147*, 105-123. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9
- Paunic, T., Peric, S., Cvitan, E., Raspopovic, S., Peric, M., Mandic Stojmenovic, G., & Rakocevic Stojanovic, V. (2017). Routine echocardiography in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Chin Med Assoc*, *80*(7), 408-412. doi: 10.1016/j.jcma.2017.04.004
- Pearson, C. E., Eichler, E. E., Lorenzetti, D., Kramer, S. F., Zoghbi, H. Y., Nelson, D. L., & Sinden, R. R. (1998). Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation. *Biochemistry*, *37*(8), 2701-2708. doi: 10.1021/bi972546c
- Pearson, C. E., Nichol Edamura, K., & Cleary, J. D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*, *6*(10), 729-742. doi: 10.1038/nrg1689
- Pearson, C. E., & Sinden, R. R. (1996). Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry*, *35*(15), 5041-5053. doi: 10.1021/bi9601013
- Pearson, C. E., Tam, M., Wang, Y. H., Montgomery, S. E., Dar, A. C., Cleary, J. D., & Nichol, K. (2002). Slipped-strand DNAs formed by long (CAG)<sup>n</sup>(CTG) repeats: slipped-out repeats and slip-out junctions. *Nucleic Acids Res*, *30*(20), 4534-4547.
- Peric, S., Mandic-Stojmenovic, G., Stefanova, E., Savic-Pavicevic, D., Pesovic, J., Ilic, V., . . . Rakocevic-Stojanovic, V. (2015). Frontostriatal dysexecutive syndrome: a core cognitive feature of myotonic dystrophy type 2. *J Neurol*, *262*(1), 142-148. doi: 10.1007/s00415-014-7545-y
- Peric, S., Nisic, T., Milicev, M., Basta, I., Marjanovic, I., Peric, M., . . . Rakocevic Stojanovic, V. (2013). Hypogonadism and erectile dysfunction in myotonic dystrophy type 1. *Acta Myol*, *32*(2), 106-109.

- Peric, S., Rakocevic Stojanovic, V., Mandic Stojmenovic, G., Ilic, V., Kovacevic, M., Parojcic, A., . . . Meola, G. (2017). Clusters of cognitive impairment among different phenotypes of myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Neurol Sci*, 38(3), 415-423. doi: 10.1007/s10072-016-2778-4
- R Development Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Radvansky, J., Ficek, A., & Kadasi, L. (2011). Upgrading molecular diagnostics of myotonic dystrophies: multiplexing for simultaneous characterization of the DMPK and ZNF9 repeat motifs. *Mol Cell Probes*, 25(4), 182-185. doi: 10.1016/j.mcp.2011.04.006
- Radvansky, J., Ficek, A., Minarik, G., Palffy, R., & Kadasi, L. (2011). Effect of unexpected sequence interruptions to conventional PCR and repeat primed PCR in myotonic dystrophy type 1 testing. *Diagn Mol Pathol*, 20(1), 48-51. doi: 10.1097/PDM.0b013e3181efe290
- Rakocevic-Stojanovic, V., Peric, S., Madzarevic, R., Dobricic, V., Ralic, V., Ilic, V., . . . Stefanova, E. (2014). Significant impact of behavioral and cognitive impairment on quality of life in patients with myotonic dystrophy type 1. *Clin Neurol Neurosurg*, 126, 76-81. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.08.021
- Rakocevic-Stojanovic, V., Peric, S., Pesovic, J., Sencanic, I., Bozic, M., Svikovic, S., . . . Savic-Pavicevic, D. (2017). Genetic testing of individuals with pre-senile cataract identifies patients with myotonic dystrophy type 2. *Eur J Neurol*, 24(11), e79-e80. doi: 10.1111/ene.13401
- Rakocevic-Stojanovic, V., Savic, D., Pavlovic, S., Lavrnica, D., Stevic, Z., Basta, I., . . . Apostolski, S. (2005). Intergenerational changes of CTG repeat depending on the sex of the transmitting parent in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Neurol*, 12(3), 236-237. doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.01075.x
- Reddy, K., Schmidt, M. H., Geist, J. M., Thakkar, N. P., Panigrahi, G. B., Wang, Y. H., & Pearson, C. E. (2014). Processing of double-R-loops in (CAG).(CTG) and C9orf72 (GGGGCC).(GGCCCC) repeats causes instability. *Nucleic Acids Res*, 42(16), 10473-10487. doi: 10.1093/nar/gku658
- Richards, R. I., & Sutherland, G. R. (1992). Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell*, 70(5), 709-712.
- Ricker, K., Koch, M. C., Lehmann-Horn, F., Pongratz, D., Otto, M., Heine, R., & Moxley, R. T., 3rd. (1994). Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology*, 44(8), 1448-1452.

- Rolfsmeier, M. L., Dixon, M. J., & Lahue, R. S. (2000). Mismatch repair blocks expansions of interrupted trinucleotide repeats in yeast. *Mol Cell*, *6*(6), 1501-1507.
- Russ, J., Liu, E. Y., Wu, K., Neal, D., Suh, E., Irwin, D. J., . . . Lee, E. B. (2015). Hypermethylation of repeat expanded C9orf72 is a clinical and molecular disease modifier. *Acta Neuropathol*, *129*(1), 39-52. doi: 10.1007/s00401-014-1365-0
- Rutherford, M. A., Heckmatt, J. Z., & Dubowitz, V. (1989). Congenital myotonic dystrophy: respiratory function at birth determines survival. *Arch Dis Child*, *64*(2), 191-195.
- Salehi, L. B., Bonifazi, E., Stasio, E. D., Gennarelli, M., Botta, A., Vallo, L., . . . Novelli, G. (2007). Risk prediction for clinical phenotype in myotonic dystrophy type 1: data from 2,650 patients. *Genet Test*, *11*(1), 84-90. doi: 10.1089/gte.2006.0511
- Saluto, A., Brussino, A., Tassone, F., Arduino, C., Cagnoli, C., Pappi, P., . . . Brusco, A. (2005). An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J Mol Diagn*, *7*(5), 605-612. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60594-6
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Gel Electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M., Fontana, L., Masciullo, M., Bianchi, M. L., Rossi, S., Leoncini, E., . . . Silvestri, G. (2015). Expansion size and presence of CCG/CTC/CGG sequence interruptions in the expanded CTG array are independently associated to hypermethylation at the DMPK locus in myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Biochim Biophys Acta*, *1852*(12), 2645-2652. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.09.007
- Santoro, M., Masciullo, M., Pietrobono, R., Conte, G., Modoni, A., Bianchi, M. L., . . . Silvestri, G. (2013). Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions. *J Neurol*, *260*(5), 1245-1257. doi: 10.1007/s00415-012-6779-9
- Savic, D., Keckarevic, D., Brankovic-Sreckovic, V., Apostolski, S., Todorovic, S., & Romac, S. (2006). Clinical case report atypical myopathy in a young girl with 91 CTG repeats in DM1 locus and a positive DM1 family history. *Int J Neurosci*, *116*(12), 1509-1518. doi: 10.1080/00207450600553182
- Savic, D., Rakovic-Stojanovic, V., Keckarevic, D., Culjkovic, B., Stojkovic, O., Mladenovic, J., . . . Romac, S. (2002). 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. *Hum Mutat*, *19*(2), 131-139. doi: 10.1002/humu.10027

- Savic Pavicevic, D., Miladinovic, J., Brkusanin, M., Svikovic, S., Djurica, S., Brajuskovic, G., & Romac, S. (2013). Molecular genetics and genetic testing in myotonic dystrophy type 1. *Biomed Res Int*, *2013*, 391821. doi: 10.1155/2013/391821
- Savouret, C., Garcia-Cordier, C., Megret, J., te Riele, H., Junien, C., & Gourdon, G. (2004). MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol*, *24*(2), 629-637.
- Schmidt, M. H., & Pearson, C. E. (2016). Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, *38*, 117-126. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.11.008
- Steinbach, P., Glaser, D., Vogel, W., Wolf, M., & Schwemmle, S. (1998). The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am J Hum Genet*, *62*(2), 278-285. doi: 10.1086/301711
- Steinert, H. (1909). Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker. *Dtsch Z Nervenheilkd*, *37*, 58-104.
- Steyaert, J., de Die-Smulders, C., Fryns, J. P., Goossens, E., & Willekens, D. (2000). Behavioral phenotype in childhood type of dystrophia myotonica. *Am J Med Genet*, *96*(6), 888-889.
- Su, X. A., & Freudenreich, C. H. (2017). Cytosine deamination and base excision repair cause R-loop-induced CAG repeat fragility and instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(40), E8392-E8401. doi: 10.1073/pnas.1711283114
- Swami, M., Hendricks, A. E., Gillis, T., Massood, T., Mysore, J., Myers, R. H., & Wheeler, V. C. (2009). Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Hum Mol Genet*, *18*(16), 3039-3047. doi: 10.1093/hmg/ddp242
- The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC). (2000). New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology*, *54*(6), 1218-1221.
- Thornton, C. A., Griggs, R. C., & Moxley, R. T., 3rd. (1994). Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann Neurol*, *35*(3), 269-272. doi: 10.1002/ana.410350305
- Thornton, C. A., Johnson, K., & Moxley, R. T., 3rd. (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol*, *35*(1), 104-107. doi: 10.1002/ana.410350116

- Tome, S., Dandelot, E., Dogan, C., Bertrand, A., Genevieve, D., Pereon, Y., . . . Gourdon, G. (2018). Unusual association of a unique CAG interruption in 5' of DM1 CTG repeats with intergenerational contractions and low somatic mosaicism. *Hum Mutat*, 39(7), 970-982. doi: 10.1002/humu.23531
- Tsilfidis, C., MacKenzie, A. E., Mettler, G., Barcelo, J., & Korneluk, R. G. (1992). Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 1(3), 192-195. doi: 10.1038/ng0692-192
- Turner, C., & Hilton-Jones, D. (2010). The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(4), 358-367. doi: 10.1136/jnnp.2008.158261
- Udd, B., & Krahe, R. (2012). The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*, 11(10), 891-905. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70204-1
- Wang, J., Pegoraro, E., Menegazzo, E., Gennarelli, M., Hoop, R. C., Angelini, C., & Hoffman, E. P. (1995). Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation. *Hum Mol Genet*, 4(4), 599-606.
- Wang, Y. H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D., & Griffith, J. D. (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science*, 265(5172), 669-671.
- Wang, Y. H., Gellibolian, R., Shimizu, M., Wells, R. D., & Griffith, J. (1996). Long CCG triplet repeat blocks exclude nucleosomes: a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes. *J Mol Biol*, 263(4), 511-516. doi: 10.1006/jmbi.1996.0593
- Warner, J. P., Barron, L. H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D. R., & Brock, D. J. (1996). A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*, 33(12), 1022-1026.
- Wheeler, V. C., Lebel, L. A., Vrbanac, V., Teed, A., te Riele, H., & MacDonald, M. E. (2003). Mismatch repair gene Msh2 modifies the timing of early disease in Hdh(Q111) striatum. *Hum Mol Genet*, 12(3), 273-281.
- Wohrle, D., Kennerknecht, I., Wolf, M., Enders, H., Schwemmle, S., & Steinbach, P. (1995). Heterogeneity of DM kinase repeat expansion in different fetal tissues and further expansion during cell proliferation in vitro: evidence for a casual involvement of methyl-directed DNA mismatch repair in triplet repeat stability. *Hum Mol Genet*, 4(7), 1147-1153.

- Wohrle, D., Salat, U., Glaser, D., Mucke, J., Meisel-Stosiek, M., Schindler, D., . . . Steinbach, P. (1998). Unusual mutations in high functioning fragile X males: apparent instability of expanded unmethylated CGG repeats. *J Med Genet*, *35*(2), 103-111.
- Wong, L. J., Ashizawa, T., Monckton, D. G., Caskey, C. T., & Richards, C. S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet*, *56*(1), 114-122.
- Xi, Z., Zhang, M., Bruni, A. C., Maletta, R. G., Colao, R., Fratta, P., . . . Rogaeva, E. (2015). The C9orf72 repeat expansion itself is methylated in ALS and FTLN patients. *Acta Neuropathol*, *129*(5), 715-727. doi: 10.1007/s00401-015-1401-8
- Xi, Z., Zinman, L., Moreno, D., Schymick, J., Liang, Y., Sato, C., . . . Rogaeva, E. (2013). Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *Am J Hum Genet*, *92*(6), 981-989. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.017
- Yum, K., Wang, E. T., & Kalsotra, A. (2017). Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*, *44*, 30-37. doi: 10.1016/j.gde.2017.01.007
- Zatz, M., Passos-Bueno, M. R., Cerqueira, A., Marie, S. K., Vainzof, M., & Pavanello, R. C. (1995). Analysis of the CTG repeat in skeletal muscle of young and adult myotonic dystrophy patients: when does the expansion occur? *Hum Mol Genet*, *4*(3), 401-406.
- Zeesman, S., Carson, N., & Whelan, D. T. (2002). Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet*, *107*(3), 222-226.
- Zhou, Y., Lum, J. M., Yeo, G. H., Kiing, J., Tay, S. K., & Chong, S. S. (2006). Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. *Clin Chem*, *52*(8), 1492-1500. doi: 10.1373/clinchem.2006.068593



## 8. Prilozi

### 8.1. Prilog 1 – Dozvola Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije

KLINIČKI CENTAR SRBIJE  
ETIČKI ODBOR  
Broj: 339/5  
Dana: 15.06.2017. godine  
Beograd, Pasterova br. 2

Na osnovu odredaba Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Srbije ("Sl. glasnik RS", br. 107/2005, 72/2009 - dr. zakon, 88/2010, 99/2010, 57/2011, 119/2012, 45/2013 - dr. zakon, 93/2014, 96/2015 i 106/2015), Zakona o lekovima i medicinskim sredstvima Republike Srbije ("Sl. glasnik RS", br. 30/2010 i 107/2012), Zakona o pravima pacijenata („Sl. glasnik RS”, br. 45/13), Pravilnika o sadržaju zahteva, odnosno dokumentacije za odobrenje kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva, kao i načina sprovođenja kliničkog ispitivanja leka i medicinskog sredstva ("Sl. glasnik RS", br. 64/2011 i 91/2013), Poslovnika o radu Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 3098/39 od 26.04.2012. god., postupajući u skladu sa Načelima dobre kliničke prakse (GCP), Etički odbor Kliničkog centra Srbije u sastavu: Prof. dr Branislav Stefanović - predsednik, Prof. dr Zoran Džamić - zamenik predsednika, Prof. dr Saša Kadija, Prof. dr Andrija Bogdanović, Doc. dr Vladan Živaljević, Prof. dr Jelena Drulović, Prof. dr Miloš Žarković, Prof. dr Violeta Mihailović – Vučinić, Prof. dr Vesna Tomić - Spirić, Prof. dr Dragan Simić – lekari specijalisti svi zaposleni u Kliničkom centru Srbije i Prof. dr Đorđe Đorđević - dipl. pravnik, zaposlen na Kriminalističko - policijskoj akademiji u Zemunu, odlučujući o zahtevu Prof. dr Vidosave Rakočević - Stojanović, na svojoj 21. sednici održanoj dana 15.06.2017. godine, doneo je sledeću

#### ODLUKU

Odobrava se sprovođenje akademskog kliničkog ispitivanja (studije) pod nazivom: "Varijantni ponovci u CTG ekspanzijama gena DMPK kao genetički modifikatori miotonične distrofije tip 1". Glavni istraživač je Prof. dr Vidosava Rakočević - Stojanović.

Centri ili ustanove van KCS uključeni u ispitivanje: Centar za humanu molekularnu genetiku, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

Istraživači saradnici su Prof. dr Dušanka Savić – Pavićević i Jovan Pešović.

Članovi istraživačkog tima su: Dr Stojan Perić.

Ispitivanje će biti sprovedeno na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije.

Rezultati ovog ispitivanja biće korišćeni za izradu doktorske disertacije Jovana Pešovića.

Prilikom donošenja odluke Etički odbor je razmatrao sledeću dokumentaciju:

- Saglasnost Direktora Klinike za neurologiju broj 6860/2 od 15.05.2017. godine,
- Protokol istraživanja,
- Izjava Dekana Biološkog fakulteta,
- Informacija za pacijenta i Obrazac informisanog pristanka
- Biografija glavnog istraživača.

PREDSEDNİK ETIČKOG ODBORA  
Prof. dr Branislav Stefanović



## 8.2. Prilog 2

**Tabela 8.2.1.** Modeli linearne regresije korelacije nivoa somatske nestabilnosti (SI), 10. percentila dužine alela ( $10^{\text{th}}$ p) i uzrasta uzorkovanja (AS) kod DM1 bolesnika koji uključuju referentnu grupu od 136 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (Morales et al., 2012), i ispitivane bolesnike posmatrane u prvoj vremenskoj tački (šest sa varijantnim i četiri sa čistim *DMPK* ekspanzijama) i u drugoj vremenskoj tački (sedam sa varijantnim i četiri sa čistim *DMPK* ekspanzijama).

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
<b>Prva vremenska tačka</b>							
Model 4*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	Intercept	$\beta_0 = -1,0027$	0,1916	-5,234	$5,75e^{-07}$	0,69	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 1,3500$	0,0754	17,905	<2e <sup>-16</sup>		
Model 6*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS})$	Intercept	$\beta_0 = -2,16990$	0,24612	-8,817	$3,67e^{-15}$	0,76	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 1,46048$	0,06857	21,300	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = 0,59450$	0,09123	6,517	$1,15e^{-09}$		
Model 7*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	Intercept	$\beta_0 = 0,2295$	0,7644	0,300	0,76	0,77	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 0,5147$	0,2939	1,751	0,08		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -0,9658$	0,4806	-2,010	0,05		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,6181$	0,1871	3,303	0,001		
Model 8*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS}) + \beta_4 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2 + \beta_5 \log_{10}(\text{AS})^2$	Intercept	$\beta_0 = -9,2774$	0,9226	-10,056	<2e <sup>-16</sup>	0,90	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 8,7331$	0,6442	13,556	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -1,3453$	0,5828	-2,308	0,02		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,3962$	0,1393	2,844	0,005		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_4 = -1,6443$	0,1242	-13,237	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})^2$	$\beta_5 = 0,3522$	0,1343	2,622	0,01		

**Tabela 8.2.1.** Nastavak.

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
<b>Druga vremenska tačka</b>							
Model 4*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	Intercept	$\beta_0 = -1,01328$	0,19178	-5,284	$4,55e^{-07}$	0,69	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 1,35478$	0,07543	17,961	<2e <sup>-16</sup>		
Model 6*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS})$	Intercept	$\beta_0 = -2,21356$	0,24576	-9,007	$1,16e^{-15}$	0,76	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 1,46867$	0,06826	21,517	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = 0,60874$	0,09094	6,694	$4,51e^{-10}$		
Model 7*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	Intercept	$\beta_0 = 0,1829$	0,7600	0,241	0,81	0,78	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 0,5245$	0,2920	1,796	0,07		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -0,9499$	0,4777	-1,989	0,05		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,6171$	0,1859	3,320	0,001		
Model 8*: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS}) + \beta_4 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2 + \beta_5 \log_{10}(\text{AS})^2$	Intercept	$\beta_0 = -9,2521$	0,9103	-10,164	<2e <sup>-16</sup>	0,90	<2,2e <sup>-16</sup>
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 8,7348$	0,6340	13,776	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -1,4005$	0,5725	-2,446	0,02		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,4069$	0,1374	2,962	0,004		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_4 = -1,6460$	0,1221	-13,483	<2e <sup>-16</sup>		
	$\log_{10}(\text{AS})^2$	$\beta_5 = 0,3616$	0,1312	2,757	0,007		

P vrednost – statistička značajnost za svaki model; Koeficijent – pokazatelj jačine efekta svake nezavisne promenljive sa pridruženom statističkom greškom; t-statistika i Pr(>|t|) – pokazatelji statističke značajnosti da nezavisna promenljiva doprinosi moći objašnjenja modela.

Objavljeni modeli linearne regresije, koji objašnjavaju varijabilnost u somatskoj nestabilnosti (Morales et al., 2012), ponovno su testirani korišćenjem 10. percentila dužine alela (kao procenom za dužinu progenitornog alela (Higham, 2013)) i uzrastom uzorkovanja kao nezavisnih promenljivih. Svi modeli su poboljšani s obzirom na to da su vrednosti prilagođenih koeficijenata korelacije (prilagođeni R<sup>2</sup>) bile nešto veće od originalno dobijenih (Morales et al., 2012).

**Tabela 8.2.2.** Modeli linearne regresije korelacije nivoa somatske nestabilnosti (SI), 10. percentila dužine alela ( $10^{\text{th}}$ p) i uzrasta uzorkovanja (AS) kod DM1 bolesnika koji uključuju referentnu grupu od 136 bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (Morales et al., 2012), i ispitivane bolesnike posmatrane u dvema vremenskim tačkama (šest/sedam sa varijantnim i četiri sa čistim *DMPK* ekspanzijama). Kod bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama razmatrane su veličine 5' krajeva ekspanzija.

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
<b>Prva vremenska tačka</b>							
Model 8**: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS}) + \beta_4 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2 + \beta_5 \log_{10}(\text{AS})^2$	Intercept	$\beta_0 = -9,3401$	0,9048	-10,323	$<2e^{-16}$	0,90	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 8,8148$	0,6308	13,974	$<2e^{-16}$		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -1,4058$	0,5733	-2,452	0,02		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,4063$	0,1370	2,966	0,004		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_4 = -1,6636$	0,1216	-13,683	$<2e^{-16}$		
	$\log_{10}(\text{AS})^2$	$\beta_5 = 0,3684$	0,1320	2,790	0,006		
<b>Druga vremenska tačka</b>							
Model 8**: $\log(\text{SI}) = \beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(\text{AS}) + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS}) + \beta_4 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2 + \beta_5 \log_{10}(\text{AS})^2$	Intercept	$\beta_0 = -9,3412$	0,8887	-10,511	$<2e^{-16}$	0,90	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = 8,8493$	0,6180	14,319	$<2e^{-16}$		
	$\log_{10}(\text{AS})$	$\beta_2 = -1,4704$	0,5607	-2,622	0,009		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) \times \log_{10}(\text{AS})$	$\beta_3 = 0,4197$	0,1345	3,120	0,002		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_4 = -1,6737$	0,1190	-14,068	$<2e^{-16}$		
	$\log_{10}(\text{AS})^2$	$\beta_5 = 0,3789$	0,1283	2,953	0,003		

P vrednost – statistička značajnost za svaki model; Koeficijent – pokazatelj jačine efekta svake nezavisne promenljive sa pridruženom statističkom greškom; t-statistika i Pr(>|t|) – pokazatelji statističke značajnosti da nezavisna promenljiva doprinosi moći objašnjenja modela.

Objavljeni model linearne regresije 8, koji objašnjava varijabilnost u somatskoj nestabilnosti (Morales et al., 2012), ponovno je testiran korišćenjem 10. percentila dužine alela (kao procenom za dužinu progenitornog alela (Higham, 2013)) i uzrastom uzorkovanja, kao nezavisnih promenljivih. Veličine 5' krajeva varijantnih *DMPK* ekspanzija dobijene su oduzimanjem odgovarajućih delova sa varijantnim ponovcima na 3' kraju od svakog detektovanog ekspanovanog alela.

**Tabela 8.2.3.** Modeli linearne regresije korelacije između uzrasta početka bolesti (AO), 10. percentila dužine alela (10<sup>th</sup>p) i standardizovanih reziduala somatske nestabilnosti (SI) kod DM1 bolesnika koji uključuju referentnu grupu od 121 simptomatskog bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama (Morales et al., 2012), i ispitivane bolesnike posmatrane u prvoj vremenskoj tački (šest sa varijantnim i četiri sa čistim *DMPK* ekspanzijama) i u drugoj vremenskoj tački (sedam sa varijantnim i četiri sa čistim *DMPK* ekspanzijama).

Model	Parametar	Koeficijent	Standardna greška	t-statistika	Pr(> t )	R <sup>2</sup> (prilagođeni)	P vrednost
<b>Prva vremenska tačka</b>							
Model 9*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	Intercept	$\beta_0 = 105,354$	8,552	12,320	$<2e^{-16}$	0,43	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -32,939$	3,321	-9,918	$<2e^{-16}$		
Model 10*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	Intercept	$\beta_0 = 304,963$	50,612	6,026	$1,67e^{-08}$	0,49	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -197,944$	41,419	-4,779	$4,75e^{-06}$		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_2 = 33,605$	8,411	3,995	$1,08e^{-04}$		
Model 11*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \text{standardized residual of SI} + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	Intercept	$\beta_0 = 304,294$	47,696	6,380	$3,02e^{-09}$	0,55	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -197,576$	39,032	-5,062	$1,42e^{-06}$		
	standardized residual(SI)	$\beta_2 = 33,565$	0,813	-4,139	$6,31e^{-05}$		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$B_3 = -3,365$	7,926	4,235	$4,36e^{-05}$		
<b>Druga vremenska tačka</b>							
Model 9*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	Intercept	$\beta_0 = 106,435$	8,528	12,48	$<2e^{-16}$	0,43	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -33,304$	3,310	-10,06	$<2e^{-16}$		
Model 10*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	Intercept	$\beta_0 = 304,107$	50,777	5,989	$1,96e^{-08}$	0,49	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -196,532$	41,512	-4,734	$5,70e^{-06}$		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$\beta_2 = 33,214$	8,423	3,943	$1,31e^{-04}$		
Model 11*: AO = $\beta_0 + \beta_1 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p}) + \beta_2 \text{standardized residual of SI} + \beta_3 \log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	Intercept	$\beta_0 = 303,1017$	47,8211	6,338	$3,64e^{-09}$	0,55	$<2,2e^{-16}$
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})$	$\beta_1 = -195,853$	39,0958	-5,010	$1,77e^{-06}$		
	standardized residual(SI)	$\beta_2 = -3,3680$	0,8064	-4,177	$5,44e^{-05}$		
	$\log_{10}(10^{\text{th}}\text{p})^2$	$B_3 = 33,1042$	7,9325	4,173	$5,51e^{-05}$		

P vrednost – statistička značajnost za svaki model; Koeficijent – pokazatelj jačine efekta svake nezavisne promenljive sa pridruženom statističkom greškom; t-statistika i Pr(>|t|) – pokazatelji statističke značajnosti da nezavisna promenljiva doprinosi moći objašnjenja modela. Objavljeni modeli linearne regresije, koji objašnjavaju varijabilnost u uzrastu početka bolesti (Morales et al., 2012) ponovno su testirani korišćenjem 10. percentila dužine alela i standardizovanih reziduala somatske nestabilnosti u skladu sa modelom 8\* (koji nisu objašnjeni 10. percentilom dužine alela i uzrastom uzorkovanja), kao nezavisnih promenljivih.

**Tabela 8.2.4.** Kompletan set detektovanih ekspanzovanih *DMPK* alela u ćelijama krvi u prvoj (t1) i drugoj (t2) vremenskoj tački i u ćelijama bukalne sluznice (B) u drugoj vremenskoj tački kod sedam bolesnika sa varijantnim ponovcima i četiri sa čistim ekspanzijama.

Detektovano je najmanje 200 alela po uzorku. Uzrast uzorkovanja (AS) i uzrast početka bolesti (AO) naznačeni su za svakog bolesnika. Vrednost od 0,5 dodata je svim vrednostima AS i AO kako bi se omogućila logaritamska transformacija podataka.

\* – kontrolna grupa.

Tabela se nalazi na sledećem linku: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00601/full#supplementary-material>

## **Biografija autora**

Jovan Z. Pešović rođen je 28. septembra 1989. godine u Bijeljini, Republika Srpska, BiH. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Budvi, Crna Gora. Osnovne akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, studijski program Biologija, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisao je školske 2008/2009. godine i završio ih u roku sa prosečnom ocenom 9,94. Dobitnik je nagrade Univerziteta u Beogradu „Student generacije” Biološkog fakulteta za školsku 2011/12. godinu. Master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Humana molekularna biologija upisao je školske 2012/2013. godine i 2013. godine odbranio master rad pod nazivom: „Povezanost mutacija u genu za distrofin sa kognitivnim poremećajima kod bolesnika sa Dišenovom mišićnom distrofijom”. Dobitnik je nagrade Fondacije „Goran Ljubijankić” za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji odbranjen 2013. godine. Doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, upisao je 2013. godine. U periodu od novembra 2013. do februara 2015. godine bio je angažovan kao istraživač pripravnik u Centru za humanu molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu-Biološkog fakulteta na nacionalnom projektu osnovnih istraživanja 173016. Od februara 2015. do danas angažovan je kao istraživač saradnik na istom projektu. Učestvovao je i na dva bilateralna projekta sa Slovenijom, na jednom bilateralnom projektu sa Italijom i COST akciji BM1207, a trenutno je učesnik COST akcije CA17103 i jednog bilateralnog projekata sa Italijom. Kao učesnik četvoročlanog tima, 2018. godine dobio je grant Pokreni se za nauku „Cirkulišuće mikroRNK kao neinvazivni biomarkeri neuromišićnih bolesti” koji dodeljuje kompanija „Filip Moris” u saradnji sa Centrom za razvoj liderstva. Od školske 2013/2014. kao student doktorand angažovan je na izvođenju praktične nastave na kursu Osnovi molekularne biologije na osnovnim studijama Univerziteta u Beogradu-Biološkog fakulteta, a takođe učestvuje u izvođenju nastave na predmetu Molekularna genetika humanih bolesti na master studijama. Bio je član komisije za odbranu tri master rada.

Autor je ili koautor 17 radova, od kojih je 13 kategorije M20 (6 M21, 4 M22 i 3 M23). Njegovi radovi citirani su 60 puta, a h-idneks je 5. Autor je predavanja i saopštenja na međunarodnim i nacionalnim konferencijama. Dobitnik je granta za mlade istraživače za odlazak na IDMC-11 (*International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting*, San Francisko, SAD 5-9. septembar 2017. godine), na kojem je imao usmenu prezentaciju rada „The origin and historical route of myotonic dystrophy type 2 mutation across Europe”. Dobitnik je granta za mlade istraživače za YSP (*Young Scientist Program*) i 24th IUBMB and 15th FAOBMB Congress (Seul, Republika Koreja, 2-8. jun 2018. godine), na kojem je imao usmenu prezentaciju rada „Dynamics of somatic instability in myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within *DMPK* expansions”. Jovan Pešović je član Srpskog društva za molekularnu biologiju, Srpske mreže za neuromišićne bolesti, Društva genetičara Srbije, Društva za neuronauke Srbije, Srpskog biološkog društva, Evropske federacije društava za neuronauke i Evropskog društva za humanu genetiku. Takođe, učestvovao je na Drugom regionalnom festivalu nauke, obrazovanja i umetnosti – NOU FEST 2014, kao i u organizaciji i realizaciji tri Petničke škole molekularne biologije „PCR u biološkim i biomedicinskim istraživanjima” u Istraživačkoj stanici Petnica u periodu od 2016. do 2018. godine.



# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јован Пешовић

Број индекса M3007/2013

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Митотичка и мејотичка нестабилност *DMPK* експанзија са варијантним поновцима као генетички модификатор фенотипа миотоничне дистрофије типа 1”

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јован З. Пешовић

Број индекса M3007/2013

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Митотичка и мејотичка нестабилност *DMPK* експанзија са варијантним поновцима као генетички модификатор фенотипа миотоничне дистрофије типа 1”

Ментори проф. др Душанка Савић-Павићевић

проф. др Видосава Ракочевић-Стојановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић” да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Митотичка и мејотичка нестабилност *DMPK* експанзија са варијантним поновцима као генетички модификатор фенотипа миотоничне дистрофије типа 1”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.