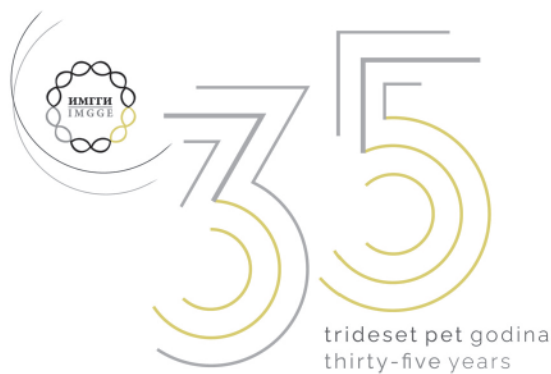


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.
IMGGI • IMGGE

Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse Marko Panić	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika Anita Skakić, Maja Stojilković	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije Marina Anđelković	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa Jovana Komazec, Milena Ugrin	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozii: geni kandidati i terapijski modaliteti Vesna Spasovski, Miša Vreća	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji Vladimir Gašić, Nataša Tošić	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti Ljiljana Rakićević	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Milka Malešević, Branko Jovčić	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

PREDGOVOR

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

Sonja Pavlović

IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih *DMPK* ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1

Jovan Pešović¹, Stojan Perić², Lana Radenković¹, Vidosava Rakočević-Stojanović^{2,3}, Dušanka Savić-Pavićević¹

¹ Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Centar za humanu molekularnu genetiku, Beograd, Srbija

² Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

Kontakt: jovan.pesovic@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Povećanje broja ponovljenih motiva u mikrosatelitskim lokusima ili dinamične mutacije uzrokuju skoro 50 neuroloških oboljenja, označenih kao bolesti ekspanzija ponovljenih motiva. Kvantitativan efekat broja ponovljenih motiva na fenotip i inherentno nestabilna priroda dinamičnih mutacija objašnjavaju jedinstvene karakteristike ove grupe bolesti, kao što su genetička anticipacija – ranije i teže ispoljavanje bolesti u narednim generacijama, i izrazito varijabilni klinički fenotipovi. Miotonična distrofija tip 1 (DM1) je uzrokovana ekspanzijama CTG tripleta u *DMPK* genu, čiji broj predstavlja glavnu determinantu ekstremno varijabilne kliničke prezentacije koja otežava predviđanje toka bolesti. Deo fenotipske varijabilnosti, neobjašnjene veličinom ekspanzije, ukazuje na postojanje dodatnih modifikatora bolesti. Kod ~5% DM1 bolesnika opisane su ekspanzije sa varijantnim tripletima (CCG, CTC, CAG), koji su dovedeni u vezu sa neobičnim i/ili blažim simptomima nego što bi se očekivalo na osnovu veličine ekspanzije datog bolesnika. Ovaj rad daje pregled dosadašnjih znanja o tipovima varijantnih tripleta u *DMPK* ekspanzijama, kliničkim karakteristikama bolesnika i mehanizmima kojim varijantni tripleti ostvaruju svoj modifikujući efekat na fenotip. Ključna uloga pripisuje se stabilišućem efektu varijantnih tripleta na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama, što objašnjava kasniji uzrast početka simptoma bolesti, kao i stabilišućem efektu u polnim ćelijama što objašnjava odsustvo najteže forme bolesti u porodicama sa varijantnim tripletima. Takođe, rad predstavlja naše originalno otkriće metilacije varijantnih CCG tripleta, koje otvara pitanje uloge epigenetičkih mehanizama u stabilizaciji *DMPK* lokusa. Dosadašnja znanja ističu kliničku relevantnost varijantnih tripleta u pogledu pružanja adekvatnog genetičkog saveta i regrutovanja bolesnika za kliničke studije, i podržavaju somatsku nestabilnost ekspanzija kao metu za nove terapeutike.

Ključne reči: miotonična distrofija 1, ekspanzije tripleta, somatska nestabilnost, metilacija DNK, uzrast početka bolesti, varijantni tripleti

Genetic and epigenetic characterization of variant *DMPK* expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1

Jovan Pešović¹, Stojan Perić², Lana Radenković¹, Vidosava Rakočević-Stojanović^{2,3}, Dušanka Savić-Pavićević¹

¹ University of Belgrade-Faculty of Biology, Centre for Human Molecular Genetics, Belgrade, Serbia

² Neurology Clinic, University Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade-Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia

Correspondence: jovan.pesovic@bio.bg.ac.rs

Abstract

Repeat expansions in microsatellites or dynamic mutations cause ~50 neurological diseases, known as repeat expansion diseases. Quantitative effect of the repeat number and inherent instability of dynamic mutations underlie unique features of these diseases, such as genetic anticipation – an earlier and more severe disease presentation in successive generations, and a pronounced variability in clinical presentation. Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by expansion of CTG repeats in *DMPK* gene, whose number is the main determinant of an extremely variable phenotype, making prognosis of the disease course challenging. A part of unexplained phenotype variability suggests the existence of disease modifiers. Variant repeats (CCG, CTC, CAG) are present in ~5% of patients and have been associated with unusual and/or milder symp-

toms than expected for a given expansion size. In this review, we provide an overview of types of variant repeats, clinical characteristics of patients, and mechanisms by which variant repeats modify DM1 phenotype. The key role is attributed to their stabilizing effect on *DMPK* expansions in the somatic cells, explaining a later age at symptoms onset, as well as in the germline cells, clarifying the absence of the most severe DM1 form in families with variant repeats. Additionally, we present our discovery of the methylation of CCG variant repeats, raising the question of the role of epigenetic mechanisms in the stabilization of *DMPK* locus. Current knowledge highlights the clinical relevance of variant repeats for genetic counseling and patient recruitment for clinical studies, and supports somatic instability of expansions as therapeutic targets.

Key words: myotonic dystrophy 1, triplet expansions, somatic instability, DNA methylation, age at onset, variant repeats

UVOD

Ponovljene sekvence DNK čine više od polovine genoma čoveka i predstavljaju značajan izvor genetičke varijabilnosti. Iako dugo smatrane viškom DNK (eng. *junk DNA*), savremena genomska istraživanja govore u prilog tome da su mnoge klase ovih sekvenci funkcionalne sa važnom regulatornom ulogom [1]. Mikrosateliti čine jednu od najbolje okarakterisanih klasa ponovljenih sekvenci. To su tandemski ponovljeni elementi sastavljeni od kratkih motiva dužine 1-6 baznih parova. Pretpostavlja se da postoji više od milion ovakvih lokusa rasutih u genomu čoveka koji zauzimaju približno 3% genoma [2]. Ovi elementi se odlikuju stopom mutacija koja je za nekoliko redova veličina veća u odnosu na prosečnu u genomu čoveka (10^{-3} vs. 10^{-9}) [3], što za posledicu ima da se broj ponovljenih motiva u okviru jednog lokusa razlikuje među individuama.

Mikrosatelitski lokusi dospevaju u fokus biomedicinskih istraživanja pre tri decenije kada je otkriveno da povećanje ili ekspanzija broja ponovljenih motiva može predstavljati direktan uzrok monogenских oboljenja. Ovaj novi tip mutacija je zbog svoje inherentne osobine da se broj ponovljenih motiva menja kroz generacije, dostižući stopu mutacije 1, nazvan dinamičnim mutacijama, a bolesti koje uzrokuju označene su kao bolesti ekspanzija ponovljenih motiva (eng. *repeat expansion diseases*). Do danas je opisano približno 50 oboljenja uzrokovanih dinamičnim mutacijama u kodirajućim i nekodirajućim regionima gena uzročnika. Čak 17 bolesti je opisano u poslednje tri godine zahvaljujući metodološkom napretku u tehnologijama sekvenciranja, posebno razvoju sekvenciranja dugih fragmenata DNK (eng. *long-read sequencing*) [4]. Može se očekivati da će identifikacija novih dinamičnih mutacija rasvetliti genetičku osnovu još izvesnog broja retkih bolesti koje se danas rutinski dijagnostikuju sekvenciranjem kratkih fragmenata DNK, tehnologijom koja je uglavnom „slepa” za ekspanzije ponovljenih motiva.

Zanimljivo je da se većina bolesti ekspanzija ponovljenih motiva manifestuje neurološkim simptomima, a značajan broj i razvojnim poremećajima. Najpoznatije među njima su: Hantingtonova bolest (HD), fragilni X sindrom, miotonične distrofije i amiotrofična lateralna skleroza. Jedinstvene osobine bolesti ekspanzija ponovljenih motiva u odnosu na druge monogenске bolesti su: genetička anticipacija – ranije ispoljavanje bolesti u narednim generacijama sa težom kliničkom slikom, i izrazito varijabilni klinički simptomi, čak i među članovima jedne porodice. Ove osobine, koje odstupaju od konvencionalnih Mendelovih principa nasleđivanja, objašnjavaju se kvantitativnim efektom broja ponovljenih motiva (veličine ekspanzije) na fenotip i inheretno nestabilnom prirodom dinamičnih mutacija kroz generacije i tokom života bolesnika [5]. Genotip-fenotip studije su, takođe, ukazale na postojanje dodatnih faktora koji mogu da modifikuju efekat uzročne mutacije.

Slično istraživanjima u poljima drugih retkih bolesti, istraživanja bolesti ekspanzija ponovljenih motiva su nakon upoznavanja odnosa genotip-fenotip i razumevanja molekularnih mehanizma patogeneze ušla u fazu ispitivanja inovativnih genetičkih terapija. Ispostavilo se da poseban izazov predstavlja regrutovanje bolesnika za kliničke studije usled izražene fenotipske varijabilnosti. U ovom radu će kroz fokus na miotoničnu distrofiju tipa 1, tipičnog predstavnika bolesti ekspanzija ponovljenih motiva, biti opisani karakteristični odnosi dinamičnih mutacija i fenotipa, poznati modifikatori efekata uzročne mutacije i mogući mehanizmi kojima modifikatori ostvaruju svoj efekat.

MIOTONIČNA DISTROFIJA TIP 1

Miotonična distrofija tip 1 (DM1, MIM #160900) je retka neuromišićna bolest multisistemskog karaktera koja pogađa 1-5 u 10000 osoba (ORPHA:273). Tipični simptomi bolesti uključuju: mišićnu slabost, miotoniju, kataraktu, zahvaćenost srčanog mišića, endokrinih organa i centralnog i perifernog nervnog sistema [6, 7]. Iako klinički opisana još početkom dvadesetog veka, genetička osnova bolesti otkrivena je tek 1992. godine. Kao uzročna mutacija DM1 okarakterisana je ekspanzija CTG tripleta u 3' netranslatirajućem regionu *DMPK* gena (MIM *605377) [8] (slika 1A). U osnovi patogeneze DM1 leži mutirana RNK sa ponovljenim CUG tripletima. Na njenim sekundarnim strukturama dolazi do funkcionalnog zarobljavanja proteina iz familije MBNL, što vodi formiranju toksičnih RNK fokusa u jedru [9]. MBNL proteini su multifunkcionalni RNK-vezivni proteini sa važnom ulogom master regulatora alternativnog splajsovanja. Posledica njihovog funkcionalnog zarobljavanja je opšti poremećaj metabolizma RNK u ćeliji, pre svega obrasca splajsovanja, čime se objašnjava multisistemski karakter DM1. Otkriće da molekul RNK dobija novu toksičnu funkciju (eng. *RNA gain-of-function*) prvi put je označeno kao glavni patološki mehanizam u osnovi neke bolesti upravo kod DM1 i miotonične distrofije tipa 2 [10]. Dodatni mehanizam molekularne patogeneze je specifičan vid translacije sa molekula RNK koji sadrže ekspanzije (eng. *repeat-associated non-ATG translation, RAN translation*) [11].

DM1 je jedno od fenotipski najvarijabilnijih monogenских oboljenja. Slično drugim bolestima ekspanzija ponovljenih motiva, veličina ekspanzije predstavlja glavnu determinantu fenotipa DM1 [12, 13]. Broj CTG tripleta kreće se u opsegu od 50-100 kod asimptomatskih osoba ili bolesnika sa blagim simptomima koji se javljaju nakon 40. godine života (kasna forma DM1). Najveći broj bolesnika ima 100-1000 CTG tripleta i odlikuje se simptomima tipičnim za DM1 koji počinju tokom adolescencije ili nakon 20. godine života (juvenilno-adultna forma DM1). *DMPK* ekspanzije sa više od 1000 tripleta uzrokuju najteže forme bolesti koje odlikuje mentalna retardacija i koje se ispoljavaju tokom dečijeg uzrasta ili na samom rođenju (dečija i kongenitalna forma DM1). Kongenitalna forma DM1 se često završava smrću odojčeta usled problema sa disanjem. Za DM1 porodice karakteristična je veoma upečatljiva genetička anticipacija. Za samo tri generacije, od asimptomatskog dede, preko ćerke, sa često nedijagnostikovanom adultnom formom bolesti u periodu prve trudnoće, bolest se u narednoj generaciji može manifestovati na samom rođenju.

Jedan od glavnih izazova u proceni veličine *DMPK* ekspanzije, a samim tim i u izučavanju odnosa genotipa i fenotipa, kao i praćenju promene veličine ekspanzije u međugeneracijskim prenošenjima, predstavlja izrazita nestabilnost ove mutacije u somatskim ćelijama. Somatska nestabilnost zavisi od veličine ekspanzije i uzrasta bolesnika, tkivno je specifična i ima tendenciju ka daljem povećanju broja tripleta tokom života bolesnika [14, 15]. U cilju što preciznije procene veličine ekspanzije primenjuje se specifična modifikacija PCR-a nazvana SP-PCR (eng. *small-pool PCR*). Metoda podrazumeva umnožavanje *DMPK* ekspanzija iz nekoliko desetina ćelija i kroz dovoljan broj ponavljanja omogućava određivanje veličine tzv. progenitornog alela, koji bi mogao predstavljati verovatnu nasleđenu veličinu ekspanzije [14, 16]. Na osnovu procene veličine progenitornog alela u grupi od preko 130 DM1 bolesnika, Morales i saradnici su utvrdili da veličina ekspanzije jeste glavna odrednica uzrasta pojave prvih simptoma [17]. Varijabilnost u veličini ekspanzije između bolesnika objašnjava ~65% ukupne varijabilnosti uzrasta na početku bolesti, dok preko 30% neobjašnjene varijabilnosti ukazuje na to da postoje drugi genetički, epigenetički i/ili sredinski faktori koji modifikuju efekat uzročne mutacije. Identifikacija i dokazivanje uloge potencijalnih modifikatora DM1 fenotipa je, kao i kod drugih retkih bolesti, izazovna. Najveću pažnju u polju privukli su varijantni tripleti, za koje danas možemo reći da su priznati modifikatori DM1 fenotipa.

TIPOVI VARIJANTNIH TRIPLETA U *DMPK* EKSPANZIJAMA I KLINIČKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA

Iako se za *DMPK* ekspanzije smatralo da se sastoje isključivo iz CTG tripleta, pre desetak godina opisane su ekspanzije sa prekidima u (CTG)n nizu, koji su označeni kao varijantni ponovljeni motivi [18, 19]. Do danas su identifikovani varijantni CCG, CGG, CAG i CTC tripleti na 3' kraju ekspanzija [18-21] i, znatno ređe, na 5' kraju [22, 23]. Kod najvećeg broja bolesnika opisani su varijantni CCG tripleti, koji su rasuti kao pojedinačni tripleti, prisutni kao delovi CCGCTG heksamera ili formiraju nizove većeg broja uzastopno ponovljenih CCG tripleta [20] (slika 1B). Različiti tipovi i obrasci varijantnih tripleta ukazuju na to da oni najverovatnije nastaju retkim baznim supstitucijama u čistom (CTG)n nizu, a kasnije se umožavaju duž ekspanzije usled proklizavanja DNK polimeraze tokom različitih procesa uključenih u metabolizam DNK. U prilog ovoj hipotezi govore i retki nalazi *de novo* nastalih CTC [20] i CCG [24, 25] varijantnih tripleta.

U studijama na DM1 bolesnicima iz različitih geografskih regiona, uključujući i region Srbije, procenjena učestalost varijantnih *DMPK* ekspanzija kreće se u opsegu 3-5% [18-21]. Procenat varijantnih ekspanzija bi mogao da bude veći, imajući u vidu da njihovo potencijalno prisustvo u središnjem delu ekspanzije uglavnom ostaje nezapaženo usled metodoloških ograničenja. Posebna modifikacija PCR-a – RP-PCR (eng. *repeat-primed PCR*) se zbog svoje jednostavnosti i visoke specifičnosti danas rutinski koristi u molekularnoj dijagnostici DM1 i može ukazati i na prisustvo prekida na kra-

jevima *DMPK* ekspanzija [26]. Restrikciona digestija proizvoda SP-PCR-a enzimom *Acil* (*Ssil*), koji prepoznaje restrikciono mesto CCGC, iskorišćena je za detekciju prekida, uključujući i one udaljene od krajeva ekspanzija, ali ograničena je na identifikaciju samo CCG i CGG tripleta prisutnih u vidu dužih uzastopnih nizova [20]. Važna prednost RP-PCR metode u odnosu na *Acil* digestiju je mogućnost određivanja strukture varijantnih *DMPK* ekspanzija Sangerovim sekvenciranjem RP-PCR proizvoda (slika 1B). Potencijal u prevazilaženju metodoloških nedostataka imaju tehnologije sekvenciranja dugih fragmenata DNK, koje su nedavno primenjene za određivanje strukture varijantnih *DMPK* ekspanzija [25] i otkrivanje novih ekspanzija ponovljenih motiva, poput ekspanzija GGC tripleta povezanih sa bolešću neuronskih unutarjedarnih inkluzija (eng. *neuronal intranuclear inclusion disease*) [27].

Klinička prezentacija prvih opisanih bolesnika sa varijantnim ekspanzijama odgovarala je DM1 fenotipu, ali nije promaklo pažnji prisustvo nekih atipičnih simptoma, kao i odsustvo kongenitalne forme bolesti [18, 19]. Među atipičnim simptomima, koji mogu otežati postavljanje pravilne dijagnoze, izdvajaju se hipertrofija listova i izraženija slabost proksimalne muskulature, koji su karakteristični simptomi za miotoničnu distrofiju tip 2 [20]. Upadljiva odlika DM1 bolesnika sa varijantnim tripletima iz nekoliko ispitivanih populacija je relativno kasniji početak simptoma bolesti i blaža klinička prezentacija nego što bi se očekivalo za datu veličinu ekspanzije [19, 20, 22]. Kasniji uzrast početka bolesti, ali i blaži srčani i respiratorni simptomi primećeni su i kod bolesnika sa varijantnim tripletima ispitivanim u okviru velike kliničke studije OPTIMISTIC (NCT02118779) [28]. Iako je kognitivno oštećenje prisutno kod približno dve trećine DM1 bolesnika [29], merenje opšteg kognitivnog statusa baterijom neuropsiholoških testova nije zabeležilo kognitivna oštećenja [20, 21]. Nedavni rezultati takođe podržavaju protektivni efekat varijantnih tripleta na simptome u centralnom nervnom sistemu, posebno na skor inteligencije na celokupnoj skali (eng. *Full Scale IQ*) i na brzinu obrade podataka [30].

Prva ispitivanja mehanizama kojima bi varijantni tripleti modifikovali fenotip pokazala su da se broj i veličina toksičnih RNK fokusa sa MBNL proteinima ne razlikuju između bolesnika sa varijantnim i čistim *DMPK* ekspanzijama [21]. Ostaje otvoreno pitanje da li molekuli RNK sa velikim brojem varijantnih tripleta mogu stupati u interakciju sa dodatnim RNK-vezivnim proteinima. Sa druge strane, ukazano je na to da bi varijantni tripleti mogli genetički stabilizovati *DMPK* ekspanzije u somatskim i polnim ćelijama, slično kao kod nekih drugih bolesti ekspanzija ponovljenih motiva [31, 32]. Takođe, sve je više dokaza da bi varijantni tripleti mogli uticati na epigenetičku strukturu *DMPK* lokusa, jer je kod nekih bolesnika sa varijantnim CCG tripletima opisana izmenjena DNK metilacija u regionu oko ekspanzije [33-36]. Ovi nalazi su otvorili pitanje povezanosti varijantnih tripleta sa epigenetičkim modifikatorima DM1 fenotipa.

UTICAJ VARIJANTNIH TRIPLETA NA SOMATSKU NESTABILNOST *DMPK* EKSPANZIJA

DMPK ekspanzije se odlikuju mitotičkom nestabilnošću koja počinje još u ranim fazama embrionalnog razvika i nastavlja se tokom života bolesnika, što za rezultat ima izražen mozaicizam u veličini ekspanzije u pojedinačnim ćelijama bolesnika [37, 38]. Step en somatske nestabilnosti zavisi od veličine ekspanzije i različit je u različitim tkivima, a razlikuje se i među bolesnicima [14, 15, 39]. Važna osobina kontinuirane somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija tokom života bolesnika je njena nagnutost ka daljem povećanju broja ponovaka, što se smatra molekularnom osnovom progresije bolesti [17].

Mozaicizam u veličini *DMPK* ekspanzije vizuelizuje se kao razmaz na rendgenskom filmu nakon Southern blota. Obično se kao veličina ekspanzije uzima modalna veličina određena kao tačka najvećeg intenziteta na razmazu. Metoda SP-PCR iskorišćena je za konverziju razmaza u diskretne trake koje predstavljaju pojedinačne ekspanzovane alele, čime je omogućena preciznija kvantifikacija stepena somatskog mozaicizma [14, 16]. Primenom SP-PCR-a uočeno je da je distribucija učestalosti alela u ćelijama krvi bolesnika nagnuta ka daljim ekspanzijama, kao i da postoji očuvanost donjeg opsega veličine ekspanzije između različitih tkiva, za koju je predloženo da bi mogla odgovarati veličini nasleđene ekspanzije od roditelja, zbog čega je označena kao veličina progenitornog alela [14]. Varijanta metode SP-PCR-a koja podrazumeva umnožavanje ekspanzovanih alela iz pojedinačnih molekula DNK (eng. *single-molecule SP-PCR*) omogućila je do sada najprecizniji uvid u step en somatskog mozaicizma *DMPK* ekspanzija [40, 41] (slika 1C). Primenom navedene metode, studija na grupi od preko 130 DM1 bolesnika pokazala je da se skoro 90% varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti *DMPK* ekspanzije može objasniti dužinom progenitornog alela i starosnim uzrastom bolesnika [17]. Navedeni rezultat potvrđen je u nedavnoj longitudinalnoj studiji na uzorcima krvi bolesnika iz više vremenskih tačaka u razmaku 8-15 godina [42]. Zabeleženo povećanje modalne veličine, kao i stepena somatske nestabilnosti tokom vremena, dodatno potvrđuju ranije zapažanje da je somatski mozaicizam kontinuiran tokom života bolesnika [38]. Neobjašnjen deo varijabilnosti u somatskoj nestabilnosti *DMPK* ekspanzije govori u prilog postojanju dodatnih individualno-specifičnih modifikujućih faktora [17].

Ubrzo nakon otkrića prekida u (CTG)_n nizu, pokazano je da se i varijantne *DMPK* ekspanzije odlikuju somatskim mozaicizmom [18]. Ispitivanja mitotičke nestabilnosti u ćelijama različitih tkiva (bukalna sluznica i krv) ukazala su na tkivnu specifičnost somatske nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija, koja zavisi od tipa i strukture varijantnih

tripleta, ali i dodatnih faktora specifičnih za ispitivane porodice [41]. U cilju ispitivanja da li varijantni tripleti predstavljaju individualno-specifične modifikatore somatske nestabilnosti *DMPK* ekspanzija, primenjeni su različiti pristupi. Jednostavno poređenje profila dobijenih metodom SP-PCR-a ukazalo je na vizuelno manji opseg somatskog mozaicizma kod bolesnika sa varijantnim u odnosu na nekoliko bolesnika sa čistim ekspanzijama, uparenih prema veličini ekspanzije i godinama starosti [23]. Isti pristup primenjen je u još jednoj studiji, s tim da je stepen somatske nestabilnosti, koji je poređen između grupa bolesnika sa i bez varijantnih tripleta, određivan kao razlika modalne i progenitorne veličine alela [24]. Ilustracije radi, na slici 1C predstavljene su distribucije učestalosti varijantnih i čistih *DMPK* ekspanzija dva bolesnika iz naše kolekcije, približno iste starosti i veličine progenitornog alela, gde se uočava manji stepen mitotičke nestabilnosti varijantnih *DMPK* ekspanzija u ćelijama krvi. Nedostatak ovakvog pristupa ogleđa se u činjenici da direktna poređenja pojedinačnih bolesnika ne uzimaju u obzir postojanje dodatnih faktora koji, uz veličinu ekspanzije i starost bolesnika, utiču na varijabilnost somatske nestabilnosti. Alternativni pristup podrazumeva korišćenje velike referentne grupe bolesnika sa čistim *DMPK* ekspanzijama, na osnovu koje se mogu dobiti modeli koji bolje oslikavaju sveukupnu varijabilnost u stepenu somatskog mozaicizma kod DM1 bolesnika u odnosu na nekoliko uparenih kontrola. Poređenje bolesnika sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama u odnosu na ovako definisanu referentnu grupu pruža detaljniji uvid u dinamiku somatske nestabilnosti kod ovih bolesnika. Tako je kod nekoliko bolesnika sa varijantnim ekspanzijama iz jedne porodice [18], kao i grupe nesrodnih bolesnika [41], zabeležen statistički značajno niži nivo somatske nestabilnosti u odnosu na očekivani u skladu sa modelom iz referentne grupe. Takođe, karakterizacijom mutacione dinamike somatske nestabilnosti tokom vremena, primećeno je statistički značajno manje povećanje modalne veličine ekspanzije kod bolesnika sa varijantnim ekspanzijama [41]. Navedeni rezultati su pružili verodostojne dokaze da se varijantni tripleti mogu smatrati individualno-specifičnim faktorom koji ima stabilizujući efekat na *DMPK* ekspanzije u somatskim ćelijama. Stabilizujući efekat se ispoljava nezavisno od tipa i obrasca varijantnih tripleta, njihove lokacije na 5' ili 3' kraju ekspanzije, kao i od toga da li su nastali *de novo* ili su nasleđeni [18, 23, 24, 41]. Smatra se da varijantni tripleti doprinose genetičkoj stabilizaciji *DMPK* ekspanzija kroz uticaj na formiranje i popravku mutagenih intermedijernih struktura (u vidu malih DNK petlji nestalih usled proklizavanja DNK polimeraze na ponovaljenim motivima), što je pokazano u istraživanjima u ćelijskim model sistemima [43].

POVEZANOST VARIJANTNIH TRIPLETA SA METILACIJOM *DMPK* LOKUSA

CTG tripleti u *DMPK* genu nalaze se u okviru CpG ostrva veličine 3,5 kb, koje obuhvata 3' kraj *DMPK* gena, *DM1-AS* gen i 5' kraj nizvodnog *SIX5* gena (slika 1A) i karakteriše se određenim obrascem konstitutivne hiper- i hipometilacije kod zdravih osoba. Ovo ostrvo uključuje i dva vezivna mesta za CTCF protein (eng. *CCCTC-binding factor*), koja kod zdravih osoba nisu metilovana [44]. Jedno mesto se nalazi neposredno uzvodno, a drugo neposredno nizvodno u odnosu na CTG triplete (slika 1A). Metilacija CpG ostrva u *DMPK* lokusu, pre svega uzvodno u odnosu na triplete, opisana je još krajem devedesetih godina prošlog veka kod najteže, kongenitalne forme DM1 [45]. Njeno prisustvo dovodi se u vezu sa ekspanzijama dužim od 1000 tripleta i smatra se da verovatno predstavlja dodatni mehanizam patogeneze za kongenitalnu formu čija molekularna osnova nije poznata [46]. Značaj izmenjene metilacije CpG ostrva kao epigenetičkog modifikatora uzročne mutacije DM1 postaje intrigantan nakon njenog opisivanja kod varijantnih *DMPK* ekspanzija, imajući u vidu da je ona prisutna kod bolesnika sa dijametralno suprotnim kliničkim prezentacijama – bolesnika sa najtežom kongenitalnom formom, sa jedne strane, i bolesnika sa varijantnim ekspanzijama i blažim simptomima od očekivanih, sa druge strane.

Metilacija CpG ostrva nizvodno od varijantnih *DMPK* ekspanzija različitih veličina i sa različitim brojem i obrascem CCG tripleta opisana je 2015. godine [36]. Polarizovana metilacija je, zatim, potvrđena kod izvesnog broja *DMPK* ekspanzija sa CCG tripletima, bez podataka o njihovoj strukturi i veličini [33, 34]. U našoj grupi bolesnika, metilacija je, u skladu sa rezultatima dotadašnjih istraživanja, detektovana nizvodno od varijantnih ekspanzija različitih veličina i sa različitim brojem i obrascem CCG tripleta na 3' kraju ekspanzije. Međutim, prvi put smo opisali metilaciju uzvodno od varijantnih ekspanzija koje su se odlikovale dugim CCG nizovima ili velikim brojem CCGCTG heksamera, takođe na 3' kraju ekspanzije [35]. Okolna metilacija nije zapažena kod bolesnika sa pojedinačnim CAG tripletom ili nekoliko CCG tripleta na 5' kraju relativno malih ekspanzija [23], kao ni kod bolesnika sa jednim CTC tripletom na 3' kraju ekspanzije [35]. Ovi rezultati sugerisali su da bi stepen metilacije u regionima oko varijantnih ekspanzija mogao da zavisi od tipa i obrasca varijantnih tripleta, njihove lokacije u okviru ekspanzije, kao i od veličine same ekspanzije.

Kako bismo ispitali navedene pretpostavke, istraživanja smo usmerili ka ispitivanju metilacije samih varijantnih CCG tripleta, kao i ka kvantifikaciji metilacije u CpG ostrvu uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije. Dizajniranjem metil-specifičnog RP-PCR-a [47], otkrili smo da su CCG tripleti metilovani u ćelijama krvi bolesnika. Primenom različito dizajniranih prajmera, metodu smo učinili semikvantitativnom (slika 1D), a dobijeni rezultati ukazali su na to da su CCG tripleti heterogeno metilovani i da je stepen njihove metilacije izraženiji ukoliko su u ekspanzijama prisutni u većem

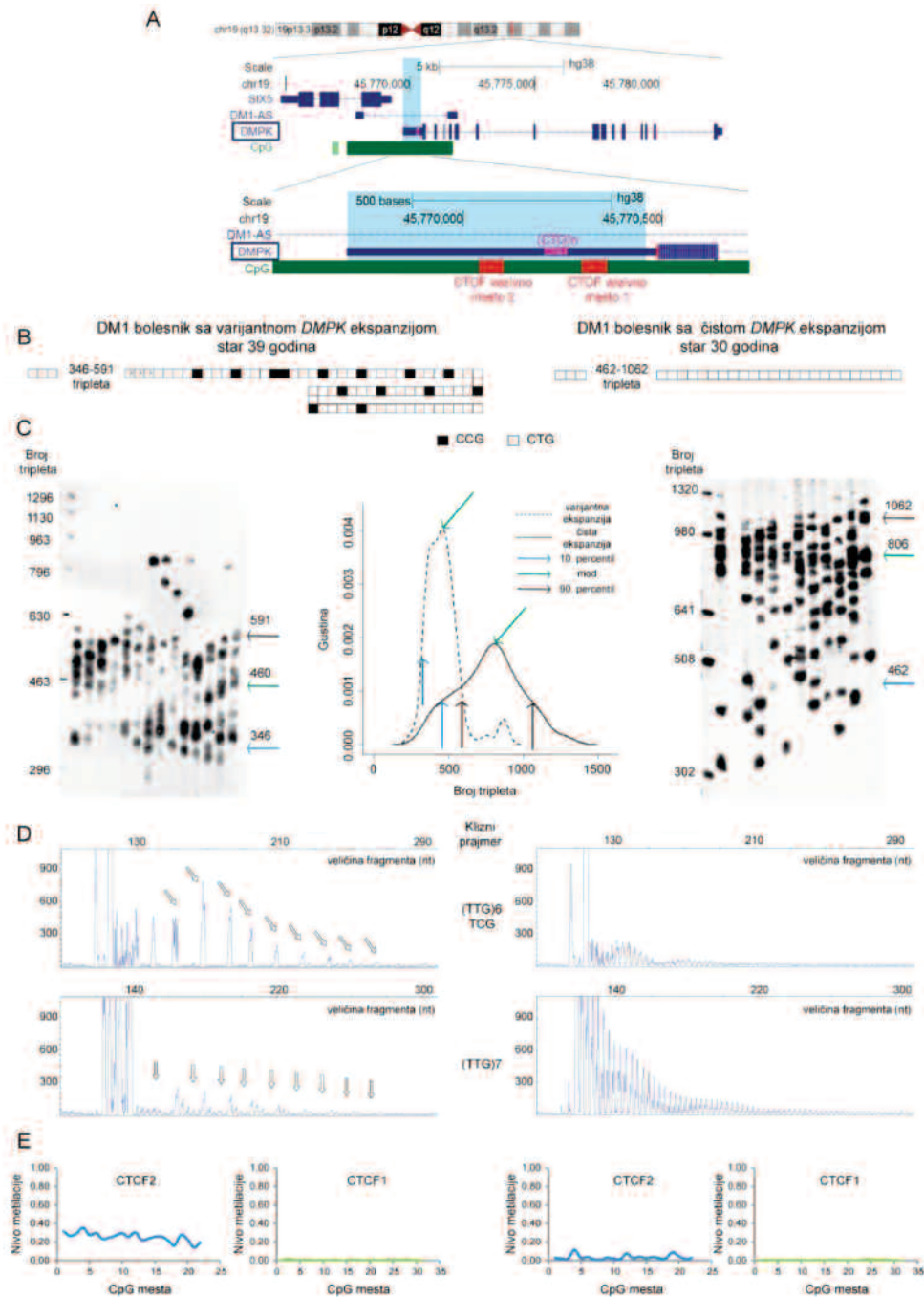
broju. Najveći stepen metilacije detektovan je kod bolesnika sa dugim CCG nizovima [35], velikim brojem CCGCTG heksamera ili velikim brojem pojedinačnih CCG tripleta na 3' kraju *DMPK* ekspanzije (naši neobjavljeni rezultati), kao što je slučaj kod bolesnika prikazanog na slici 1. Kvantifikacija metilacije CpG ostrva uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije, korišćenjem ciljanog bisulfitnog sekvenciranja nove generacije, pokazala je da su izražena metilacija nizvodno od ekspanzije, kao i određeni stepen metilacije uzvodno, prisutni upravo kod bolesnika sa većinski metilovanim CCG tripletima (slika 1E) (naši neobjavljeni rezultati). Ovi naši nalazi ukazuju na to da je glavni faktor koji utiče na stepen metilacije CCG tripleta, kao i na obrazac okolne metilacije, zastupljenost i struktura CCG tripleta, nezavisno od veličine ekspanzije. Na osnovu opisanih zapažanja, postavili smo hipotezu da bi metilacija DNK mogla da bude inicirana u okviru samih CCG tripleta na 3' kraju ekspanzije, a da se zatim lokalno širi, zahvatajući uzvodne i nizvodne CpG dinukleotide. Hipoteza o iniciranju metilacije DNK u okviru samih ekspanzija postavljena je i za *C9orf72* lokus u kome ekspanzije GGGGCC heksamera uzrokuju najčešći nasledni oblik amiotrofične lateralne skleroze. U *C9orf72* lokusu, metilacija je skoncentrisana na ponovljenim motivima na 5' kraju ekspanzije, a zahvata i uzvodne CpG dinukleotide [47].

Efekat metilacije DNK kao epigenetičkog modifikatora fenotipa DM1 zahteva ispitivanje na većoj grupi bolesnika sa varijantnim ekspanzijama praćenju detaljnim opisima kliničke prezentacije. Takođe, ostaje otvoreno pitanje molekularnog mehanizma kojim bi metilacija varijantnih *DMPK* ekspanzija mogla da ostvaruje efekat na fenotip. Skloni smo da verujemo da bi varijantni tripleti svoj stabilizujući efekat na *DMPK* ekspanzije jednim delom mogli ispoljavati putem metilacije DNK. Takođe, jedinstveni efekat metilacije u *DMPK* lokusu, nezavisno od toga da li je ona povezana sa velikim ekspanzijama koje uzrokuju kongenitalnu formu bolesti ili sa varijantnim ekspanzijama, mogao bi biti genetička stabilizacija lokusa. Naime, metilacija uzvodno i nizvodno od *DMPK* ekspanzije kod bolesnika sa varijantnim CCG tripletima zajedno sa metilacijom nizvodno od ekspanzija povezanih sa kongenitalnom formom DM1, briše jasnu granicu polarizovanosti metilacije DNK kod ovih bolesnika. U skladu sa biološkom ulogom metilacije DNK kao odbrambenog mehanizma od „invazivnih” ponovljenih sekvenci [48], uključujući i ekspanzije mikrosatelita [49], može se pretpostaviti da lokalna metilacija DNK stabilizuje *DMPK* ekspanzije, slično lokalnoj metilaciji povezanoj sa ekspanzijama CGG tripleta u *FMR1* lokusu, koje uzrokuju Fragilni X sindrom. Testiranje ove hipoteze zahteva dalja istraživanja u model sistemima u kojima bi genetičkim i epigenetičkim manipulacijama efekti samih varijantnih tripleta i metilacije DNK mogli nezavisno da se ispituju.

VARIJANTNI TRIPLETI MODIFIKUJU UZRAST POČETKA BOLESTI KROZ STABILIZACIJU *DMPK* EKSPANZIJA U SOMATSKIM ČELIJAMA

Imajući u vidu stabilizujući efekat varijantnih tripleta u somatskim ćelijama, pažnja je usmerena na ispitivanje povezanosti stabilizacije *DMPK* ekspanzija i uzrasta pojave prvih simptoma bolesti [41]. Najveći deo ukupne varijabilnosti u uzrastu pojave prvih simptoma objašnjava sama veličina ekspanzije, a zatim i individualne razlike u varijabilnosti somatskog mozaicizma među bolesnicima [17]. Drugim rečima, bolesnici kod kojih se ekspanzije brže povećavaju tokom života ispoljavaju bolest ranije od proseka očekivanog za datu veličinu ekspanzije [17]. Sličan rezultat je dobitan kod HD bolesnika, kod kojih su individualne razlike u somatskoj nestabilnosti *HTT* ekspanzija bile značajan prediktor uzrasta početka bolesti [50]. Navedeni zaključci podržavaju hipotezu somatskog praga, koji je predložen za HD [51] i DM1 [17], a prema kojoj do ispoljavanja simptoma bolesti dolazi kada dovoljan broj somatskih ćelija akumulira dovoljno duge ekspanzije koje ostvaruju toksičan efekat na nivou molekula RNK i/ili proteina. Naša studija je pokazala da upravo individualne razlike u nivou somatske nestabilnosti ostvaruju statistički značajno veći efekat na uzrast početka bolesti kod DM1 bolesnika sa varijantnim u odnosu na one sa čistim ekspanzijama [41]. Ovaj rezultat ukazuje na to da varijantni tripleti kroz stabilizaciju *DMPK* ekspanzija predisponiraju DM1 bolesnike za kasniji početak bolesti, što ih čini važnim modifikatorima DM1 fenotipa [41].

Zaključak da varijantni tripleti modifikuju uzrast pojave prvih DM1 simptoma kroz stabilizaciju *DMPK* ekspanzija u somatskim ćelijama, u skladu je sa nalazom da supresija somatske nestabilnosti u mišjim HD modelima, kako genetičkim manipulacijama gena za reparacione mehanizme DNK [51] tako i farmakološkim agensima, u velikoj meri odlaže početak bolesti [51, 52]. Osim toga, studije asocijacije na nivou čitavog genoma kod HD bolesnika identifikovale su varijante u genima odgovornim za reparaciju DNK kao modifikatore toka bolesti [53, 54]. Sličan rezultat je dobijen i u nedavnoj studiji na velikim grupama HD i DM1 bolesnika, u kojoj je pokazano da varijanta u genu *MSH3* značajno modifikuje uzrast početka obe bolesti [55], najverovatnije putem stabilizujućeg efekta na datu lokus u somatskim ćelijama [56]. Sveukupno, rezultati istraživanja somatske nestabilnosti ekspanzija povezanih sa različitim bolestima, posebno saznanja stečena na DM1 i HD bolesnicima, učinila su somatsku nestabilnost privlačnom metodom za razvoj inovativnih terapija.



Slika 1. Somatska nestabilnost i lokalna epigenetička struktura DMPK ekspanzija slične veličine progenitornog alela i različite strukture kod DM1 bolesnika slične starosne dobi. (A) Prikaz anotacije 19q13.32 regiona genoma preuzet iz UCSC genomskog pretraživača (<https://genome.ucsc.edu/>). CTG tripleti (pink pravougaonik) nalaze se u 3' netranslatirajućem regionu DMPK gena (plavi pravougaonici - egzoni, plave linije - introni). CpG ostrvo (zeleni pravougaonik) obuhvata 3' kraj DMPK gena, DM1-AS gen i 5' kraj SIX5 gena. CpG ostrvo sadrži dva vezivna mesta za CTCF protein, jedno uzvodno (CTCF1) i jedno nizvodno (CTCF2) u odnosu na CTG triplete. (B) Struktura DMPK ekspanzije sa varijantnim CCG tripletima na 3' kraju (levo) i sa čistim CTG tripletima (desno), utvrđena RP-PCR-om (eng. *repeat-primed PCR*) i Sangerovim sekvenciranjem [20]. Usled metodoloških ograničenja, nejasnoće u strukturi varijantne ekspanzije uzvodno od samog 3' kraja prikazane su znacima pitanja. (C) Određivanje veličine i kvantifikacija nestabilnosti DMPK ekspanzija u ćelijama krvi primenom SP-PCR-a iz pojedinačnih molekula DNK (eng. *single-molecule small-pool PCR*). Rendgenski filmovi sa SP-PCR proizvodima vizuelizovanim hibridizacijom sa digoksigeninom obeleženom (CAG)12 probom [16, 41]. Svaki signal predstavlja DMPK ekspanziju umnoženu iz pojedinačne ćelije. Veličine DMPK alela i standarda za dužinu fragmenata izražene su u broju tripleta. Na osnovu >100 analiziranih DMPK ekspanzija po uzorku, dobijene su distribucije učestalosti DMPK ekspanzija (grafik gustine u sredini). Strelice na distribucijama i rendgenskim filmovima označavaju poziciju modalne veličine, kao i veličine 10. i 90. percentila distribucije. Stepen somatske nestabilnosti, predstavljen razlikom između veličine 90. i 10. percentila, niži je kod bolesnika sa varijantnom ekspanzijom, što se ogleda užom distribucijom i bez nagnutosti ka većim veličinama alela. (D) Detekcija metilacije CCG tripleta na 3' kraju DMPK ekspanzije korišćenjem metil-specifičnog RP-PCR-a [35]. U reakciji RP-PCR-a sa bisulfitno konvertovanom DNK i kliznim prajmerom (TTG)6TCG, koji se poslednjim tripletom specifično vezuje za metilovane CCG triplete, dobijeni profil za varijantnu DMPK ekspanziju sadrži specifične signale (označene strelicama) koji odgovaraju pozicijama pojedinačnih metilovanih CCG tripleta (levo). Sa druge strane, dobijeni lestvičast profil za čistu DMPK ekspanziju odlikuje se signalima slabog intenziteta usled smanjene efikasnosti vezivanja ovog kliznog prajmera za nemetilovane CTG triplete (desno). Primenom kliznog prajmera (TTG)7, koji se vezuje za nemetilovane CCG triplete i nemetilovane CTG triplete, za čistu DMPK ekspanziju dobijen je karakterističan lestvičast RP-PCR profil koji ukazuje na odsustvo metilacije, dok se profil dobijen za varijantnu DMPK ekspanziju odlikuje padom u intenzitetu signala i prazninama (označene strelicom), što ukazuje na većinsku metilaciju CCG tripleta. (E) Kvantifikacija metilacije DNK u CpG dinukleotidima uzvodno i nizvodno od CTG tripleta korišćenjem ciljanog bisulfitnog sekvenciranja nove generacije (Illumina). Povećan nivo metilacije DNK prisutan je nizvodno od varijantne ekspanzije i zahvata CTCF2 mesto. Izmenjena metilacija CpG dinukleotida nije detektovana uzvodno od varijantne DMPK ekspanzije, kao ni u okolnim sekvencama čiste DMPK ekspanzije.

UTICAJ VARIJANTNIH TRIPLETA NA MEĐUGENERACIJSKU PRENOŠENJE DMPK EKSPANZIJA I KLINIČKE IMPLIKACIJE

Molekularna osnova genetičke anticipacije kod DM1 je mejotička nestabilnost uzročne mutacije kod koje pravac i veličina promene u međugeneracijskom prenošenju pokazuju specifičnosti vezane za veličinu same ekspanzije i pol roditelja prenosioca [57]. Ekspanzije veličine 50-100 tripleta odlikuju se relativnom stabilnošću ako ih prenose majke, dok kod očeva gotovo uvek podležu daljoj ekspanziji u narednoj generaciji [58]. Sa druge strane, ekspanzije veličine preko 100 tripleta oba pola prenose izuzetno nestabilno, pri čemu se prilikom prenošenja velikih ekspanzija kod očeva zapaža znatno češći udeo kontrakcija (smanjenje broja tripleta) [59]. To je razlog zbog kojeg se kongenitalna forma bolesti sa ekspanzijama veličine preko 1000 tripleta nasleđuje gotovo isključivo od majke. Navedene osobine mejotičke nestabilnosti *DMPK* ekspanzije razjasnile su tipičan primer genetičke anticipacije u DM1 porodicama u kojima asimptomatski deda prenosi ekspanziju na ćerku koja svom detetu prenosi kongenitalnu formu bolesti. Međutim, već su rane studije na velikom broju DM1 porodica ukazale na odstupanja u navedenim obrascima međugeneracijskog prenošenja DM1 ekspanzije [59]. Intrigantne su bile porodice bez kongenitalne forme bolesti u kojima je prenosilac majka sa adultnom formom bolesti, posebno one kod kojih je opisivana međugeneracijska kontrakcija. Ispostavilo se da su varijantni tripleti, za sada, jedini poznati faktori koji modifikuju efekat veličine ekspanzije i pola roditelja tokom međugeneracijskog prenošenja *DMPK* ekspanzije.

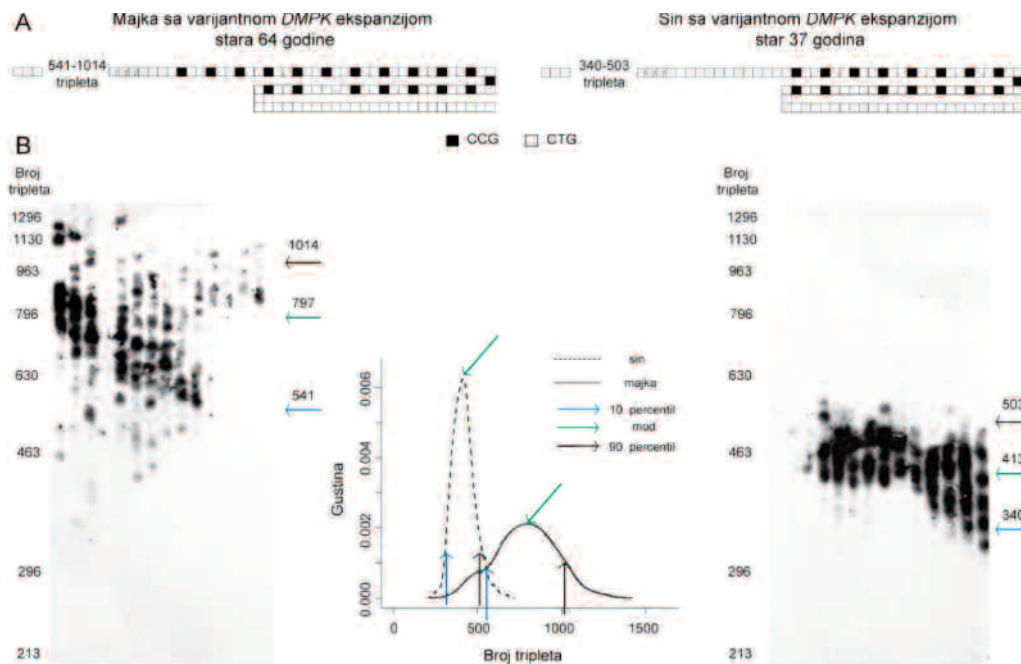
Poređenjem međugeneracijskih prenošenja varijantnih i čistih *DMPK* ekspanzija, uzimajući u obzir literaturne i spostvene podatke do 2017. godine, pokazali smo da je udeo kontrakcija ili stabilnih prenošenja statistički značajno veći u porodicama sa varijantnim DM1 ekspanzijama, kao i da u slučaju prenošenja varijantnih *DMPK* ekspanzija ne postoje specifičnosti vezane za pol roditelja prenosioca [20]. Na slici 2 prikazan je primer DM1 porodice (majke i sina) sa velikim brojem CCG tripleta prisutnih u vidu ponovljenih motiva CCG(CTG)₂ na 3' kraju ekspanzije i najverovatnijom međugeneracijskom kontrakcijom. Zapažanje da se ekspanzija sa jednim varijantnim CAG tripletom stabilno prenosi ili podleže kontrakciji u sukcesivnim generacijama ukazuje na to da i pojedinačna zamena u tripletu CTG može uticati na povećanu mejotičku stabilnost *DMPK* ekspanzije [23]. Smatra se da mejotička stabilnost varijantnih *DMPK* ekspanzija, posebno u slučajevima kada je majka prenosilac, predstavlja najverovatnije objašnjenje za odsustvo kongenitalnih formi bolesti u ovim DM1 porodicama [18, 23]. Činjenica da prisustvo varijantnih tripleta u *DMPK* ekspanzijama može uticati na međugeneracijsku promenu veličine ekspanzije, sa direktnim fenotipskim posledicama, u praksi otežava pružanje adekvatnog genetičkog saveta DM1 porodicama sa varijantnim ekspanzijama.

Bez obzira na to što pol roditelja prenosioca ne utiče na samo prenošenje varijantnih *DMPK* ekspanzija, treba istaći da su sve do sada opisane *de novo* nastale varijantne *DMPK* ekspanzije prenešene sa oca, bilo da je u pitanju ekspanzija sa pojedinačnim CTC tripletom [20], ili sa različitim obrascem CCG tripleta [24, 25]. Osim kod DM1, pokazano je da varijantni ponovljeni motivi utiču na stabilizaciju prenošenja ekspanzija kroz generacije i u nekim drugim bolestima ekspanzija, kao što su različite forme spinocerebelarnih ataksija [31, 32, 60].

Zanimljivo je da su među DM1 porodicama sa varijantnim *DMPK* ekspanzijama opisane i kontrakcije u međugeneracijskom prenošenju praćene ranijim uzrastom početka bolesti [20, 22]. Ovde treba imati u vidu da je interpretacija međugeneracijske dinamike rezultat kombinacije mejotičke nestabilnosti kod roditelja prenosioca i mitotičke nestabilnosti u ćelijama krvi roditelja i potomaka, koje su kontinuirane tokom života i nagnute ka daljim ekspanzijama (slika 2). Zbog nemogućnosti nedvosmislenog utvrđivanja veličine ekspanzije koju dete nasleđuje, ostaje otvoreno pitanje da li je u navedenim slučajevima zaista reč o kontrakcijama, praćenim ranijim početkom bolesti, ili pseudokontrakcijama u kojima je međugeneracijsko povećanje broja tripleta zamaskirano somatskim mozaicizmom kod roditelja. Međutim, slično zapažanje opisano je kod bolesnika sa spinocerebelarnom ataksijom tip 10, kod kojih je u skoro svim slučajevima kontrakcija varijantnih ekspanzija bila praćena ranijim ispoljavanjem kliničkih simptoma bolesti [60].

ZAKLJUČAK

Detaljna molekularno-genetička i klinička ispitivanja malobrojnih DM1 bolesnika sa varijantnim ekspanzijama je od izuzetnog značaja iz nekoliko razloga. Najpre, trenutni podaci ukazuju na to da se bolesnici sa varijantnim ekspanzijama razlikuju od onih sa čistim, u vidu stabilnijeg prenošenja ekspanzije kroz generacije, zatim da imaju kasniji početak simptoma i sporiju progresiju bolesti. Ova saznanja treba pažljivo interpretirati u cilju pružanja adekvatnog genetičkog saveta. Dodatno, DM1 bolesnici sa varijantnim ekspanzijama bi mogli značajno odstupati u kliničkim studijama za nove terapeutike, koje se obično sprovode na manjem broju bolesnika, što može uticati na tumačenje rezultata i donošenje adekvatnih zaključaka. Na kraju, pokazana uloga varijantnih tripleta u somatskoj stabilizaciji ekspanzija ukazuje na značaj ispitivanja novih farmakoloških agenasa, koji bi suzbijanjem somatske nestabilnosti odložili pojavu i ublažili simptome bolesti.



Slika 2. Primer međugeneracijskog prenošenja varijantne DMPK ekspanzije. (A) Struktura DMPK ekspanzije kod DM1 porodice (majka i sin) koja poseduje varijantne triplete CCG na 3' kraju ekspanzije, utvrđena RP-PCR-om (eng. *repeat-primed PCR*) i Sangerovim sekvenciranjem [20]. Usled metodoloških ograničenja, nejasnoće u strukturi varijantne ekspanzije uzvodno od samog 3' kraja prikazane su znacima pitanja. (B) Određivanje veličine i kvantifikacija nestabilnosti DMPK ekspanzija u ćelijama krvi primenom SP-PCR-a iz pojedinačnih molekula DNK (eng. *single-molecule small-pool PCR*). Rendgenski filmovi sa SP-PCR proizvodima vizuelizovanim hibridizacijom sa digoksigeninom obeleženom (CAG)12 probom [16, 41]. Svaki signal predstavlja DMPK ekspanziju umnoženu iz pojedinačne ćelije. Veličine DMPK alela i standarda za dužinu fragmenata izražene su u broju tripleta. Na osnovu >100 analiziranih DMPK ekspanzija po uzorku, dobijene su distribucije učestalosti DMPK ekspanzija (grafik gustine u sredini). Strelice na distribucijama i rendgenskim filmovima označavaju poziciju modalne veličine, kao i veličine 10. i 90. percentila distribucije. Stepenn somatske nestabilnosti, predstavljen razlikom između veličine 90. i 10. percentila, značajno je niži kod sina u odnosu na majku. Iako stepen somatskog mozaicizma zavisi od uzrasta bolesnika pri uzorkovanju, zanimljivo je da se opsezi veličina ekspanzije ne preklapaju između majke i sina, što govori u prilog verovatnoj kontrakciji prilikom međugeneracijskog prenošenja.

ZAHVALNICA

Rad je rezultat istraživanja koja je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republika Srbija (projekti br. 173016 i 175083). Posebnu zahvalnost dugujemo svim DM1 porodicama iz Srbije za učešće u našim istraživanjima.

LITERATURA

- Hannan AJ. Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):286-98. doi: 10.1038/nrg.2017.115.
- Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol.* 2003;4(2):R13. doi: 10.1186/gb-2003-4-2-r13.
- Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1408-15. doi: 10.1086/301869.
- Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 2021;108(5):764-85. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.03.011.
- Paulson H. Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol.* 2018;147:105-23. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9.
- Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(4):594-606. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.05.019.
- Rakocevic-Stojanovic V, Peric S, Basta I, Dobricic V, Ralic V, Kacar A, et al. Variability of multisystemic features in myotonic dystrophy type 1—lessons from Serbian registry. *Neurol Res.* 2015;37(11):939-44. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000068.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, et al. 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.* 1992;69(2):385.
- Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science.* 2000;289(5485):1769-73.
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125.
- Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(1):260-5. doi: 10.1073/pnas.1013343108.
- De Antonio M, Dogan C, Hamroun D, Mati M, Zerrouki S, Eymard B, et al. Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(10):572-80. doi: 10.1016/j.neurol.2016.08.003.

13. Savic Pavicevic D, Miladinovic J, Brkusanin M, Svikovic S, Djurica S, Brajuskovic G, et al. Molecular genetics and genetic testing in myotonic dystrophy type 1. *Biomed Res Int.* 2013;2013:391821. doi: 10.1155/2013/391821.
14. Monckton DG, Wong LJ, Ashizawa T, Caskey CT. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet.* 1995;4(1):1-8.
15. Wong LJ, Ashizawa T, Monckton DG, Caskey CT, Richards CS. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):114-22.
16. Savic D, Rakovic-Stojanovic V, Keckarevic D, Culjkovic B, Stojkovic O, Mladenovic J, et al. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. *Hum Mutat.* 2002;19(2):131-9. doi: 10.1002/humu.10027.
17. Morales F, Couto JM, Higham CF, Hogg G, Cuenca P, Braidia C, et al. 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.* 2012;21(16):3558-67. doi: 10.1093/hmg/dds185.
18. Braidia C, Stefanatos RK, Adam B, Mahajan N, Smeets HJ, Niel F, et al. 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.* 2010;19(8):1399-412. doi: 10.1093/hmg/ddq015.
19. Musova Z, Mazanec R, Krepelova A, Ehler E, Vales J, Jaklova R, et al. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(7):1365-74. doi: 10.1002/ajmg.a.32987.
20. Pesovic J, Peric S, Brkusanin M, Brajuskovic G, Rakocevic-Stojanovic V, Savic-Pavicevic D. Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics.* 2017;18(4):207-18. doi: 10.1007/s10048-017-0523-7.
21. Santoro M, Masciullo M, Pietrobono R, Conte G, Modoni A, Bianchi ML, et al. Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions. *J Neurol.* 2013;260(5):1245-57. doi: 10.1007/s00415-012-6779-9.
22. Botta A, Rossi G, Marcaurelio M, Fontana L, D'Apice MR, Brancati F, et al. Identification and characterization of 5' CCG interruptions in complex DMPK expanded alleles. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(2):257-61. doi: 10.1038/ejhg.2016.148.
23. Tome S, Dandelot E, Dogan C, Bertrand A, Genevieve D, Pereon Y, et al. Unusual association of a unique CAG interruption in 5' of DM1 CTG repeats with intergenerational contractions and low somatic mosaicism. *Hum Mutat.* 2018;39(7):970-82. doi: 10.1002/humu.23531.
24. Cumming SA, Hamilton MJ, Robb Y, Gregory H, McWilliam C, Cooper A, et al. 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.* 2018;26(11):1635-47. doi: 10.1038/s41431-018-0156-9.
25. Mangin A, de Pontual L, Tsai YC. Robust Detection of Somatic Mosaicism and Repeat Interruptions by Long-Read Targeted Sequencing in Myotonic Dystrophy Type 1. 2021;22(5). doi: 10.3390/ijms22052616.
26. Radvansky J, Ficek A, Minarik G, Palffy R, Kadasi L. Effect of unexpected sequence interruptions to conventional PCR and repeat primed PCR in myotonic dystrophy type 1 testing. *Diagn Mol Pathol.* 2011;20(1):48-51. doi: 10.1097/PDM.0b013e3181efe290.
27. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, Hamanaka K, Mori K, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-21. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y.
28. Wenninger S, Cumming SA, Gutschmidt K, Okkersen K, Jimenez-Moreno AC, Daidj F, et al. Associations Between Variant Repeat Interruptions and Clinical Outcomes in Myotonic Dystrophy Type 1. *Neurol Genet.* 2021;7(2):e572. doi: 10.1212/NXG.0000000000000572.
29. Peric S, Mandic-Stojmenovic G, Stefanova E, Savic-Pavicevic D, Pesovic J, Ilic V, et al. Frontostriatal dysexecutive syndrome: a core cognitive feature of myotonic dystrophy type 2. *J Neurol.* 2015;262(1):142-8. doi: 10.1007/s00415-014-7545-y.
30. Miller JN, van der Plas E. Variant repeats within the DMPK CTG expansion protect function in myotonic dystrophy type 1. 2020;6(5):e504. doi: 10.1212/nxg.0000000000000504.
31. Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, Zuhlke C, Nakamura K, Rasmussen A, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(2):215-22. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201954.
32. Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB, et al. Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10: repeat purity as a disease modifier? *Am J Hum Genet.* 2006;78(1):125-9. doi: 10.1086/498654.
33. Hildonen M, Knak KL, Duno M, Vissing J, Tumer Z. Stable Longitudinal Methylation Levels at the CpG Sites Flanking the CTG Repeat of DMPK in Patients with Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes (Basel).* 2020;11(8). doi: 10.3390/genes11080936.
34. Légaré C, Overend G, Guay SP, Monckton DG, Mathieu J, Gagnon C, et al. DMPK gene DNA methylation levels are associated with muscular and respiratory profiles in DM1. *Neurol Genet.* 2019;5(3):e338. doi: 10.1212/nxg.0000000000000338.
35. Pešović J. Mitotička i mejotička nestabilnost DMPK ekspanzija sa varijantnim ponovcima kao genetički modifikator fenotipa miotonične distrofije tipa 1 [Doctoral dissertation]. Beograd: Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet; 2019.
36. Santoro M, Fontana L, Masciullo M, Bianchi ML, Rossi S, Leoncini E, et al. 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.* 2015;1852(12):2645-52. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.09.007.
37. Martorell L, Johnson K, Boucher CA, Baiget M. Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet.* 1997;6(6):877-80.
38. Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, Lopez de Munain A, et al. Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet.* 1998;7(2):307-12.
39. Corrales E, Vasquez M, Zhang B, Santamaria-Ulloa C, Cuenca P, Krahe R, et al. Analysis of mutational dynamics at the DMPK (CTG)_n locus identifies saliva as a suitable DNA sample source for genetic analysis in myotonic dystrophy type 1. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216407. doi: 10.1371/journal.pone.0216407.
40. Gomes-Pereira M, Bidichandani SI, Monckton DG. Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2004;277:61-76. doi: 10.1385/1-59259-804-8:061.
41. Pesovic J, Peric S, Brkusanin M, Brajuskovic G, Rakocevic-Stojanovic V, Savic-Pavicevic D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018;9:601. doi: 10.3389/fgene.2018.00601.
42. Morales F, Vásquez M, Corrales E, Vindas-Smith R, Santamaria-Ulloa C, Zhang B, et al. Longitudinal increases in somatic mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. *Hum Mol Genet.* 2020;29(15):2496-507. doi: 10.1093/hmg/ddaa123.
43. Rolfsmeier ML, Dixon MJ, Lahue RS. Mismatch repair blocks expansions of interrupted trinucleotide repeats in yeast. *Mol Cell.* 2000;6(6):1501-7.
44. Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, et al. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet.* 2001;28(4):335-43. doi: 10.1038/ng570.

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

Godišnje

Tiraž

200 primeraka

Autori

Anđelković Marina	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana	180
Djusalov Mila	21
Đorić Ilona	133
Gadjanski Ivana	21
Gašić Vladimir	113
Išić Denčić Tijana	96
Janjušević Ljiljana	21
Janković Miljuš Jelena	133
Janković Radmila	96
Jovčić Branko	166
Keckarević Dušan	54
Keckarević Marković Milica	54
Kecmanović Miljana	54
Knežić Teodora	21
Kojadinović Milica	152
Kokanov Nikola	123
Komazec Jovana	84
Kosijer Petar	21
Kotur Nikola	6
Kožik Bojana	123
Krajnović Milena	123
Malešević Milka	166
Nikolić Dragana	180
Panić Marko	33
Perić Stojan	60
Pešović Jovan	60
Popović D. Željko	21
Radenković Lana	60
Rakićević Ljiljana	146
Rakočević-Stojanović Vidosava	60
Ristić Nina	96
Samardžić Jelena	180
Savić-Pavićević Dužanka	60
Šelemetjev Sonja	133
Skakić Anita	42
Spasovski Vesna	107
Stanković Biljana	6
Stojiljković Maja	42
Tošić Nataša	113
Ugrin Milena	84
Vreća Miša	107
Zukić Branka	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929