

MUSKÜLER DİSTROFİ TANISI ALMIŞ OLGULARDA DİSTROFİN GEN MUTASYON ANALİZ SONUÇLARI VE KLİNİK BULGULAR İLE KORELASYONU

Dr. Necat İMİRZALIOĞLU (*), Dr. Yasemin SOYSAL (*), Dr. Rıdvan AKIN(**),
Dr. Davut GÜL (*), Dr. Bülent ÜNAY (**), Dr. Şefik GÜRAN (*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (1) : 25 - 28 (2003)

ÖZET

"X linked" kalıtım kalıbı gösteren Duchenne Musküler Distrofi ve ondan daha hafif bir klinik tablo oluşturan Becker Tip Musküler Distrofi tüm kas hastalıkları içinde önemli bir grubu oluşturmaktadır. Her ikisi de distrofin genine ait mutasyonlar ile karşımıza çıkar. Bulunan mutasyonların %65' i farklı eksonları tutan delesyonlardır. Burada anabilim dalımıza musküler distrofi ön tanısı ile gönderilen 16 olgu ve ailesi distrofin genine ait delesyonlar yönünden taranmış (pb, pm, 3, 4, 8, 12, 17, 19, 32, 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ve 52. eksonlar) ve elde edilen sonuçlar klinik bulgular ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmeye alınan 16 olgudan birinde distrofin gen mutasyonunu tanımlanmamış olup olgu halen myotonik distrofi olarak takip edilmektedir. Duchenne Musküler Distrofi ve Becker Musküler Distrofi tanısı alan olguların %55' inde distrofin genine ait mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyon saptanan 7 olgu Duchenne Musküler Distrofi ve Becker Musküler Distrofi tanısı almış, 3 kadın olguda ise DMD taşıyıcılığı saptanmıştır. Hastalık tanısı alan tüm olgularda tanı klinik bulgular, kas biyopsisi, EMG bulguları ve biyokimya sonuçları (artmış CPK düzeyleri) ile desteklenmiştir. Mutasyon tanımlanmayan 7 olgudan biri Becker Musküler Distrofi, 6' sı ise Duchenne Musküler Distrofi tanısı almıştır. Elde edilen sonuçlar distrofin genine ait mutasyon analizinin tanı ve prenatal tanıdaki önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Duchenne Musküler Distrofi, Becker Musküler Distrofi, Distrofin Geni.

SUMMARY

Dystrophin Gene Mutations in Cases Diagnosed as Muscular Dystrophia and the Correlations with the Clinical Findings

Duchenne Muscular Dystrophy and Becker Muscular Dystrophy (milder form) inherited as X linked are the important groups of muscular dystrophies. Both of these types are caused by mutations in dystrophin gene. Partial deletions of variable size are common (%65). Here we present the dystrophin gene mutation results of 16 cases and their families with the diagnosis of muscular dystrophy referred to our department (exons; pb, pm, 3, 4, 8, 12, 17, 19, 32, 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 and 52) and the results were correlated with the clinical findings. In one out of 16 cases who has no dystrophin gene mutation diagnosed as myotonic dystrophy. In 55% cases, diagnosed as DMD and BMD, dystrophin gene mutation had been observed. In all cases, the diagnosis were supported with clinical findings, muscle biopsy results, EMG results, biochemistry results (high CPK level). In non-mutated cases, 7 patient had been diagnosed as DMD whereas 3 women had been diagnosed as DMD carrier. The results may represent us the importance of the dystrophin gene mutations in the diagnosis and prenatal diagnosis of muscular dystrophy.

Key Words: Duchenne Muscular Dystrophy, Becker Muscular Dystrophy, Dystrophin Gene.

GİRİŞ

Musküler distrofi ilerleyici kas güçsüzlüğü ve zayıflığı ile karakterize herediter bir grup hastalıktır (1) Tanıda artmış serum enzimleri, tipik EMG ve kas biyopsi bulguları çok önemlidir (1). Bu grup içinde en önemli iki hastalık X e bağlı geçiş gösteren Duchenne Musküler Distrofi (DMD) ve Becker Musküler Distrofi (BMD) dir. Her iki hastalık etyolojisinde Xp21 de yer alan Distrofin genine ait anomaliler vardır. Kas biyopsisinde DMD' de distrofin yokluğu, BMD' de anormal varlığı karakteristiktir. Diğer musküler distrofilerde (Örneğin miyotonik distrofi) moleküler patolojiler farklı olup, distrofin normaldir. DMD ve BMD olgularında distrofin gen delesyonları %60-65 oranında gözlenen

(*) GATA Tıbbi Biyoloji AD ve Tıbbi Genetik BD.

(**) GATA Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.

Reprint Request: Dr. Şefik GÜRAN, GATA Tıbbi Biyoloji AD. 06018 Etlik-ANKARA

Kabul Tarihi: 19.2.2003

moleküler anomalilerdir. Daha az oranda genin duplikasyonu veya nokta mutasyonları tanımlanmaktadır (2).

Çalışmamızda DMD ve BMD ön tanısı ile refere edilen olgularda distrofin genine ait delesyonlar taranmış ve elde edilen bulgular klinik veriler ile karşılaştırılmıştır.

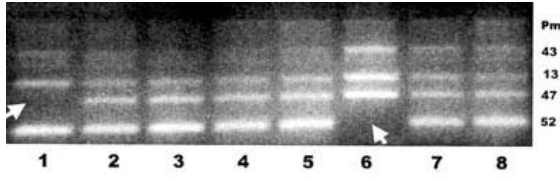
GEREÇ VE YÖNTEM

Bölümümüze 1998-2002 yılları arasında DMD ve BMD ön tanısı ile refere edilen 16 olgu ve ailelerinin ait periferik kan örnekleri alınarak distrofin genine ait moleküler analiz yapılmıştır. Olgularda DNA izolasyonunda Sambrook ve arkadaşlarının protokolü uygulanmıştır (3). Olgu DNA' larında Abbs ve arkadaşları tarafından tanımlanan primerler kullanılarak PCR cihazı ile (Biyolab-İ Cycler) gen amplifikasyonu yapılmıştır (4). Ampli-

fikasyonda Chamberlain ve arkadaşlarının uyguladığı "multiplex" PCR yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır (5). Protokole uygun olarak her hasta için 6 ayrı PCR reaksiyonu hazırlanmış ve distrofin genine ait pb, pm, ekson 3, 4, 8, 12, 17, 19, 32, 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ve 52 eksonlarında delesyon analizi yapılmıştır. Aynı koşullarda amplifiye olan E 48, 8, 44 için bir reaksiyon, E 17, 12, 4 için bir reaksiyon, E 45, 19, 51, 46 için bir reaksiyon pm, E 43, 47, 52 için bir reaksiyon, E3, 50 için bir reaksiyon, E 49, 32, 34 için bir reaksiyon, pb ve E 42 için bir reaksiyon hazırlanarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler hazırlanan agaroz jelde (%2' lik) 120 volt ile 1,5 saat yürütüldükten sonra ultraviyole altında incelenmiş ve distrofin gen delesyonları bulunmuştur (Şekil-1). Elde edilen sonuçlar klinik veriler ile karşılaştırılarak tablo-I oluşturulmuştur.

TABLO - I
DMD ve BMD Tanısı İle Takip Edilen Olgulara Ait Klinik, Laboratuar ve Moleküler Analiz Sonuçları

Olgu No	Cinsiyet/Yaş	Tanı	Şikayet	Soygeçmişi	Bulgu
1.	Erkek/4y	DMD	Yürüme, merdiven çıkmada güçlük	-	Del E 44
2.	İki Erkek Kardeş/3y-9y	BMD/BMD	Her iki kardeşte merdiven çıkmada güçlük	İki Kardeş	Her iki kardeşte del E 4
	Erkek/10y	DMD	Merdiven çıkmada güçlük, çabuk yorulma, düşme tanısı ve del E8	-	Del yok
3.	Fetus/Anne (Karyotip 46,XX)			Dayıda DMD	Del yok/ Del Yok
4.	Erkek/6y	BMD	Yürümede zorlukKas Biyopsisi: Yavaş seyirli musküler distrofi	-	Del E 48
5.	Kadın/8y	DMD	Merdiven çıkmada güçlük, yürümede gecikme	-	Del E 48, 49, 50, 51 ve 52
6.	Erkek/2y	DMD	Rutin analizde CPK - nedeni ile DMD şüphesi	-	Del E 48, 49, 50
7.	Erkek/5y	DMD	Başını dik tutamama (3. Aydan itibaren), yürüyememe	-	Del E 45, 46
	Anneanne/ Anne	DMD/DMD	8-10 yıl önce kol ve bacaklarda güçsüzlük, elektromyografi - yaygın miyotonic tutulum, ördek gibi yürüyüş LDH ve CPK -, artmış karaciğer fonksiyon testleri/ LDH-,CPK	-	Del E 45, 46/ Del E 45, 46
8.	Erkek/5y	DMD	Aksayarak yürüme, DKC, Yürüme bozukluğu, Gowers (+), DTR hipoaktif	-	Del yok
9.	Erkek/2	Musküler Distrofi	İnmemiş testis nedeni ile yapılan tetkiklerde yüksek ALP, AST, LDH, CPK.	-	Del yok
10.	Erkek/7	DMD	Yüreme ve konuşma güçlüğü Kaslarda pseudohipertrofi, Yüksek CPK, LDH, ALT, AST EMG: Miyopati ile uyumlu	-	Del E 51
11.	Erkek/2	BMD	Yürümede gecikmeKas Biyopsisi: Atrofik ve hipertrofik kas lifleri EMG: Miyopati ile uyumluYüksek ALT, AST, LDH, CPK	-	Del yok
12.	Kadın/5		Rutin analizde CPK yüksekliği	-	Del yok
13.	Erkek/6	DMD	Oturma kalkmada zorluk, kollarında güçsüzlük FM: Kaslarda atrofi, ördek benzeri yürüyüş, EMG: Myopati ile uyumluKas biyopsisi DMD	-	Del yok
14.	Erkek/7	DMD	Artmış CPK bulgusu	Dayıda DMD	Del yok
15.	Kadın/6	DMD	Yürüme zorluğu, çabuk yorulma, oturup kalkma güçlüğüKas Biyopsisi: DMD ile uyumlu MR Korpus Kallosum Agenezisi, Artmış Kreatin Fosfokinaz	-	Del yok



Şekil-1: DMD/BMD ön tanısı ile refere edilen olgularda distrofi gen analiz sonuçları (Sıra 1 distrofin geni E 47 delesyonu, sıra 7 distrofin geni E 52 delesyonu)

BULGULAR

Değerlendirmeye alınan 16 olgu ve aileleri ile ilgili yaş, cinsiyet, tanı, ilk klinik bulgular, laboratuvar bulguları, soygeçmişi ve distrofin genine ait moleküler analiz sonuçları tablo 1'de görülmektedir. Değerlendirilen olgudan birinde distrofin genine ait delesyon gösterilememiş, olgudaki diğer klinik ve laboratuvar bulgular ile olgu miyotonik distrofi tanısı olarak tedaviye başlanmıştır (Olgu No 10). Bir ailede aynı klinik bulguları gösteren iki erkek kardeşte (Aile No 2), bir ailede ise kas güçsüzlüğü nedeni ile probandinın anne ve anneannesinde moleküler analiz yapılmıştır (Olgu No 8). Olgu No 4 prenatal tanı programında analize alınan fetusla birlikte anne kanında da moleküler analiz yapılmıştır (Olgu No 4). Bu grup içinde yer alan olguların 8 inde bu gene ait delesyon saptanmış {Olgu No 1, 2 (iki kardeş), 5, 6, 7, 8 (proband, anne, anneanne), 11}. Değerlendirmeye alınan olguların %55 inde mutasyon gözlenmiş olup elde edilen sonuç literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir (1). Mutasyon saptanan 7 olgu DMD ve BMD tanısı almış, 3 kadın olgu ise DMD taşıyıcısı olarak tanımlanmış genetik danışma verilmiştir {Olgu No 6, olgu no 8 (anne, anneanne)}. 5 yaşında bir kız çocuğunda artmış serum protein kinaz nedeni ile yapılan analizde distrofi gen mutasyonu bulunmamıştır (olgu no 13). Tüm olgularda tanı klinik bulgular, kas biyopsisi, EMG sonuçları ve biyokimya sonuçları (artmış CPK düzeyleri) ile desteklenmiştir. Bir ailede annenin yeğeninde DMD tanısı ve distrofin genine ait ekson 2 delesyonu saptandığı için anne ve fetus DNA'sı eşzamanlı olarak çalışılmış, mutasyon olmadığı prenatal tanı olarak aileye bildirilmiştir. Distrofin genine ait mutasyon tanımlanmayan 7 olgudan (Olgu No 3, 9, 12, 14, 15, 16) biri (Olgu No 12) BMD tanısı almış olup, diğer olgular ise DMD tanısı ile takip edilmektedir.

TARTIŞMA

DMD ve BMD tanısında klinik bulgular (kaslarda pseudohipertrofi), laboratuvar bulguları (serum enzimlerinin özellikle serum kreatinin kinaz düzeyinin aşırı yüksekliği) EMG' de V1 de R ve S yüksekliği önemli kriterlerdir. Her iki hastalıkta da benzer bulgular olmasına rağmen klinikte BMD, DMD' nin daha hafif formu gibi seyreder (1).

DMD' de kas güçsüzlüğüne bağlı yürüyememe, dik oturamama, çabuk yorulma gibi tanımlanabilen ilk bulgular genellikle 5 yaş öncesinde ortaya çıkar. Olgular 15-20 yaş civarında tekerlekli sandalye kullanmaya başlar. Olgu genellikle 20'li yaşlarda solunum sistemine ait enfeksiyonlar ve kalp yetmezliği ile kaybedilir. BMD' de kas güçsüzlüğüne ait ilk bulgular daha ileri yaşlarda ortaya çıkar. Bulgular daha hafiftir. Her iki hastalık için kromozom Xp21 de kırklar bildirilmiştir. Günümüzde hastalık etyolojisinde Xp21 loküsünde bulunan distrofin genine ait mutasyonların rol aldığı bilinmektedir (1, 6, 7).

Serum kreatinin kinaz kas hücrelerinde bulunan bir enzimdir. DMD olgularında distrofin ve distrofine bağlanan proteinler hücre iskeletinde ve bazal laminada yer alırlar. DMD bulgularında distrofinin yokluğu, distroglikan ve sarkoglikanların azalması sözkonusudur. Buna bağlı bazal lamina ve hücre iskeletindeki bozukluklar kas hücresinin fonksiyonunun bozulmasına ve hücreden dışarı kas hücre enzimlerinin kaçışına neden olur (8).

Moleküler patolojide önemli olan distrofin genine ait mutasyonların gösterilmesi tanıda en önemli kriterlerden biridir. Distrofin genine ait delesyonlar literatürde %60-65 oranında tanımlanmaktadır. Serimizde bu oran %55 olarak bulunmuştur. Mutasyon tanımlanan olgularda klinik bulgular da DMD ve BMD ile örtüşmektedir. Musküler distrofi tanısı konan bir olguda distrofin genine ait bir mutasyon tanımlanmamıştır (7, 9).

Ancak distrofin genine ait tanımlanabilecek mutasyonların %35-40'ı genin duplikasyonu veya nokta mutasyonları olup, çalışmamızda bu mutasyonlar gösterilememiştir. Büyük bir olasılıkla DMD ve BMD tanısı konan ancak mutasyon tanımlayamadığımız olguların genleri bu tür mutasyonları içermektedir (2, 10, 11). Her iki hastalık da X' e bağlı olarak geçiş gösterse de özellikle musküler distrofi olgularında taşıyıcı olan kadınlarda hastalık tablosuna benzer kas güçsüzlüğü sık rastlanan bir bulgudur. Bizim serimizde de taşıyıcı olan anneanne ve annede benzer klinik bulgular bulunmuştur (Olgu No 8/ anne ve anneanne) (1).

Sonuç olarak DMD veya BMD düşünülen olgularda "multiplex" PCR yöntemi ile yapılan delesyon

analizleri bir çok musküler distrofi olgusunda yol göstericidir. Ancak halen mutasyon tanımlanamayan DMD veya BMD olguları için farklı mutasyonların bakılması ve gerekirse bu genlerin dizi analizine alınması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Emery, A.E.H.: *The Muscular dystrophies*, Eds.: Emery AEH, Rimson DL (in) *Principles and practice of medical genetics. Second Edition.* Churchill Livingstone, London 1990, p 539-578.
2. Korf, B.R., Darras, B.T., Urion, D.K.: *Dystrophinopathies*, *Geneb Reviews.* 1-19, 2002. <http://www.genecliniks.com/servlet>.
3. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning, A Laboratory Manual. Second Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, New York.
4. Abbs, S., Yau, S.C., Clark, S., Mathew, C.G., Robow, M.: *A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with c DNA hybridization shows mistyping by both methods.* *J. Med Genet*, 28: 304-311, 1991.
5. Chamberlain, S.J., Gibs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T.: *Deletion screening of the Duchenne Muscular Dystrophy locus via Multiplex DNA amplification.* *Nucleic Acid Res.* 16: 11141-56, 1988.
6. Willard, M.T.: *Genetics in Medicine, Fifth Edition*, 1996, W.B. Saunders Company, New York. Pp 56-57.
7. Warton, R.G.: *Genetics of Duchenne Muscular Dystrophia.* *Ann Rew of Genetics.* 22: 601-629, 1988.
8. Ozawa, E., Hagivara, Y., Yoshido, M.: *Creatine kinase, cel membrane and Duchenne Muscular Dystrophia.* *Mol. Cell Biochem.* 190: 143-151.
9. Thronton, C.: *The myotonic dystrophies.* 19: 25-33, 1999.
10. Onengut, S., Kavaslan, G.N., Battalođlu, E., Serdarođlu, P., Deymeer, F., Özdemir, C., Calefell, F., Tolun, A.: *Deletion pattern in the dystrophin gene in Turks and a comparison with European and Indians.* *Ann. Hu. Genet.* 64: 33-44, 2000.
11. Eraslan, S., Kasyerili, H., Apak, M.Y., Kırdar, B.: *Identification of point mutations in Turkish DMD/BMD families using multiplex-single stranded conformation analysis (SSCA).* *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 765-70.