

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Miloš Đ. Brkušanin

**Struktura segmentalne duplikacije 5q13.2 kao
modifikator fenotipa spinalne mišićne atrofije i
amiotrofične lateralne skleroze**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Miloš Đ. Brkušanin

**Structure of the 5q13.2 segmental duplication as
a modifier of the phenotype of spinal muscular
atrophy and amyotrophic lateral sclerosis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentor:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Vedrana Milić-Rašić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Zorica Stević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Marija Mojsin, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu-Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Goran Brajušković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Na ovom dugotrajnom i zahtevnom putovanju sticanja znanja, koje se pretvorilo u pravu Odiseju, nisam bio sam. Dve osobe su sve vreme davale vetar mojim jedrima, krotile oluje u meni i oko mene, razvedravale nebo, u noći bile svetionik: profesorka Dušanka Savić-Pavićević i profesor Goran Brajušković. Osobe bez kojih ova plovidba ne bi imala potpunog smisla niti bi isplovljavanje ka konačnom odredištu bilo uspešno i moguće. Iako su profesorki Dušanki kao mom mentoru pripale profesionalna obaveza i odgovornost da prati moj rad, nijednog trenutka nisam osetio da je moja mala i velika promišljanja i promišljanja, koja su neizostavan deo svakog naučnog putešestvija, doživela kao nešto na šta je samo svojom dužnošću upućena. Profesorka Dušanka i profesor Goran nisu bili tu radi obične profesorske podrške. Zato zahvalnica njima ni ne može biti obična, mada nikad neće biti u onoj meri potpuna koliko oseća moje biće. Prihvatili su me, prigrlili i učinili da laboratorija ne bude samo prostor za posao i karijeru, već da je osećam kao svoj dom. U tom domu su me negovali, pomogli mi da se osamostalim i prebrodim brojne eksperimentalne izazove, prevaziđem psihička iskušenja, sumnju u sebe, i uspešno položim testove istrajnosti i pronađem strpljenje. Uz njih dvoje svaki je dan bio učenje, oblikovanje, brušenje, nadograđivanje i sazrevanje. Zbog svega ovoga, ali i zbog mnogo više neizrečenog i neizrecivog, zbog vremena koje smo proveli zajedno, a koje prevazilazi vreme provedeno sa mojom porodicom, sa pravom mogu da ih nazovem svojim roditeljima. Ne biološkim, ali svakako molekularno-biološkim.

Profesorke Vedrana Milić Rašić i Zorica Stević su, kao kliničari, dragocenim uzorcima izlile temelj ovoj tezi i svoje vreme, trud, nesebičnu pomoć i podršku, naročito u poslednjim burnim trenucima, ugradile u svaki deo njene realizacije. Zbog svega toga predstavljaju neizostavan deo teze, iako njihovo prisustvo i učešće u mojoj naučnoj karijeri prevazilaze okvire jedne disertacije. U našoj maloj simbiozi korist grupe pretočena je u opšte dobro.

Ako bih vremeplovom mogao da se vratim do tačke u kojoj su eksperimentalni problemi postali preveliki zalogaj, voleo bih da me odvezu do stajališta na kom me čeka Marija Mojsin. U tom trenutku bio sam poput šegrta koji je otišao da izuči zanat kod velikog mađioničara. Međutim, ono što Mariju čini najvećim čarobnjakom svih vremena je što je prekršila prvo pravilo magije i odala mi sve eksperimentalne trikove. Svi naši zajednički

alhemičarski poduhvati bili su podržani mudrošću, posvećenošću i ljubaznošću akademika dr Milene Stevanović.

Jelena Karanović nadmašila je moj Merkur u Devici – od prvih dana potrudila se da moja prirodna potreba za temeljnošću, usredsređenošću na detalje, urednošću, pedantnošću, preciznošću i dobrom organizacijom postane moja najizraženija osobina u laboratoriji. Podjednako veliku zahvalnost osećam prema Feđi Puač koji me je upoznao sa tajnim životom laboratorijskih mašina i omogućio mi da od poniznog strahovopoštovanja pred njihovom složenošću i cenom dođem do slobodnog samouverenog rukovanja i zavirivanja u njihove skrivene kutke.

Mnogo je još onih koji su ostavili neizbrisiv trag u mom ličnom i laboratorijskom životu, a koje mogu da okrivim za to što sam, posle Jelene, najstariji u našoj maloj porodici u kojoj su godine tabu tema. U toj trci sakrivanja godina Zorana bi nadmašila i profesora i bila nesumnjivi pobednik. Pošto već strahujem da sam ostavio previše pisanog traga o njihovim istinitim podacima, moram da napomenem da je svaka sličnost sa stvarnim događajima i osobama slučajna. Koliki je put od direktora do šefčeta zna samo Jovan koji se jedini ne bi protivio da zvanični jezik laboratorije postane španski. Velika asistentkinja Nevena ušla je u moj svet kao moj student, da bi vrlo brzo postala prijatelj, po potrebi antidepresiv, a otkad je nevešto preuzela lečenje moje samodijagnostikovane upale krajnika, napustila je lekarsku praksu i postala prepoznatljiva kao ekspert za *real-time PCR* na prinudnom radu. Trenutno najmlađe među nama, grofica Lana i direktorka Suzana, za ovo kratko vreme uveselile su i obogatile moje dane, a naše interne fore i fazoni, kao i uzajamna ljubav i poštovanje, mogu samo da se uvećavaju. Tokom svih ovih godina bilo mi je zadovoljstvo da ih, kao mlade od sebe, gledam kako rastu u kvalitetne naučnike i ljude verujući da sam negde možda i ja imao udela u tome, a znajući da je svako od njih utkao sebe u moje lepe uspomene.

Iako ću ih zajedno i kratko spomenuti, iako su neki od njih fizički daleko, njihovo prisustvo bilo je i ostalo ništa manje važno. Iz sveg srca bih se zahvalio Katarini Jovanović, majka-žena-kraljici Nataši Ristić, Milošu Jovanoviću, Verici Radojičić, Jovani Živković, Saši Švikoviću, Nemanji Vučiću, Milici Gagić, Svetlani Đurici, Maši Ivin, Aleksandru Kojiću, Vladu Kovčiću, Srđanu Mašireviću, Dunji Petrović, Marku Dunjiću, Milici Jeličić i neponovljivoj i nezamenljivoj Marini Brusać na divnoj atmosferi, duhovitosti, šalama,

smehu, međusobnim prozivkama, ali po potrebi i ozbiljnim razgovorima i prijateljskoj bliskosti zahvaljujući kojima je dolazak na posao bio zadovoljstvo i uživanje.

Hvala Ani Kosać, Stojanu Periću i Vladimiru Jovanoviću na stručnoj pomoći, savetima, idejama, saradljivosti, dosadašnjim zajedničkim naporima i uspesima, i iznad svega prijateljstvu. Hvala Vladanki Topalović što je, uporedo sa svojom doktorskom tezom, našla vremena za moje eksperimentalne poduhvate.

Hvala svim ljudima iz svakog dela lavirinta Instituta za fiziologiju i biohemiju koji su, svako na svoj način, zaista obogatili, ispunili i uveselili moje dane.

Hvala Mirjani Novković i Jovani Blagojević koje su uz mene još od prvih studentskih dana, i koje su vremenom postale sastavni deo mog bića i moja potreba. Milica Milutinović. Sestra. Prijatelj. Moja svest i podsvest. Od svih nadimaka kojima me je oslovljavala, uvek ćemo prepričavati onaj prvi kojim mi se kao student iz klupe ispred obratila. Hvala Milošu Nikoliću, bratu i heroju, uzoru. Hvala Sari Selaković na безусловnoj ljubavi. Mini Maksimović na drugarstvu od najranijih dana detinjstva, neraskidivoj povezanosti i bliskosti i svim dosadašnjim i budućim zajedničkim poduhvatima i iskustvima. Milici Vučković, mom dnevniku, ispovedaonici, oltaru, svakom zajedničkom kolapsu i transu, vilenjenjima i ludilima.

Hvala svima onima čiji su se putevi ukrštali s mojim i koji su, pored ovde pomenutih, postali deo moje proširene porodice i zajedno sa mnom preživeli, proživeli i izneli sve moje izazove i uspehe. A pre svih i posle svega, mojoj najužoj porodici, mami, tati i bratu. Vama hvala do beskonačnosti i večnosti za doživotno ulaganje u mene i svako odricanje kako bih danas ja bio ovde gde jesam i ovakav kakav jesam.

Naposletku, hvala meni.

Naslov: Struktura segmentalne duplikacije 5q13.2 kao modifikator fenotipa spinalne mišićne atrofije i amiotrofične lateralne skleroze

Sažetak: Spinalna mišićna atrofija (SMA) i amiotrofična lateralna skleroza (ALS) su bolesti motoneurona. SMA je najčešći monogeniski uzročnik smrtnosti dece, dok je ALS adultna, neizlečiva bolest sa vrlo progresivnim tokom. SMA je uzrokovana homozigotnim odsustvom gena *SMN1* u telomernom delu segmentalne duplikacije 5q13.2, dok se u njenom centromernom delu nalazi gotovo istovetan gen *SMN2* koji daje ~10% funkcionalnog proteina SMN. Klinička prezentacija SMA je izuzetno varijabilna i kreće se od najtežeg oblika kod novorođenčadi (tip I) do blagog oblika sa adultnim početkom (tip IV). Homogenost uzročne mutacije i izražena fenotipska heterogenost ukazuju na postojanje genetičkih, epigenetičkih i sredinskih faktora koji modifikuju fenotip SMA. Visoka stopa nejednakih hromozomskih rearanžmana u segmentalnoj duplikaciji 5q13.2 dovodi do varijacija u broju kopija i strukturnih promena ne samo gena *SMN*, već i drugih prisutnih gena, poput *SERF1* i *NAIP*, i one mogu uticati na tok i težinu bolesti. Dosadašnji podaci ukazuju na to da bi jednim delom uzrok fenotipskih razlika kod SMA mogao biti različit stepen metilacije promotora *SMN2*. Sporadična ALS (SALS) čini oko 90% svih slučajeva ALS i njena etiologija nije razjašnjena. Iako se genetička osnova, vreme pojave simptoma i tok SMA i SALS razlikuju, usled sličnosti patoloških promena i učešća proteina SMN i proteina asociranih sa ALS u zajedničkim molekularnim putevima, među genima kandidatima za nastanak i progresiju SALS velika pažnja usmerena je upravo na gene *SMN*. Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje genomske strukture, prirode rearanžmana i epigenetičkih oznaka u segmentalnoj duplikaciji 5q13.2 kod SMA bolesnika. Takođe, cilj je bio ispitivanje asocijacije broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa fenotipom dečije SMA, rizikom za nastanak SALS i preživljavanjem SALS bolesnika.

U grupi od 99 SMA bolesnika i 122 roditelja bolesnika metodom umnožavanja većeg broja ligiranih proba (MLPA) analizirana su 442 hromozoma i identifikovano je 20 različitih alela telomernog dela duplikacije 5q13.2. Između broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* i tipa dečije SMA uočena je statistički značajna obrnuto srazmerna korelacija (Spirmanov test korelacije, *SMN2* $p=2,2e-16$, *SERF1* $p=4,264e-10$, *NAIP* $p=2,722e-8$). Generalizovanim linearnim modelom i selekcijom unazad, počevši od punog modela koji je obuhvatio broj kopija *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* i njihove dvostruke interakcije, dobijen je najbolji minimalni model koji objašnjava fenotipsku varijabilnost dečije SMA i obuhvata broj kopija *SMN2* ($p<2e-16$) i *SERF1* ($p<2e-16$) i njihov udruženi efekat ($p=0,026$). Ispitivanje stepena metilacije dela promotora gena *SMN2* kod bolesnika sa SMA tipovima I, II i III primenom

metode analize krivih topljenja visoke rezolucije (HRM) ukazalo je na njegovu heterogenu metilaciju, što je potvrđeno molekularnim kloniranjem i Sangerovim sekvenciranjem. U grupi od 153 SALS bolesnika iz populacije Srbije nije pokazana statistički značajna asocijacija između rizika za pojavu bolesti i broja kopija gena *SMN1* ($p=0,650$, Fišerov test tačnosti), *SMN2* ($p=0,369$), *SERF1* ($p=0,257$) i *NAIP* ($p=0,908$). Krive preživljavanja zasnovane na rezultatima multivarijabilne Koksove regresione analize pokazale su da tri kopije gena *SMN1* (HR=10.276, 95% IP 3.106-33.998), niži zbir revidirane skale funkcionalne procene (ALSFRS-R) u trenutku dijagnoze (HR=0.885, 95% IP 0.834-0.938), brži pad funkcionalnosti (Δ ALSFRS) (HR=2.193, 95% IP 1.618-2.972) i kraće dijagnostičko kašnjenje (HR=0.939, 95% IP 0.888-0.994) rezultuju kraćim preživljavanjem bolesnika sa SALS iz Srbije.

Rezultatima ove studije pokazana je izuzetno visoka inherentna nestabilnost regiona 5q13.2. Delecije u telomernom delu regiona 5q13.2 karakteristične su pretežno za bolesnike sa SMA tipom I, dok je genska konverzija gena *SMN1* u *SMN2* uglavnom osobina bolesnika sa SMA tipovima II i III. Broj kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* utiče na kliničku prezentaciju dečije SMA i najboji minimalni model koji objašnjava njenu fenotipsku varijabilnost uključuje broj kopija gena *SMN2* i *SERF1* i njihov udruženi efekat. Kod bolesnika sa SMA tipom I, II i III ispitivani deo promotora gena *SMN2* odlikuje se metilacijom izuzetno visoke heterogenosti za čije ispitivanje se metoda HRM pokazala kao neadekvatna. Veći broj kopija gena *SMN1* pokazao se kao negativan prognostički faktor preživljavanja SALS bolesnika, i ovaj objektivno merljiv i vremenski nepromenljiv parametar, zajedno sa kliničkim parametrima, može unaprediti algoritme za predviđanje toka bolesti i omogućiti efikasniji terapijske pristupe kod SALS.

Ključne reči: spinalna mišićna atrofija, amiotrofična lateralna skleroza, SMA, ALS, *SMN1*, *SMN2*, *H4F5*, *SERF1*, *NAIP*, preživljavanje

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj: 575.22:616.832(043.3)

Title: Structure of the 5q13.2 segmental duplication as a modifier of the phenotype of spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis

Abstract: Spinal muscular atrophy (SMA) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are motor neurone diseases. SMA is the most frequent monogenic cause of infant mortality, whereas ALS is an incurable late-onset disease with an inexorably progressive course. SMA is caused by homozygous absence of the *SMN1* gene located in the telomeric part of the 5q13.2 segmental duplication, while in its centromeric part resides a nearly identical copy named *SMN2* producing only ~10% of functional SMN protein. Clinical presentation of SMA is extremely variable ranging from a severe infantile form (type I) to mild adult-onset form (type IV). Homogeneity of the disease-causing mutation and extensive phenotypic variability clearly indicate the existence of additional genetic, epigenetic and environmental factors modulating SMA phenotype. High rate of unequal crossing over in 5q13.2 segmental duplication results in copy number variations (CNVs) and complex structural rearrangements of the two *SMN* genes and other genes residing in the same region, such as *SERF1* and *NAIP*, modulating disease progression and severity. Existing data suggest that, to some extent, phenotypic discrepancies in SMA might be due to differences in methylation level of the *SMN2* promoter. Sporadic ALS (SALS) comprises ~90% of all ALS cases and has an unknown aetiology. Even though aetiology, age at onset and progression may differ between the diseases, due to similarities between ALS and SMA pathologies and the involvement of SMN and some ALS-associated proteins in common molecular pathways, *SMN1* and *SMN2* genes were repeatedly studied as SALS susceptibility genes. The aim of this doctoral thesis was to reconstruct genomic structure, the nature of rearrangements and epigenetic marks of the 5q.13.2 segmental duplication in SMA patients from Serbia. Furthermore, the aim was to investigate if copy numbers of the *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* and *NAIP* genes are associated with SMA type, susceptibility to SALS and survival in SALS patients from Serbia.

In a group of 99 SMA patients and 122 patients' parents 442 chromosomes were analysed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and 20 different alleles of the 5q13.2 telomeric part were observed. Statistically significant inverse correlation was found between *SMN2*, *SERF1* and *NAIP* CNVs and SMA type (Spearman rank test, *SMN2* $p=2.2e-16$, *SERF1* $p=4.264e-10$, *NAIP* $p=2.722e-8$). Generalised linear model and backward selection, starting with a full model including the *SMN2*, *SERF1* and *NAIP* copy number and their two-way interactions, revealed that the best minimal model explaining phenotypic variation in childhood-onset SMA with the smallest set of variables included the *SMN2* ($p<2e-16$) and *SERF1* ($p<2e-16$) copy number and their joint effect ($p=0.02628$). Analysis of

the methylation level of a part of the *SMN2* gene promoter in patients with SMA type I, II and III by high resolution melting analysis (HRM) showed its heterogeneous methylation additionally confirmed by molecular cloning and Sanger sequencing of individual clones. No statistically significant association was found between CNVs of *SMN1* ($p=0.650$, Fisher's exact test), *SMN2* ($p=0.369$), *SERF1* ($p=0.257$) or *NAIP* ($p=0.908$) genes and SALS susceptibility in the examined group of 153 Serbian SALS patients. Survival curves based on the Cox model obtained by the multivariable Cox regression analysis showed that three *SMN1* copies (HR=10.276, 95% CI 3.106-33.998), lower revised ALS functional rating scale (ALSFRS-R) score at the time of diagnosis (HR=0.885, 95% CI 0.834-0.938), faster decline of functionality over time (Δ ALSFRS) (HR=2.193, 95% CI 1.618-2.972) and shorter diagnostic delay (HR=0.939, 95% CI 0.888-0.994) result in shorter survival of Serbian SALS patients.

Results of this study show extremely high inherent instability of the 5q13.2 region. Deletions in the 5q13.2 telomeric part were mostly found in SMA type I patients, whereas *SMN1*-to-*SMN2* gene conversion was mainly a characteristic of type II and III patients. Copy numbers of the *SMN2*, *SERF1* and *NAIP* genes influence SMA clinical presentation and the best minimal model explaining phenotypic variability of early-onset SMA included *SMN2* and *SERF1* copy numbers and their joint effect. In patients with SMA types I, II and III the analysed part of the *SMN2* gene promoter is characterised by highly heterogeneous methylation for whose analysis HRM proved to be inappropriate. Higher *SMN1* copy number was a negative prognostic factor for the survival of SALS patients and this objectively measurable time-invariant genetic factor, together with clinical variables, may help develop better algorithms for disease prognosis and more targeted clinical trials in SALS.

Key words: spinal muscular atrophy, amyotrophic lateral sclerosis, SMA, ALS, *SMN1*, *SMN2*, *H4F5*, *SERF1*, *NAIP*, survival

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular Biology

UDC number: 575.22:616.832(043.3)

Lista skraćenica

ALS – amiotrofična lateralna skleroza

ALSFRS-R – revidirana skala funkcionalne procene amiotrofične lateralne skleroze (eng. *Revised ALS Functional Rating Scale*)

bp – bazni par

CNV – varijacija u broju kopija (eng. *Copy Number Variation*)

EtBr – etidijum bromid

FL-SMN transkript – SMN transkript pune dužine (eng. *Full-Length SMN*)

FALS – familijarna amiotrofična lateralna skleroza

FVC – forsirani vitalni kapacitet pluća (eng. *Forced Vital Capacity*)

GTF2H2 – eng. *General Transcription Factor IIIH subunit 2*

HRM analiza – analiza krivih topljenja visoke rezolucije (eng. *High Resolution Melting analysis*)

kb – kilobaza

LRT – test količnika verodostojnosti (eng. *Likelihood Ratio Test*)

MLPA – umnožavanje većeg broja ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MMSE – mala skala za procenu mentalnog statusa (eng. *Mini-Mental State Examination*)

NAIP – eng. *NLR family Apoptosis Inhibitory Protein*

nt – nukleotid

OD – optička gustina (eng. *Optical Density*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

rpm – obrtaji u minuti (eng. *Rotation Per Minute*)

SALS – sporadična amiotrofična lateralna skleroza

SD – segmentalna duplikacija

SERF1 – eng. *Small EDRK-Rich Factor 1*

SMA – spinalna mišićna atrofija

SMN – eng. *Survival of Motor Neuron*

SMN2Δ7 – SMN transkript bez egzona 7

TSS – mesto početka transkripcije (eng. *Transcriptional Start Site*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. SEGMENTALNE DUPLIKACIJE – POJAM I FENOTIPSE POSLEDICE	1
1.2. SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA	2
1.2.1. <i>Pojam i klinički tipovi spinalne mišićne atrofije</i>	2
1.2.2. <i>Genetička osnova spinalne mišićne atrofije</i>	3
1.2.3. <i>Mutacije u genu SMN1</i>	5
1.2.4. <i>Ekspresija gena SMN i obrada primarnog transkripta</i>	6
1.2.5. <i>Protein SMN</i>	7
1.2.6. <i>Geni segmentalne duplikacije 5q13.2 kao modifikatori fenotipa SMA</i>	8
1.2.7. <i>Promotorski region gena SMN i epigenetička regulacija</i>	9
1.3. AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA.....	12
1.3.1. <i>Epidemiologija amiotrofične lateralne skleroze</i>	13
1.3.2. <i>Dijagnostikovanje amiotrofične lateralne skleroze</i>	13
1.3.3. <i>Genetička osnova amiotrofične lateralne skleroze</i>	14
1.3.4. <i>Klinički faktori za procenu težine kliničke slike i vremena preživljavanja kod SALS bolesnika</i>	15
2. CILJEVI RADA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. ISPITANICI	17
3.1.1. <i>Spinalna mišićna atrofija</i>	17
3.1.2. <i>Amiotrofična lateralna skleroza</i>	18
3.2. MOLEKULARNO-GENETIČKE METODE.....	21
3.2.1. <i>Izolacija genomske DNK iz periferne krvi i provera kvaliteta izolovane DNK</i>	21
3.2.2. <i>Određivanje koncentracije izolovane DNK</i>	23
3.2.3. <i>Određivanje broja kopija gena segmentalne duplikacije 5q13.2 primenom metode umnožavanja većeg broja ligiranih proba (MLPA)</i>	23
3.2.3.1. <i>Denaturacija DNK i hibridizacija proba sa matricom</i>	27
3.2.3.2. <i>Reakcija ligacije hibridizovanih proba</i>	27
3.2.3.3. <i>Umnožavanje ligiranih proba metodom PCR</i>	28
3.2.3.4. <i>Kapilarna elektroforeza</i>	28
3.3. ODREĐIVANJE STEPENA METILACIJE DELA PROMOTORA GENA <i>SMN2</i>	31
3.3.1. <i>In silico predikcija položaja CpG ostrvaca</i>	31
3.3.2. <i>Bisulfitna konverzija genomske DNK</i>	31
3.3.3. <i>Dizajniranje prajmera za umnožavanje bisulfitno konvertovane DNK</i>	34
3.3.4. <i>Analiza krivih topljenja visoke rezolucije</i>	36
3.3.5. <i>Određivanje obrasca metilacije promotorskog regiona gena SMN2 molekularnim kloniranjem i bisulfitnim sekvenciranjem</i>	38
3.3.5.1. <i>Reakcija ligacije inserta i vektora</i>	39
3.3.5.2. <i>Pripremanje prekonoćne bakterijske kulture</i>	40
3.3.5.3. <i>Pravljenje čvrste podloge za zasejavanje bakterija</i>	40

3.3.5.4.	Pravljenje dnevne kulture bakterija.....	40
3.3.5.5.	Pravljenje kompetentnih ćelija	41
3.3.5.6.	Izolovanje rekombinantnih molekula DNK metodom mini-prep	42
3.3.5.7.	Provera specifičnosti ukloniranog inserta restrikcijom	43
3.3.6.	Identifikacija epialela Sangerovim sekvenciranjem.....	43
3.4.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	44
4.	REZULTATI.....	47
4.1.	SPINALNA MIŠIĆNA ATROFIJA	47
4.1.1.	Status gena SMN1 kod ispitivanih SMA bolesnika i roditelja	47
4.1.2.	Hromozomski rearanžmani i genetička struktura telomernog dela 5q13.2	48
4.1.3.	Korelacija broja kopija gena SMN2, SERF1 i NAIP sa tipom SMA.....	52
4.1.4.	Obrasci kombinovanog odsustva gena SERF1A/SMN1/NAIP i broj kopija SMN2	56
4.1.5.	Bisulfitna konverzija DNK.....	59
4.1.6.	Provera uspešnosti PCR-a izvedenog iz bisulfitno konvertovane DNK.....	60
4.1.7.	Analiza stepena metilacije regiona CG2 gena SMN2 metodom HRM.....	61
4.1.8.	Analiza obrasca metilacije regiona CG2 gena SMN2 metodom sekvenciranja pojedinačnih klonova	65
4.2.	AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA.....	71
4.2.1.	Učestalost mutacija u genima SOD1 i C9orf72 kod bolesnika sa sporadičnom amiotrofičnom lateralnom sklerozom iz Srbije.....	71
4.2.2.	Asocijacija broja kopija gena SMN1, SMN2, SERF1 i NAIP sa rizikom za pojavu sporadične amiotrofične lateralne skleroze kod bolesnika iz Srbije	72
4.2.3.	Kaplan-Majerova kriva kumulativne verovatnoće preživljavanja	73
4.2.4.	Log-rank poređenje preživljavanja	74
4.2.5.	Univarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja.....	75
4.2.6.	Multivarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja	77
4.2.7.	Provera pretpostavke o srazmernosti rizika za umiranje.....	79
5.	DISKUSIJA	80
6.	ZAKLJUČCI.....	94
7.	LITERATURA	95
8.	PRILOZI.....	108
8.1.	PRILOG 1 – DOZVOLA ETIČKOG ODBORA KLINIKE ZA NEUROLOGIJU I PSIHIJATRIJU ZA DECU I OMLADINU	108
8.2.	PRILOG 2 – DOZVOLA ETIČKOG ODBORA KLINIČKOG CENTRA SRBIJE	110
8.3.	PRILOG 3 – STRUKTURE SEGMENTALNE DUPLIKACIJE 5Q13.2.....	111
8.3.1.	Strukture segmentalne duplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom I.....	112
8.3.2.	Strukture segmentalne duplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom II	123
8.3.3.	Strukture segmentalne duplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom III.....	138

1. Uvod

1.1. Segmentalne duplikacije – pojam i fenotipske posledice

Segmentalne duplikacije (SD) zauzimaju ~5% genoma čoveka i predstavljaju delove molekula DNK duže od 1 kilobaze (kb) i sa >90% istovetnosti sekvence (Bailey et al. 2002). Međusobno se mogu razlikovati po broju kopija sekvenci koje sadrže, nukleotidnom sastavu i/ili strukturi. Komparativne genomske analize pokazale su znatno veće prisustvo SD u genomu čoveka u odnosu na genome drugih životinja, što ukazuje na to da ove ponovljene sekvence verovatno značajno doprinose njegovoj raznovrsnosti. Na primer, pokazano je da je raznovrsnost genoma čoveka uzrokovana prisustvom SD ~100 puta veća nego ona uzrokovana tačkastim genetičkim varijantama (Lupski, 2007). Međutim, SD su vrlo dinamične usled prisustva gotovo istovetnih ponovljenih sekvenci i mogu negativno uticati na stabilnost genoma jer su podložne nejednakim hromozomskim rearanžmanima. Nealelska homologna rekombinacija uzrokuje nastanak varijacija u broju kopija (eng. *Copy Number Variation*, CNV), a potom genska konverzija povećava varijabilnost u nastalim kopijama. Segmentalne duplikacije specifične za humani genom uglavnom su bogate genima važnim za razvoj nervnog sistema i regulaciju apoptoze nervnih ćelija. Oko 25 ovakvih delova genoma povezano je sa različitim neurorazvojnim i neurodegenerativnim oboljenjima (Cooper et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Coe et al. 2014).

Segmentalne duplikacije čine ukupno 3,49% (6,26 megabaza) hromozoma 5 kod čoveka i specifične su po tome što se odlikuju stepenom istovetnosti većim od 97,5%. Jedna od najpolimorfnijih smeštena je u regionu 5q13.2 i ističe se po svojoj složenosti, dinamičnosti i fenotipskim posledicama (Dennis et al. 2017). U okviru nje, varijacije u broju kopija prisutnih gena čine osnovu i faktore rizika za dve bolesti motornog neurona – proksimalnu spinalnu mišićnu atrofiju i amiotrofičnu lateralnu sklerozu.

1.2. Spinalna mišićna atrofija

1.2.1. Pojam i klinički tipovi spinalne mišićne atrofije

Proksimalna spinalna mišićna atrofija (SMA) je najčešći monogeniski uzrok smrtnosti u dečijem uzrastu sa incidencijom 1: 6 000 živorođene dece (Pearn 1978) i učestalošću nosilaca uzročne mutacije u opštoj populaciji Evrope od 1:35 (Feldkotter et al. 2002; Cusin et al. 2003). Sa osobinama neurodegenerativne i neurorazvojne bolesti, SMA predstavlja drugo najčešće autozomno-recesivno oboljenje nakon cistične fibroze. Tokom bolesti dolazi do odumiranja α -motornih neurona u prednjim rogovima kičmene moždine, što najpre uzrokuje slabost mišića, a potom i njihovu atrofiju. Atrofija proksimalnih voljnih mišića izraženija je kod donjih nego kod gornjih udova, dok mišići očiju i lica nikada nisu zahvaćeni bolešću (Zerres et al. 1998; Simić 2008). Kako bolest napreduje, slabost i atrofija mišića zahvataju i distalne voljne mišiće, da bi na kraju bio zahvaćen ceo trup. Slabljenje međurebarnih mišića kod SMA bolesnika uglavnom je praćeno otežanim disanjem i okončava se gušenjem kao najčešćim uzrokom smrti.

Klinička slika SMA vrlo je varijabilna u pogledu vremena pojave simptoma, njihove težine, postignutih motornih veština i dužine života. Međunarodni SMA konzorcijum izdvojio je četiri tipa SMA, od čega tri dečija tipa i jedan tip karakterističan za odraslu životnu dob (Munsat & Davies 1992; Zerres & Rudnik-Schöneborn 1995).

SMA tip I (OMIM #253300, SMA1 ili Verdign-Hofmanova bolest) je najteži oblik bolesti i naziva se i akutna dečija SMA. Simptomi SMA1 se javljaju u prvih šest meseci života novorođenčeta. U retkim slučajevima mogu se ispoljiti i u trećem tromesečju trudnoće, što se nekada izdvaja kao zaseban tip, SMA0. Bebe sa SMA1 odlikuju se izraženom slabošću mišića i hipotonijom i nikada ne steknu sposobnost samostalnog sedenja. Kod više od 90% SMA1 bolesnika očekivana dužina života iznosi najviše dve godine. Oko 8% bolesnika doživi desetu godinu (Munsat & Davies 1992; Zerres & Rudnik-Schöneborn 1995).

SMA tip II (OMIM #253550, SMA2, intermedijarni tip bolesti) je nešto lakši oblik SMA koji takođe nosi nazive hronična dečija SMA ili Dubovicova bolest. Prvi simptomi ispoljavaju se između 6. i 18. meseca života u vidu usporenog motornog

razvoja, smanjene telesne težine i skolioze. Ovakvi bolesnici imaju sposobnost samostalnog sedenja, ali ne i samostalnog hodanja. Životni vek je značajno skraćen, ali uglavnom žive duže od dve godine, dok čak 77% doživi i dvadesetu godinu (Zerres & Rudnik-Schöneborn 1995).

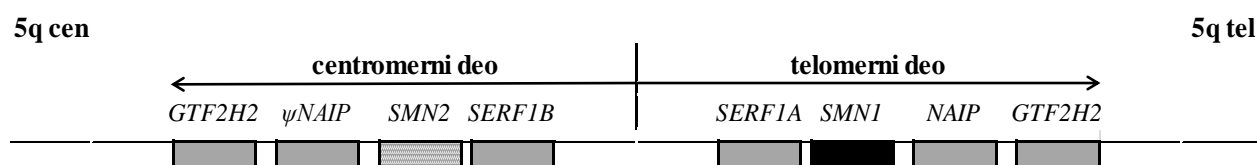
SMA tip III (OMIM #253400, SMA3, Kugelberg-Velanderov sindrom) je još blaži oblik bolesti, poznat pod nazivom blaga dečija i juvenilna SMA. Odlikuje se pojavom prvih simptoma između 18. meseca i 30. godine života. Ukoliko se simptomi jave najkasnije do treće godine života, bolest je označena kao tip IIIa, a ukoliko se ispolje nakon treće godine, kao SMA tip IIIb (Zerres & Rudnik-Schöneborn 1995). SMA3 bolesnici imaju sposobnost samostalnog sedenja i hodanja, da bi je u nekom trenutku u toku života izgubili. Verovatnoća hodanja sa 10, 20 i 40 godina za bolesnike sa tipom IIIa iznosi 73%, 44% i 34%, redom, dok za bolesnike sa tipom IIIb iznosi 97%, 89% i 67%, redom. Dužina života SMA3 bolesnika najčešće nije izmenjena prisustvom bolesti (Zerres & Rudnik-Schöneborn 1995).

SMA tip IV (OMIM #271150, SMA4) je neuporedivo ređi oblik SMA koji se javlja nakon tridesete godine života i označen je kao adultna SMA. Odlikuje se blagim tokom, malim motornim oštećenjima i normalnim životnim vekom.

1.2.2. Genetička osnova spinalne mišićne atrofije

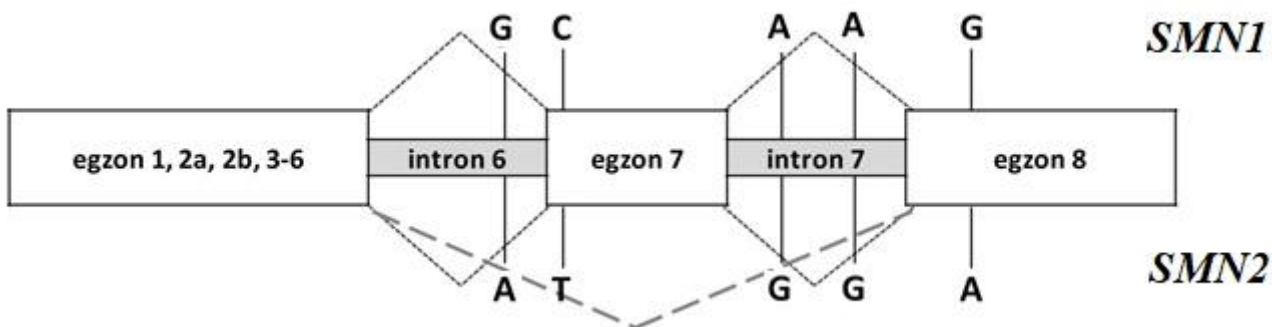
Osamdesetih godina dvadesetog veka postojale su dve pretpostavke o genetičkoj osnovi SMA: jedna prema kojoj je SMA1 uzrokovana mutacijama u jednom genu, a SMA2 i SMA3 u drugom genu, i druga pretpostavka prema kojoj su sva tri tipa bolesti uzrokovana mutacijama u istom genu. Analize vezanosti sprovedene u poslednjoj deceniji dvadesetog veka pokazale su da uzročni gen SMA2 i SMA3 mapira u regionu 5q11.2-q13.3 (Brzustowicz et al. 1990; Melki et al. 1990a). Samo pola godine kasnije pokazano je da uzročni gen SMA1 mapira u istom regionu (Gilliam et al. 1990; Melki, et al. 1990b). Konačno, 1995. godine identifikovan je gen *SMN* (eng. *Survival of Motor Neuron*, *SMN*) kao uzročnik sva tri tipa SMA. Uprkos tome, u literaturi je i dalje uvrežen pogrešan opis SMA ne samo kao klinički, već i kao genetički heterogene bolesti. Veličina gena *SMN* iznosi 30 113 baznih parova (bp), a otvoreni okvir čitanja dužine 882 bp sastoji se od 9 egzona (1, 2a, 2b-8) i kodira protein SMN (Lefebvre et al.

1995; Chen et al.1998). U blizini gena *SMN* mapiraju gen *SERF1* (eng. *Small EDRK-Rich Factor 1*; ranija oznaka gena: *H4F5*; HGNC ID: 10755, Entrez Gene: 8293; Ensembl: ENSG00000172058), *NAIP* (eng. *NLR family Apoptosis Inhibitory Protein*; ranija oznaka gena: *BIRC1*; HGNC ID: 7634; Entrez Gene: 4671; Ensembl: ENSG00000249437) i *GTF2H2* (eng. *General Transcription Factor IIH subunit 2*; ranija oznaka gena: *p44*; HGNC ID: 4656; Entrez Gene: 2966; Ensembl: ENSG00000145736). Navedeni geni, uključujući i *SMN*, smešteni su u segmentalnoj duplikaciji dužine ~500 kb na hromozomu 5, u regionu q13.2. Geni su prisutni u većem broju kopija, a u zavisnosti od dela duplikacije u kom se nalaze označeni su kao centromerne ili telomerne kopije gena (Slika 1.1).



Slika 1.1. Šematski prikaz segmentalne duplikacije 5q13.2 sa centromernim i telomernim kopijama gena *SERF1*, *SMN*, *NAIP* i *GTF2H2*.

U telomernom delu SD u 5q13.2 nalazi se gen *SMN1*, uzročni gen SMA, dok se u centromernom delu nalazi gen *SMN2* sa gotovo istovetnom sekvencom. Sekvence ovih dvaju paralognih gena pokazuju čak 99% istovetnosti, a razlike u sekvencama nalaze se u 3' delu gena: intronima 6 i 7, i egzonima 7 i 8 (Slika 1.2).



Slika 1.2. Šematski prikaz razlika u sekvenci i obrascu splajsovanja između gena *SMN1* (gore) i *SMN2* (dole). Pet nukleotidnih razlika smešteno je u 3' delu gena – u intronima 6 i 7 i egzonima 7 i 8.

1.2.3. Mutacije u genu *SMN1*

U osnovi molekularne patogeneze SMA nalazi se nedostatak proteina SMN neophodnog za preživljavanje motornih neurona, a uzrokovan je odsustvom funkcionalnih kopija gena *SMN1*. Kod 98% SMA bolesnika uzrok bolesti je homozigotno odsustvo egzona 7 gena *SMN1*, pri čemu je u 90% ovakvih slučajeva odsutan i egzon 8. Preostalih 2% SMA bolesnika su složeni heterozigoti sa odsustvom jedne kopije gena *SMN1* i malom mutacijom (tačkasta mutacija, mala insercija ili delecija) u preostaloj kopiji (Wirth et al. 1999). Homozigotno odsustvo gena *SMN2*, u prisustvu bar jedne kopije *SMN1*, ne dovodi do pojave bolesti, nema klinički definisane fenotipske posledice i prisutno je kod ~5% osoba iz opšte populacije. Istovremeno homozigotno odsustvo *SMN1* i *SMN2* kod čoveka nikada nije zabeleženo, najverovatnije zbog toga što je ovakav genotip letalan. To pokazuju i studije na *Smn*^{-/-} miševima ili miševima sa neaktivnim genom *Smn*, kod kojih se morfološke i

degenerativne promene uočavaju već na stupnju morule, što dovodi do smrti embriona pre njegovog usađivanja u zid materice (Schrank et al. 1997).

Pojam *homozigotno odsustvo* u slučaju gena *SMN1* može se odnositi na dva različita mutaciona događaja: jedan je delecija celog gena *SMN1* ili bar egzona 7, a drugi je genska konverzija gena *SMN1* u *SMN2*, pri čemu se ova dva mutaciona događaja mogu desiti u homozigotnom stanju ili u kombinaciji jedan sa drugim. Genska konverzija predstavlja glavni uzrok varijacija u broju kopija gena *SMN2*, ali i varijacija u sekvenci gena *SMN2* (van der Steege et al. 1996; Hahnen et al. 1997). Genska konverzija može da se dešava i u smeru nastanka gena *SMN1* od *SMN2*. Učestalost *de novo* mutacija u regionu 5q13.2 izuzetno je velika, oko 2%, što predstavlja i glavni uzrok velike učestalosti nosilaca uzročne mutacije u opštoj populaciji.

1.2.4. Ekspresija gena *SMN* i obrada primarnog transkripta

Jedinu funkcionalnu razliku gena *SMN2* u odnosu na gen *SMN1* predstavlja sinonimna nukleotidna zamena na poziciji 6 u egzonu 7 (c.840C>T). Iako translaciono tiha, ova sinonimna nukleotidna promena značajno utiče na obradu transkripata dvaju gena. Obradom transkripata gena *SMN1* nastaje zrela iRNK koja obuhvata sve egzone gena (egzone 1, 2a, 2b-8), označena kao ceo transkript (eng. *Full-Length SMN transcript, FL-SMN*). Obradom čak 90% transkripata gena *SMN2* nastaje iRNK koja ne poseduje egzon 7 (*SMN2Δ7*). Egzon 7 ima dužinu od 54 bp i odlikuje se slabim 3' mestom splajsovanja (Lim et al. 2001). Kako bi bio prepoznat od strane splajsozoma, neophodni su dodatni elementi. Uključenje egzona 7 u zrele iRNK regulisano je postojanjem *cis*-elemenata u egzonima i intronima – pojačivačima i utišivačima splajsovanja. Navedeni *cis*-elementi bivaju prepoznati od strane *trans*-faktora – proteina koji su regulatori splajsovanja. Važan pojačivač splajsovanja CAGACAA smešten je na 5' kraju egzona 7. Međutim, njegova sekvenca je izmenjena u egzonu 7 gena *SMN2* (TAGACAA) upravo usled nukleotidne zamene c.840C>T, čime se sprečava vezivanje odgovarajućih *trans*-faktora. Kao posledica toga, egzon 7 transkripta *SMN2* ostaje neprepoznat od strane splajsozoma, što dovodi do pretežnog nastanka transkripata *SMN2Δ7* (Lorson et al. 1999). Dodatno, pretpostavlja se da ova nukleotidna zamena dovodi i do formiranja utišivača splajsovanja, što dodatno doprinosi isključenju egzona 7 iz zrele *SMN2* iRNK (Kashima et al. 2003). Nijedna od dve navedene pretpostavke

nije odbačena i one nisu nužno međusobno isključive (Cartegni et al. 2006; Kashima et al. 2003; Kashima et al. 2007). Zbirni uticaj pomenutih, ali i drugih pojačivača i utišivača splajsovanja u egzonu 7 i okružujućim intronima dovodi do toga da gen *SMN2* daje svega ~10% funkcionalnog proteina SMN. *FL-SMN*, dobijen bilo obradom transkripata gena *SMN1* ili *SMN2*, sa stop kodonom na 3' kraju egzona 7, kodira isti protein SMN koji se sastoji od 294 aminokiseline. Transkripti *SMN2Δ7* kodiraju okrnjeni proteinski produkt od 282 aminokiseline koji je nestabilan i ima smanjenu sposobnost oligomerizacije, što je osnovni preduslov za obavljanje njegove uloge u ćeliji.

1.2.5. Protein SMN

Oba gena *SMN* su ubikvitarno eksprimirana, ali je njihova ekspresija u kičmenoj moždini izuzetno visoka (Coover et al. 1997; Lefebvre et al. 1997). Protein FL-SMN ima molekularnu težinu od 38 kDa. Nasuprot njemu, gen *SMN2* uglavnom dovodi do nastanka okrnjenog proteina SMN koji je manje stabilan (Lorson et al. 1998), ali zadržava određeni nivo funkcionalnosti. Ovo je pokazano na SMA miševima koji su posedovali transgene čijom obradom nastaju transkripti *SmnΔ7*, a koji preživljavaju duže nego miševi bez ovog transgena (Le et al. 2005). U ćeliji, protein SMN prisutan je kako u citoplazmi, tako i u jedru. Za razliku od difuznog prisustva u citoplazmi, SMN je u jedru lokalizovan u strukturama označenim kao Kahalova tela ili u njihovim blizanačkim telima (eng. *gemini bodies*, *gemini of Cajal bodies*) (Liu et al. 1996; Young et al. 2000).

Protein SMN predstavlja najznačajniji deo većeg proteinskog kompleksa, označenog kao kompleks SMN, u kome ovaj protein, nakon homooligomerizacije, regrutuje dodatne proteine iz grupe Gemin stupajući u neposrednu interakciju sa njima (Pellizzoni 2007). Protein SMN nastao od transkripta *SMNΔ7* ima izrazito manju sposobnost oligomerizacije, pa tako i smanjenu sposobnost za ostvarenje uloge u ćeliji (Lorson et al. 1998). To bi moglo da bude jedno od objašnjenja zašto gen *SMN2* nije dovoljan da nadomesti odsustvo gena *SMN1*. Osnovna uloga kompleksa SMN je biogeneza malih nukleusnih ribonukleoproteinskih čestica (eng. *small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNP) koje ulaze u sastav splajsozoma, usled čega je protein SMN uključen u metabolizam RNK, što objašnjava velike posledice njegove

narušene strukture i funkcije. Ipak, ova univerzalna uloga proteina SMN ne objašnjava selektivno odumiranje α -motoneurona, jer bi narušena funkcija splajsozoma imala posledice i po druge ćelije. Sve ovo ukazuje na to da protein SMN u motornim neuronima verovatno ima dodatnu ulogu koja je od suštinskog značaja za njihovo preživljavanje. Pokazano je da SMN učestvuje u transportu iRNK za β -aktin do aksona i konusa rasta motoneurona (Rossoll et al. 2002; Rossoll et al. 2003, Fallini et al. 2012). Takođe je pokazano da su transport proteina SMN i njegova lokalizacija u citoplazmi narušeni u odsustvu dela proteina kodiranog egzonom 7. Dodatno, transfekcija neurona pacova konstruktima humanog gena *SMN* bez egzona 7 imala je za posledicu nastanak skraćenih aksona (Zhang et al. 2003). Ovo može objasniti pojavu mišićne slabosti kod SMA bolesnika i atrofiju kao posledicu smanjene inervacije mišića.

1.2.6. Geni segmentalne duplikacije 5q13.2 kao modifikatori fenotipa SMA

Identična uzročna mutacija ne može da objasni izraženu kliničku heterogenost SMA. Glavni priznati genetički modifikator SMA je broj kopija gena *SMN2* koji se najčešće kreće od 1 do 4, a u izuzetnim slučajevima do 8 kopija (Feldkötter et al. 2002; Wirth et al. 2006). Osnovni mehanizmi nastanka povećanog broja kopija gena *SMN2* su genska konverzija i duplikacija. Budući da svaka kopija gena *SMN2* daje ~10% funkcionalnog proteina SMN, veći broj kopija *SMN2* dovodi do blažeg kliničkog ispoljavanja bolesti. Oko 80% SMA1 bolesnika ima 1-2 kopije *SMN2*, 82% SMA2 ima 3 kopije, a 96% SMA3 bolesnika poseduje 3-4 kopije *SMN2*, od čega oni sa tipom 3a pretežno imaju 3 kopije, a sa tipom 3b 4 kopije. SMA4 bolesnici poseduju 4-6 kopija gena *SMN2* (Feldkötter et al. 2002; Wirth et al. 2006). Pretpostavlja se da je 8 kopija gena *SMN2* dovoljno da osoba sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1* bude u potpunosti zaštićena od pojave SMA.

Dodatno, kopije gena *SMN2* ne moraju biti funkcionalno jednake (Burghes 1997). Himerne kopije gena *SMN2*, koje su zadržale 5' kraj gena *SMN1*, a kod kojih je ostatak gena konvertovan u *SMN2*, imaju veću sposobnost da ublaže kliničku sliku SMA u poređenju sa kopijama *SMN2* kod kojih je genska konverzija zahvatila i 5' kraj gena. Smatra se da dodatni uzrok funkcionalnih razlika između kopija gena *SMN2* predstavlja metilacija molekula DNK.

Broj kopija drugih gena smeštenih u 5q13.2 segmentalnoj duplikaciji može uticati na kliničku sliku bolesti, s obzirom na to da i oni podležu brojnim strukturnim

rearanžmanima. Gen *SERF1* predstavlja opšti regulator proteinske agregacije i toksičnosti i postoji u dve istovetne kopije: *SERF1A* (telomerna) i *SERF1B* (centromerna) (van Ham et al. 2010). Gen *NAIP* prisutan je kao kompletna telomerna kopija i veći broj nekompletnih kopija (pseudogena) i njegov proteinski produkt je negativni regulator apoptoze motoneurona (Liston et al. 1996). Delecije telomerne kopije *NAIP*, a naročito *SERF1*, prate delecije gena *SMN1* kod SMA bolesnika. Prethodne studije koje su ispitivale korelaciju između broja kopija gena *SERF1* i *NAIP* i težine kliničke slike SMA pružile su oprečne rezultate i često su imale metodološka ograničenja (Roy et al. 1995; Bulet et al. 1996; Velasco et al. 1996; Scharf et al. 1998; Arkblad et al. 2009; Amara et al. 2012; He et al. 2013).

1.2.7. Promotorski region gena *SMN* i epigenetička regulacija

Kao što je već pomenuto, geni *SMN1* i *SMN2* odlikuju se izuzetno visokim stepenom istovetnosti sekvence, što se takođe odnosi na njihove promotorske regione (Boda et al. 2004; Echaniz-Laguna et al. 1999; Monani et al. 1999). Upoređivanjem uzvodnih sekvenci ovih dvaju gena jedina uočena razlika bila je broj ponovljenih motiva CA u okviru polimorfnog mikrosatelitskog lokusa C272 (Ag1CA) smeštenog 469 bp uzvodno od start kodona ATG (ime transkripta u bazi Ensembl: SMN1-202; ID transkripta: ENST00000380707.8; Genome assembly: GRCh38.p10) (DiDonato et al. 1994; Wirth et al. 1995). Uprkos tome, pokazano je da različit broj ovih ponovaka ili čak njihovo potpuno odsustvo ne dovode do značajnih razlika u aktivnosti promotora gena *SMN* (Echaniz-Laguna et al. 1999). U uzvodnom delu gena *SMN* identifikovana su tri mesta početka transkripcije (eng. *Transcriptional Start Site*, TSS): prvo se nalazi na poziciji 296 bp uzvodno od start kodona (Monani et al. 1999), drugo 241 bp uzvodno od start kodona (Germain-Desprez et al. 2001), a treće na poziciji 162 bp uzvodno od start kodona (Echaniz-Laguna et al. 1999) (Slika 1.3). U literaturi je opisan veći broj pokušaja definisanja osnovnog promotora gena *SMN* (Echaniz-Laguna et al. 1999; Monani et al. 1999). Iako među dobijenim rezultatima postoje razlike, osnovni promotor se može suziti na region ukupne dužine 150 bp uzvodno i nizvodno od trećeg TSS na poziciji koja je 162 bp uzvodno od start kodona. Element TATA predstavlja deo osnovnog promotora gena *SMN* i smešten je 49 bp uzvodno u odnosu na treće TSS, što je veća udaljenost TATA elementa od TSS u odnosu na većinu eukariotskih gena.

2401 CCCCATGTTTGTCTTTTCTTGTGTTTGTCTTTATATAGATCAAGCAGGTTTTAAATTCCTAG 2460
 2461 TAGGAGCTTACATTTACTTTTCCAAGGGGAGGGGGAATAAATATCTACACACACACACA 2520
 2521 CACACACACACACACACACACACACTGGAGTTCGAGACGAGGCCTAAGCAACATGCCG 2580
 2581 AAACCCCGTCTCTACTAAATACAAAAAATAGCTGAGCGTGGTGGCGCACGCCTATAGTCC 2640
 2641 TAGCTACTGGGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCAAGAAGTCGAGGCTGCAGT 2700
 2701 GAGCCGAGATCGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGAGCGACAGGGCGAGGCTCTGTCTCAAAA 2760
 2761 CAAACAAACAAAAAAAAAAGGAAAGGAAA **TATAACA** CAGTGAAATGAAAGGATTGAGAGA 2820
 2821 AATGAAAAATATACACGCCACAATGTGGGAGGGCGATAACCACTCGTAGAAAGCGTGAG 2880
 2881 AAGTTACTACAAGCGGTCCCTCCCGGCCACCGTACTGTTCCGCTCCCAGAAGCCCCGGGCG 2940
 2941 GCGGAAGTCGTCACTCTTAAGAAGGGACGGGGCCCCACGCTGCGCACCCGCGGGTTTGCT 3000
 3001 ATGGCGATGAGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG 3060
 3061 TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGGTGAGGTGCGCAGCCAGTGCAGTCTCCCTATTAGCGCTCT 3120

Slika 1.3. Šematski prikaz dela promotorskog regiona gena *SMN1* i *SMN2*. Crnim strelicama su označena tri mesta početka transkripcije (TSS). Sekvenca prvog egzona je podvučena i u njoj je podebljanim slovima predstavljen start kodon ATG. Element TATA je osenčen i prikazan podebljanim slovima.

Nivo ekspresije gena ne zavisi samo od sekvence DNK i transkripcionih regulatora, već je regulisan i epigenetičkim mehanizmima. Važan epigenetički mehanizam kod eukariota je metilacija DNK kovalentnim vezivanjem metil-grupe (-CH₃) za 5' ugljenikov atom citozina, čime nastaje 5-metil-dezoksicitidin. Kod sisara se ova modifikacija najčešće dešava u okviru CpG dinukleotida koji nisu ravnomerno, ali ni potpuno nasumično raspoređeni u genomu. Prevažodno se nalaze u regionima koji se nazivaju CpG ostrvca (eng. *CpG islands*). Prema definiciji, CpG ostrvca su sekvence DNK dužine ≥ 200 bp u kojima je zastupljenost nukleotida G i C veća od 50%, a odnos uočenog i očekivanog broja CpG $> 0,6$. Analiza genoma čoveka pokazala je da preko polovina gena za proteine sadrži CpG ostrvca, i to na svojim 5' krajevima, tj. u promotorskim regionima (Saxonov et al. 2006) ili u prvih nekoliko egzona gena. Činjenica da oko 50% CpG ostrvaca obuhvata i TSS (Suzuki et al. 2008) ističe njihovu važnost u procesu transkripcije gena (Bird 1986; Craig and Bickmore, 1994). Procena je da u genomu čoveka postoji preko 20 000 CpG ostrvaca, čija se dužina kreće od 0,5 do 4 kb. U somatskim ćelijama čoveka, 70-80% citozina u CpG ostrvcima je metilovano, što je oko 1% ukupnog broja citozina u genomu.

Prema istraživanju iz 2009. godine na SMA bolesnicima (Hauke et al. 2009), gen *SMN2* podleže genskom utišavanju posredovanom metilacijom promotorskog regiona, pri čemu se stepen metilacije povećava srazmerno težini kliničke slike. *In silico* predviđanje broja i položaja CpG ostrvaca uključenih u epigenetičku regulaciju ekspresije *SMN2* metilacijom DNK izvršeno je u pomenutom istraživanju analizom sekvence gena *SMN2* uzvodno i nizvodno od start kodona ATG ukupne dužine ~3000 bp. Na ovaj način Hauke i saradnici su identifikovali 4 CpG ostrvceta u okviru ~2 kb označena redom sa CG1 (dužine 252 bp, GC sadržaj 54,8%), CG2 (dužine 223 bp, GC sadržaj 58,3%), CG3 (dužine 446 bp, GC sadržaj 62,1%) i CG4 (dužine 303 bp, GC sadržaj 59,4%). Ova četiri CpG ostrvceta sadrže ukupno 85 dinukleotida CpG, od čega se 14 nalazi u CG1 (smešteno od -896 do -645), 12 u CG2 (od -469 do -247), 38 u CG3 (od -151 do +295) i 21 u CG4 (od +844 do +1146). Sve navedene pozicije posmatrane su u odnosu na start kodon ATG (gde je A iz start kodona označen kao nukleotid +1), a ne u odnosu na jedno od tri TSS. CG2 obuhvata najuzvodnije od tri TSS gena *SMN2* (na poziciji 296 bp uzvodno od start kodona), dok se

drugo TSS (na poziciji 241 bp uzvodno od start kodona) nalazi odmah nizvodno od CG2, a treće TSS neposredno uzvodno od CG3.

Hauke i saradnici su pokazali da su ostrvca CG1 i CG4 hipermetilovana, da je ostrvce CG3 hipometilovano, a da se ostrvce CG2 odlikuje srednjim stepenom metilacije. Utvrđivanjem stepena metilacije promotorskog regiona *SMN2* metodom pirosekvenciranja i poređenjem između bolesnika sa SMA tipom I i SMA tipom III koji su nosili po dve kopije *SMN2* pokazano je da postoje značajne razlike u stepenu metilacije među pacijentima različitih tipova SMA, i to na 7 dinukleotida CpG: CG1 (-871, -695), CG2 (-296, -290) i CG4 (+855, +988, +1103). Međutim, najizraženija razlika uočena je na poziciji -296 (CG2; tip I SMA: $94.1 \pm 6.3\%$; tip III SMA: $66.7 \pm 8.0\%$, $P=0.000084$, t-test) koja se poklapa sa pozicijom prvog TSS gena *SMN2*.

1.3. Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativno oboljenje i najčešća bolest motornog neurona odraslih koja se odlikuje neizbežno i nezaustavljivo progresivnim tokom i relativno brzim smrtnim ishodom. Pojam amiotrofija u nazivu bolesti ukazuje na propadanje mišićnih vlakana usled njihove denervacije izazvane odumiranjem motoneurona, što dovodi do slabosti pogođenih mišića i vidljivih fascikulacija. Lateralna skleroza je patohistološki termin koji se odnosi na zadebljanje prednjih i bočnih kortikospinalnih puteva budući da motoneuroni u ovim zonama odumiru i bivaju zamenjeni glijom. Klasična ALS klinički je prepoznatljiva po istovremenom oštećenju gornjeg (centralnog) motornog neurona u kori velikog mozga i donjeg (perifernog) motornog neurona u jedrima moždanog stabla i prednjim rogovima kičmene moždine. Međutim, ovaj klinički entitet odlikuje se velikom fenotipskom heterogenošću i kontinuum bolesti može da varira od zahvaćenosti samo gornjeg do obolevanja isključivo donjeg motornog neurona.

1.3.1. Epidemiologija amiotrofične lateralne skleroze

Najveća do sada zabeležena incidencija ALS u Srbiji registrovana je 2000. godine i iznosila je 1,88 na 100 000 stanovnika, dok je najniža zabeležena 1998. godine i iznosila je 0,61 na 100 000. Prema poslednjim epidemiološkim podacima, incidencija ALS na teritoriji Beograda iznosi 1,11 na 100 000 stanovnika (Stević et al. 2016). Ukupna incidencija u svetu iznosi 1,68 na 100 000 stanovnika, (Marin et al. 2016), a prevalencija 5,4 na 100 000 stanovnika (Chiò et al. 2013), usled čega se ALS svrstava u grupu retkih bolesti. Učestalost bolesti daleko je niža u pojedinim etničkim grupama, uključujući američke Indijance (Gordon et al. 2013), ali opisana su i područja u svetu sa izrazito višom incidencijom bolesti, poput ostrva Guam, ostrva Kii u Japanu, zapadnog dela Nove Gvineje (Kurland et al. 1961), itd. Incidencija bolesti raste sa starošću, dostižući najveću vrednost između 50. i 75. godine života, nakon čega opada (Preux et al. 1996; Traynor et al. 2000; Hardiman et al. 2011). Ovaj podatak ukazuje na to da ALS nije bolest starenja, već da starost predstavlja samo jedan od brojnih faktora rizika (Hardiman et al. 2011). Bolest je 1,3–1,6 puta češća kod muškaraca nego kod žena (Hirtz et al. 2007; Mehta et al. 2014). Epidemiološki podaci iz Srbije iz 2016. godine pokazuju da je prosečna starost na početku bolesti bila ~58 godina, i da je odnos muškaraca i žena bio 1,5:1 (Stević et al. 2016). ALS ranog početka, sa početkom pre 30. godine života, češća je kod muškaraca i odlikuje se uglavnom spinalnim početkom, dok je pojava bolesti nakon 70. godine života češća kod žena i odlikuje se pretežno bulbarnim početkom. Prema studiji iz 2016., kod bolesnika sa teritorije Beograda spinalni početak bio je češći kod muškaraca, sa odnosom 65,9%:34,1%, dok je bulbarni početak bio češći kod žena (63,1%:36,9%) (Stević et al. 2016).

1.3.2. Dijagnostikovanje amiotrofične lateralne skleroze

Velika klinička varijabilnost na samom početku bolesti i odsustvo jasnog biološkog dijagnostičkog markera otežavaju postavljanje rane dijagnoze ALS. El Escorial kriterijumi za dijagnostiku ALS revidirani 1998. godine (Brooks et al. 2000) povećali su senzitivnost u dijagnostici ALS i doprineli boljoj i preciznijoj dijagnozi. Prema ovim kriterijumima, postavljanje dijagnoze ALS zahteva prisustvo znakova progresivnog propadanja gornjeg i

donjeg motoneurona, kao i odsustvo elektrofizioloških i patoloških procesa karakterističnih za druga oboljenja koja se odlikuju sličnim simptomima. Uprkos postojanju pomenutih kriterijuma, dijagnoza ALS uglavnom se svodi na različite nivoe sigurnosti sa kojima se tvrdi da osoba ima klinički sigurnu, klinički verovatnu ili klinički moguću ALS.

1.3.3. Genetička osnova amiotrofične lateralne skleroze

Do 10% slučajeva ALS je nasledno (FALS) i uzrokovano mutacijama u rastućem broju gena (Robberecht & Eykens 2015). Preostalih ~90% slučajeva ALS su sporadični, bez porodične istorije bolesti. Sporadični ALS (SALS) smatra se složenim, multifaktorijalnim oboljenjem i suštinski predstavlja kliničku dijagnozu podržanu neurofiziološkim testiranjem. Istraživanja su ukazala na značajnu ulogu genetičkih faktora rizika za patologiju SALS, od kojih nijedan faktor nije sam po sebi dovoljan da uzrokuje bolest, dok sredinski i stohastički faktori i njihove interakcije povećaju predispoziciju za nastanak bolesti kod genetički podložnih osoba. Dodatno, oko 10% osoba poseduje mutacije u genima asociranim sa FALS (Turner et al. 2013; Chiò et al. 2014). Iz studija asocijacije gena-kandidata ili studija asocijacije na čitavom genomu proizašao je veći broj tačkastih varijanti u genima asociranim sa nastankom ALS (Dunckley et al. 2007; Van Rheenen et al. 2016), ali sa nejasnim doprinosom patogenezi bolesti. Međutim, pored tačkastih varijanti, značajan izvor genetičke varijabilnosti predstavljaju varijacije u broju kopija koje imaju fenotipske efekte i važan su faktor rizika za nastanak brojnih bolesti čoveka, uključujući i ALS (Blauw et al. 2010).

Usled sličnosti patoloških promena u ALS sa patologijom SMA i učešća proteina SMN i proteina asociranih sa ALS u zajedničkim molekularnim putevima, među genima kandidatima za nastanak i progresiju SALS velika pažnja usmerena je upravo na gene *SMN1* i *SMN2*. Nezavisno sprovedene studije slučajeva i kontrola, pre svega u populacijama Holandije, Francuske i Švedske, pružile su različite, nekada i oprečne rezultate o uticaju broja kopija gena *SMN1* i *SMN2* kao faktora koji utiču na rizik za pojavu SALS i vreme preživljavanja bolesnika (Corcia et al. 2002; Veldink et al. 2005; Corcia et al. 2006; Corcia et al. 2012).

Studije sprovedene na većem uzorku i u većem broju različitih populacija mogu nadomestiti nedostatke manjih studija i pružiti verodostojnije rezultate. Statistički i analitički metod koji kombinuje i objedinjuje različite, međusobno nezavisne studije, i integriše njihove rezultate u zajednički, jedinstveni rezultat, predstavlja meta-analizu. Studija na holandskoj populaciji iz 2012. godine upotpunjena meta-analizom (Blauw et al. 2012) i meta-analiza sprovedena 2014. godine (Wang et al. 2014) pružile su jednake i ubedljive statističke dokaze da duplikacija gena *SMN1*, tj. tri kopije ovog gena, predstavlja značajan faktor rizika za pojavu SALS. Mehanizam kojim povećan broj kopija *SMN1* dovodi do nastanka bolesti nije razjašnjen. Međutim, jedna od pretpostavki je da duplikacija gena *SMN1* predstavlja faktor rizika nezavisan od količine proteina SMN i da njome verovatno bivaju zahvaćene i okolne sekvence, poput sekvenci gena *SERF1* i *NAIP* (Corcia et al. 2006), što može predstavljati nezavisan ili dodatni faktor rizika za pojavu bolesti. Asocijacija broja kopija ovih gena sa nastankom SALS do sada nije istražena.

1.3.4. Klinički faktori za procenu težine kliničke slike i vremena preživljavanja kod SALS bolesnika

Od klinički prepoznatljivih i merljivih parametara, najveću snagu pri proceni vremena preživljavanja bolesnika sa SALS imaju respiratorni status i funkcionalna sposobnost bolesnika, a naročito promena njihovih vrednosti tokom vremena. Respiratorni status opisuje se procenjenim forsiranim vitalnim kapacitetom pluća (eng. *Forced Vital Capacity*, FVC) i predstavlja meru oštećenja respiratornih mišića. Funkcionalna sposobnost bolesnika opisuje se zbirom revidirane skale funkcionalne procene (eng. *Revised ALS Functional Rating Scale*, ALSFRS-R) i predstavlja meru ograničenja aktivnosti svakodnevnog življenja i samostalnog funkcionisanja bolesnika (Gordon et al. 2009; Paganoni et al. 2014). Međutim, predviđanje toka bolesti zasnovano samo na korišćenju ovih dvaju kliničkih parametara pokazalo se nepouzdanim u kliničkoj praksi budući da odumiranje motornih neurona može otpočeti i mnogo pre nego što oštećenje i ograničenje aktivnosti bolesnika postanu klinički vidljivi i merljivi. Stoga je neophodno da se postojeći algoritmi za prognozu toka bolesti i vremena preživljavanja bolesnika, zasnovani isključivo na kliničkim parametrima, dopune genetičkim faktorima rizika koji se objektivno mere i ne menjaju tokom vremena.

2. Ciljevi rada

Predmet izučavanja ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja strukture i epigenetičkih oznaka segmentalne duplikacije 5q13.2 kao modifikatora fenotipa spinalne mišićne atrofije i amiotrofične lateralne skleroze. U skladu sa tim specifični ciljevi rada bili su:

1. Opisati hromozomske rearanžmane i rekonstruisati strukturu telomernog dela segmentalne duplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom tipa I, II i III i roditelja bolesnika iz populacije Srbije.
2. Ispitati korelaciju broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa tipom spinalne mišićne atrofije.
3. Ispitati udruženi efekat broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* na fenotipsku varijabilnost spinalne mišićne atrofije.
4. Ispitati stepen i obrazac metilacije promotorskog regiona gena *SMN2* oko prvog mesta početka transkripcije kod bolesnika sa spinalnom mišićnom atrofijom iz Srbije i moguća ograničenja u metodološkim pristupima.
5. Ispitati asocijaciju broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa rizikom za pojavu sporadičnog oblika amiotrofične lateralne skleroze kod bolesnika iz Srbije.
6. Ispitati udruženi efekat ispitivanih genetičkih, demografskih i kliničkih faktora na vreme preživljavanja bolesnika sa sporadičnim oblikom amiotrofične lateralne skleroze iz Srbije.

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

3.1.1. Spinalna mišićna atrofija

Deo istraživanja vezan za SMA obuhvatio je 99 nesrodnih bolesnika iz Srbije (51 osobu ženskog pola i 48 muškog) koji su ispunjavali kliničke kriterijume za dijagnozu SMA (Munsat 1991) i kod kojih je molekulano-genetičkim analizama potvrđeno homozigotno odsustvo egzona 7 gena *SMN1*. Uzorci bolesnika sakupljeni su u periodu od 2001. do 2013. godine u saradnji sa Klinikom za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu i Univerzitetском dečjom klinikom u Beogradu. Budući da je vreme pojave prvih simptoma jedan od kriterijuma za svrstavanje bolesnika u određeni tip bolesti, a da je njegova procena subjektivna, osnovni kriterijum za svrstavanje bolesnika u odgovarajući tip bolesti bila je njihova sposobnost/nemogućnost da samostalno sede/hodaju. Na ovaj način 23 bolesnika su svrstana u tip I (nisu imali sposobnost samostalnog sedenja), 37 u tip II (imali sposobnost samostanog sedenja, ali ne i hodanja) i 39 u tip III (imali sposobnost samostalnog hodanja koju su kasnije izgubili). Molekularno-genetičke analize urađene su u Centru za humanu molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, kao sastavni deo dijagnostičkog protokola. Korišćene su metode analize polimorfizma konformacije jednolančane DNK (eng. *Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis*, SSCP) (Lefebvre et al. 1995) ili bidirekciono sekvenciranje egzona 7 gena *SMN1*.

Studija je obuhvatila i 122 roditelja SMA bolesnika koji su dali saglasnost za učešće u istraživanju.

Deo studije koji se odnosi na SMA odobren je od strane Etičkog odbora Klinike za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu (broj dozvole 1-9/2 od 28.03.2016.) (Prilog 1).

U svrhu izrade ove doktorske teze sačinjen je registar SMA bolesnika koji je sadržao osnovne sociodemografske podatke (pol, datum rođenja), od kliničkih podataka

informaciju o sposobnosti samostalnog sedenja/hodanja i tipu SMA u koji je bolesnik svrstan, kao i sve genetičke podatke dobijene u okviru rezultata ove teze.

3.1.2. Amiotrofična lateralna skleroza

Revidirane El Escorial kriterijume predviđene od strane Svetske federacije neurologa za postavljanje dijagnoze ALS (Brooks et al. 2000) ispunila su ukupno 154 bolesnika (91 muškarac, 63 žene) hospitalizovana na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2015. godine do kraja juna 2017. godine. Jedan bolesnik je isključen iz studije usled tumora kičmene moždine, što je uticalo na njegovu funkcionalnost i tok bolesti. Preostala 153 bolesnika (90 muškaraca, 63 žene) testirani su na prisustvo dveju najčešćih uzročnih mutacija ALS u populaciji Srbije (Marjanović et al. 2017) – mutaciju p.Leu145Phe (c.435G>C prema transkriptu u bazi Ensembl označenom sa SOD1-201; ID transkripta ENST00000270142.10) u genu *SOD1* i ekspanziju ponovljenog motiva GGGGCC u genu *C9orf72* (mutacija = [GGGGCC] > 30).

U svrhu izrade ove doktorske teze sačinjen je lokalni registar ALS bolesnika koji objedinjuje brojne kliničke i genetičke podatke. Iz usmenih izjava SALS bolesnika, njihovih zdravstvenih kartona i kliničkih pregleda, pored osnovnih sociodemografskih podataka (pol, datum rođenja), prikupljeni su i sledeći podaci: starost na početku bolesti, simptomi na početku bolesti (spinalni, bulbarni, respiratorni), mesto početka bolesti za bolesnike sa spinalnim početkom (ruke/noge/ruke i noge), tip motoneurona zahvaćenog bolešću (gornji/donji/gornji i donji), dijagnostičko kašnjenje u mesecima (definisano kao broj meseci proteklih između početka bolesti i postavljanja dijagnoze), značajni komorbiditeti, El Escorial kategorija u trenutku dijagnoze (sigurna ALS/verovatna ALS/moguća ALS), zbir skale ALSFRS-R i procenjen FVC u procentima u dvema vremenskim tačkama (trenutku dijagnoze t_1 i trenutku uzimanja uzorka krvi t_2), zbir male skale za procenu mentalnog statusa (eng. *Mini-Mental State Examination*, MMSE) u trenutku uzimanja uzorka krvi, terapija lekom Rilutek® (sa aktivnom supstancom riluzol) i starost u slučaju eventualnog smrtnog ishoda bolesnika. Detalji u vezi sa demografskim i kliničkim osobinama bolesnika prikazani su u Tabeli 3.1. Longitudinalni podaci za zbir

ALSFRS-R i FVC bili su dostupni za 91 i 71 pacijenata, redom. Promena zbira ALSFRS-R i vrednosti FVC tokom vremena izračunata je na sledeći način: $\Delta\text{ALSFRS} = (\text{ALSFRS-R}_{t_2} - \text{ALSFRS-R}_{t_1}) / t_2 - t_1$ i $\Delta\text{FVC} = (\text{FVC}_{t_2} - \text{FVC}_{t_1}) / t_2 - t_1$.

Uzorci 153 nesrodne osobe (90 muškaraca, 63 žene) iz opšte populacije Srbije uzeti iz zbirke uzoraka Centra za humanu molekularnu genetiku, Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, korišćeni su kao kontrolni uzorci.

Za ispitivanje sprovedeno na SALS saglasnost je dao Etički odbor Kliničkog centra Srbije (broj dozvole 339/4 od 15.06.2017.) (Prilog 2).

Tabela 3.1. Demografske i kliničke osobine 153 ispitivana SALS bolesnika iz populacije Srbije. Vrednosti Δ ALSFRS i Δ FVC bile su dostupne za 91 i 71 bolesnika, po redu navođenja.

Demografske i kliničke promjenljive	
<i>Pol, n (%)</i>	
ženski	63 (41.2)
muški	90 (58.8)
<i>Vreme početka bolesti, prosek\pmSD, godine</i>	58.9 \pm 10.3
<i>Dijagnostičko kašnjenje, prosek\pmSD, meseci</i>	14.1 \pm 11.4
<i>Simptomi na početku bolesti, n</i>	
bulbarni	25
spinalni	126
NA	2
<i>Mesto početka bolesti za bolesnike sa spinalnim početkom, n</i>	
ruke	54
noge	62
ruke i noge	10
<i>Tip opštećenja motoneurona u vreme dijagnoze, n</i>	
gornji	17
donji	31
gornji i donji	100
NA	5
<i>Zbir ALSFRS-R_{t1}, medijana (opseg)</i>	39 (6-48)
<i>ΔALSFRS*, medijana (opseg)</i>	0.94 (0-5.54)
<i>FVC_{t1}, medijana (opseg)</i>	100 (29-157)
<i>ΔFVC*, medijana (opseg)</i>	1.94 (0-30)
<i>Zbir MMSE, medijana (opseg)</i>	28 (16-30)
<i>Rilutek®, n</i>	35
<i>Br. umrlih do juna 2017., n</i>	54

n – broj bolesnika; NA – nepoznat podatak; ALSFRS-R_{t1} – zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze t₁; FVC_{t1} – vrednost FVC u trenutku dijagnoze t₁; Δ – promena odgovarajućeg parametra kroz vreme.

3.2. Molekularno-genetičke metode

3.2.1. Izolacija genomske DNK iz periferne krvi i provera kvaliteta izolovane DNK

Uzorci periferne krvi čuvani su na +4°C (sveže uzete krvi) ili -20°C (ranije sakupljeni uzorci krvi) do trenutka izolovanja DNK. Genomska DNK izolovana je iz uzoraka periferne krvi korišćenjem komercijalnog kita QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Nemačka) prema sledećem protokolu:

Protokol za izolovanje DNK iz krvi korišćenjem komercijalnog kita QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Nemačka):

1. u mikrotubu zapremine 1,5 ml (*Eppendorf*, Nemačka) ispipetirano je 500 µl periferne krvi i 1 ml pufera TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8),
2. smeša je centrifugirana 2 minuta na 10 000 obrtaja u minutu (eng. *Rotation Per Minute*, rpm) (Labofuge 400R, rotor 3324, *Heraeus instruments*, Nemačka) na sobnoj temperaturi,
3. supernatant je odličen i dobijeni talog je resuspendovan u 1 ml pufera TE, vorteksovan, centrifugiran 2 minuta na 10 000 rpm,
4. korak 3 je ponavljan dok talog limfocita nije postao beličast,
5. nakon dobijanja beličastog taloga dodato je 20 µl proteinaze K i 300 µl pufera AL,
6. smeša je vorteksovana ~15 s, kratko centrifugirana (eng. *spin-down*) i zatim inkubirana 10 min na 56°C,
7. nakon kratkog centrifugiranja dodato je 300 µl 96% etanola (*Reahem*, Srbija), smeša je vorteksovana ~15 s i kratko centrifugirana,
8. sadržaj iz mikrotube prenet je na kolonu sa silika-membranom smeštenu u prihvatnu tubu i centrifugiran je 1 min na 8 000 rpm,
9. filtrat sa prihvatnom tubom je odbačen i kolona je smeštena u novu prihvatnu tubu,
10. dodato je 500 µl pufera AW1 i centrifugirano je 1 min na 8 000 rpm,
11. filtrat sa prihvatnom tubom je odbačen i kolona je smeštena u novu prihvatnu tubu,
12. dodato je 500 µl pufera AW2 i centrifugirano je 3 min na 13 000 rpm,

13. filtrat sa prihvatnom tubom je odbačen i kolona je prebačena u mikrotubu zapremine 1,5 ml,
14. dodato je 70 μ l sterilne vode bez nukleaza (Nuclease-Free Water, *Qiagen*, Nemačka) i inkubirano je na sobnoj temperaturi 1-5 min,
15. centrifugirano je 1 min na 13 000 rpm,
16. dobijeni uzorak DNK čuvan je na +4°C ili -20°C do dalje analize.

Provera kvaliteta izolovane DNK vršena je elektroforezom u agaroznom gelu. Korišćen je 0,8% (w/v) agarozni gel pravljen u puferu 0,5X TBE (0,045 M Tris-borat, 0,001 M EDTA, pH=8) i bojen etidijum bromidom (EtBr) u krajnjoj koncentraciji od 0,5 μ g/ml. Elektroforeza je izvođena u puferu 0,5X TBE, a kao pufer za nalivanje uzoraka korišćen je 0,25% (w/v) bromfenol-plavo, 0,25% (w/v) ksilencijanol i 30% (v/v) glicerol (Sambrook et al. 1989). Diskretna traka visoke molekulske težine ukazivala je na to da je izolovana DNK u nativnom stanju.

Protokol za pripremu agaroznog gela i elektroforeza u agaroznom gelu:

1. 0,8% (w/v) rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) u puferu 0,5X TBE zagrevan je do ključanja i zagrevanje je nastavljeno dok rastvor nije postao potpuno bistar,
2. u rastvor je dodat EtBr (*Tokyo chemical industry co., ltd*, Japan) u finalnoj koncentraciji od 0,5 μ g/ml, a potom je rastvor ohlađen do ~50°C,
3. ohlađen rastvor naliven je u kadicu za elektroforezu i ostavljen je da polimerizuje na sobnoj temperaturi,
4. po 5 μ l uzorka DNK pomešano je sa puferom za nalivanje uzoraka u odnosu 5:1 i naliveno u bunarić agaroznog gela,
5. elektroforeza je vršena u puferu 0,5X TBE u trajanju od 15 min na konstantnom naponu od 100 V 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 (Mini-transilluminator, *BioRad*, SAD) i fotografisan.

3.2.2. Određivanje koncentracije izolovane DNK

Za određivanje koncentracije izolovanih DNK korišćena je fluorometrijska metoda za kvantifikaciju pomoću uređaja Qubit® 2.0 Fluorometer (*Invitrogen, SAD*) i komercijalnog seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (*Invitrogen, SAD*) koji omogućava određivanje koncentracije DNK u opsegu od 100 pg/μl do 1000 ng/μl.

Protokol za određivanje koncentracije genomske DNK korišćenjem seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (*Invitrogen, SAD*):

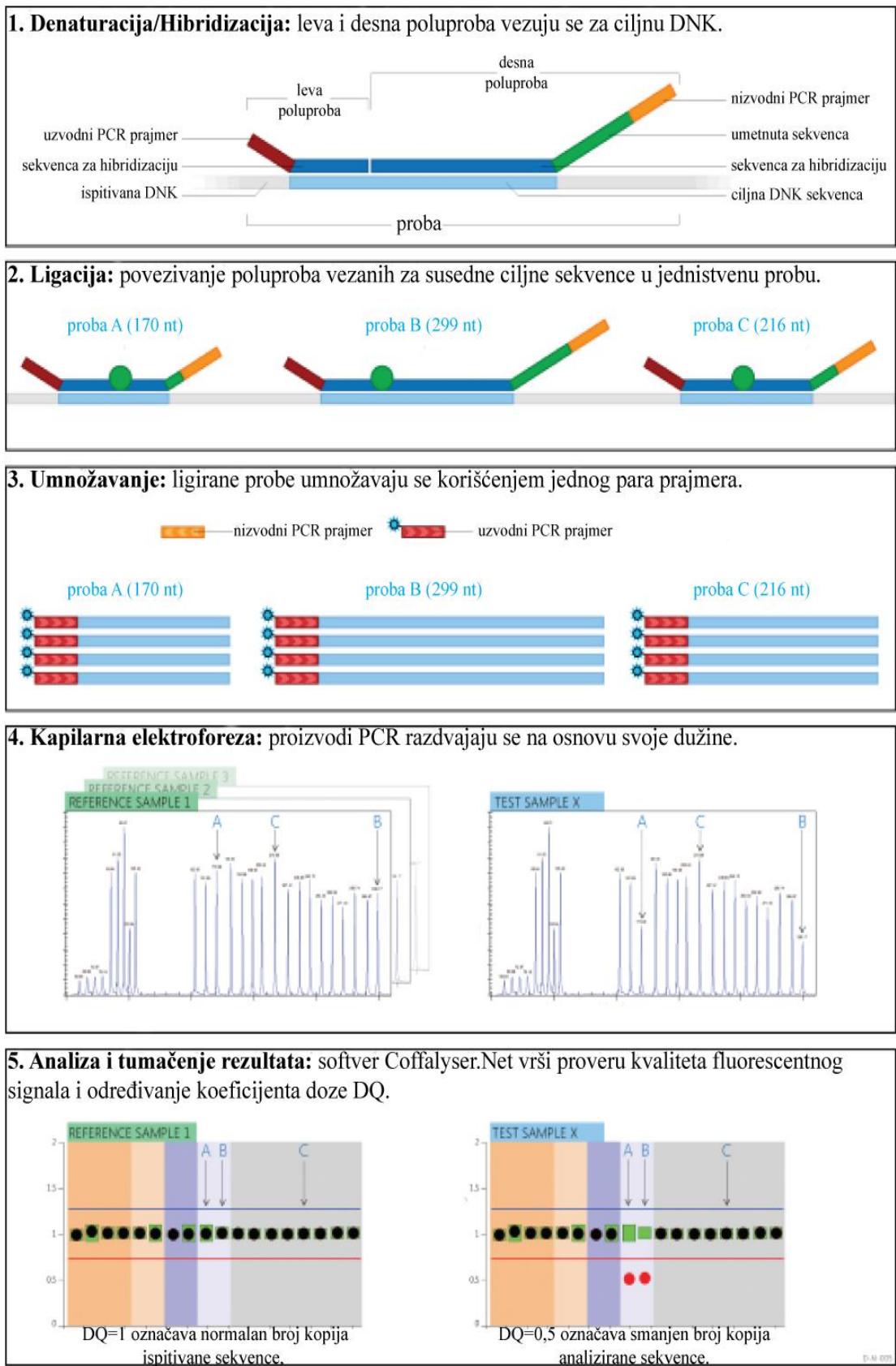
1. pripremljen je Qubit™ radni rastvor mešanjem reagensa Qubit™ dsDNA BR sa puferom Qubit™ dsDNA BR u odnosu 1:200,
2. standardna kriva napravljena je dodavanjem po 10 μl Qubit™ Standard#1 (0 ng/μl) i Qubit™ Standard#2 (100 ng/μl) u po 190 μl Qubit™ radnog rastvora,
3. koncentracija analiziranih uzoraka merena je dodavanjem 5 μl uzorka DNK u 195 μl Qubit™ radnog rastvora, tako da je krajnja zapremina u svakoj mikrotubi iznosila 200 μl,
4. smeše u svim tubama su kratko vorteksovane, a zatim inkubirane na sobnoj temperaturi 1 min,
5. koncentracije izražene u ng/μl očitavane su na uređaju Qubit® 2.0 Fluorometer (*Invitrogen, SAD*).

Sva merenja vršena su u za to namenjenim mikrotubama Qubit™ Assay Tubes zapremine 0,5 ml (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

3.2.3. Određivanje broja kopija gena segmentalne duplikacije 5q13.2 primenom metode umnožavanja većeg broja ligiranih proba (MLPA)

Određivanje broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1*, *NAIP* i *GTF2H2* smeštenih u segmentalnoj duplikaciji 5q13.2 vršeno je metodom umnožavanja većeg broja ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MLPA). MLPA je metoda za određivanje broja kopija većeg broja različitih ciljnih sekvenci DNK (do 60) u jednoj tubi korišćenjem samo jednog para prajmera i zasniva se na umnožavanju i relativnoj

kvantifikaciji proba koje se dodaju u uzorak i vezuju za ciljnu sekvencu, a ne same ciljne sekvence (Schouten et al. 2002) (Slika 3.1). Svaka MLPA proba sastoji se od dve poluprobe – jedne kratke sintetičke oligonukleotidne sekvence i druge duže oligonukleotidne sekvence dobijene korišćenjem faga M13. Svaka kratka sintetička polupropa sadrži na svom 3' kraju sekvencu dužine 21-30 nukleotida (nt) komplementarnu ciljnoj sekvenci, a na 5' kraju sekvencu dužine 19 nt zajedničku za sve MLPA probe koja je istovetna sa sekvencom fluorescentno obeleženog prajmera. Duža polupropa sadrži na svom 5' kraju sekvencu dužine 25-43 nt komplementarnu ciljnoj sekvenci, a na svom 3' kraju sekvencu zajedničku za sve MLPA probe dužine 36 nt komplementarnu drugom, neobebeženom prajmeru, kao i umetnutu sekvencu između njih (eng. *stuffer*) čija se dužina razlikuje među različitim probama. Ukoliko je ciljna sekvenca prisutna, dve poluprobe se vezuju za nju, i to samo ako su joj apsolutno komplementarne, tj. ukoliko u mestu vezivanja probe nije došlo do mutacija tipa tačkastih mutacija, malih insercija ili delecija. Samo one poluprobe koje su se vezale za susedne ciljne sekvence mogu biti povezane fosfodiesterarskom vezom u jedinstvenu probu u reakciji katalizovanoj ligazom. Korišćenjem jednog para prajmera sve ligirane probe bivaju umnožene metodom lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), pri čemu se dobijeni umnošci međusobno razlikuju po dužini zahvaljujući umetnutoj sekvenci i fluorescentno su obeleženi na svom 5' kraju. Nakon završenog PCR-a, dobijeni proizvodi reakcije razdvajaju se po dužini kapilarnom elektroforezom, a identifikuju se i kvantifikuju upotrebom softvera Coffalyser.Net (*MRC-Holland*, Holandija).



Slika 3.1. Prikaz koraka u metodi umnožavanja većeg broja ligiranih proba (MLPA). Slika preuzeta sa https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_hS-AvFINWhkPMYt9ZIZdCx7-VkDGgJqQ1uzZmJTgWTQ i modifikovana).

Umnožavanje svake probe metodom PCR zavisi od prisustva i broja kopija ciljne sekvence. Budući da je MLPA relativna metoda za kvantifikaciju, svaki eksperiment uključuje i referentne uzorke koji moraju biti izolovani iz istog tkiva i pripremljeni na isti način kao i ispitivani uzorci i moraju posedovati normalan broj kopija ciljnih i referentnih sekvenci. Prilikom obrade rezultata najpre se signali ciljnih i referentnih sekvenci pojedinačnog uzorka porede međusobno (eng. *intrasample normalisation*), a potom se signali za pojedinačnu probu ispitivanog uzorka porede sa signalima za istu tu probu iz grupe referentnih uzoraka (eng. *intersample normalisation*). Upravo zbog postojanja koraka normalizacije unutar pojedinačnog uzorka, metoda MLPA omogućuje da početne koncentracije ispitivanih uzoraka budu međusobno različite (ali nikako niže od donje potrebne granice za samu metodu).

Za određivanje broja kopija gena smeštenih u regionu 5q13.2 korišćena je smeša proba SALSA MLPA probemix P021-A2 SMA (*MRC Holland*, Holandija). U ovoj smeši proba nalazi se devet kontrolnih fragmenata, 15 proba specifičnih za region 5q13.2 i 22 referentne probe specifične za druge regione genoma. Među kontrolnim fragmentima jedan služi kao standard za proveru preostalih osam kontrolnih fragmenata, 4 fragmenta Q svojim visokim signalima ukazuju na nisku koncentraciju DNK ili neuspešnu ligaciju, 2 fragmenta D svojim niskim signalima ukazuju na neuspešnu denaturaciju, dok su poslednja dva fragmenta specifična za hromosome X i Y i pružaju podatak o polu ispitivane osobe. Probe specifične za region 5q13.2 su: 2 probe specifične za egzon 7 gena *SMN1* i *SMN2*, 2 probe za egzon 8 gena *SMN1* i *SMN2*, po jedna proba za egzone 1, 4 i 6 i 8 obaju gena (ukazuju na ukupan br. kopija gena *SMN1* i *SMN2*), jedna proba za egzon 5 gena *NAIP* kojom se određuje broj telomernih kopija ovog gena, jedna proba za egzon 13 gena *NAIP* i *NAIP ψ* koja ukazuje na ukupan broj kopija celih i okrnjenih gena *NAIP*, tri probe za određivanje broja kopija gena *GTF2H2*, proba za određivanje broja kopija gena *SERF1A* i *SERF1B* i jedna proba za gen *RAD17* smešten ~300 kb nizvodno u odnosu na gen *SMN1*. Proba za određivanje broja kopija gena *SERF1A* i *SERF1B* označena je kao SERF1B-up, a specifična je za sekvencu koja se prostire na 9167-9101 baznih parova uzvodno od *SERF1A* i *SERF1B* (prema transkriptima iz base Ensembl SERF1A-002; ID transkripta

ENST00000354833 i SERF1B-001; ID transkripta ENST00000380750). Pored smeše proba, korišćen je SALSA MLPA EK1 kit (*MRC Holland*, Holandija) koji sadrži sledeće reagens: SALSA MLPA Buffer, SALSA Ligase-65, Ligase Buffer A i Ligase Buffer B, SALSA PCR Primer Mix i SALSA Polymerase. Metoda MLPA izvodi se prema protokolu proizvođača koji je jedinstven nezavisno od korišćene smeše proba, a sprovodi se u tri koraka: denaturacija DNK i hibridizacija proba sa ciljnom sekvencom, ligacija proba i umnožavanje proba metodom PCR.

3.2.3.1. Denaturacija DNK i hibridizacija proba sa matricom

1. U mikrotube zapremine 0,2 ml (Multiply®-Pro Recip. 0,2ml, *Sarstedt*, Nemačka) dodato je po 5 µl uzorka DNK (ukupne količine 200-500 ng),
2. uzorci su denaturisani na 98°C 5 min u mašini za PCR (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, *Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, SAD), a potom odmah prebacivani na led (Eppendorf® PCR Cooler, *Eppendorf*, Nemačka),
3. pripremljena je smeša za hibridizaciju koja je za svaku pojedinačnu reakciju sadržala: 1,5 µl SALSA MLPA Buffer i 1,5 µl SALSA MLPA probemix P021-A2 SMA,
4. smeša je vorteksovana, a zatim dodata u zapremini od po 3 µl u tube sa uzorcima DNK,
5. smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole,
6. hibridizacija je vršena u mašini za PCR prema sledećem temperaturnom profilu: 95°C 1 min, a zatim 60°C u trajanju 16-20 časova.

3.2.3.2. Reakcija ligacije hibridizovanih proba

1. Pripremljena je smeša za ligaciju koja je za svaku pojedinačnu reakciju sadržala: 25 µl vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka), 3 µl Ligase Buffer A, 3 µl Ligase Buffer B,
2. smeša je kratko vorteksovana, a potom je za svaku reakciju dodato po 1 µl enzima Ligase-65,
3. smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole,

4. temperatura u mašini za PCR spuštena je na 54°C,
5. u svaku mikrotubu od 0,2 ml dodato je po 32 µl smeše za ligaciju i sve je promešano pipetiranjem gore-dole vodeći računa da ne dođe do stvaranja mehurova vazduha,
6. ligacija je izvršena u mašini za PCR prema sledećem temperaturnom profilu: 54°C 15 min (reakcija ligacije), zatim 98°C 5 min (inaktivacija enzima Ligase-65), 20°C do nastavka eksperimenta.

3.2.3.3. Umnožavanje ligiranih proba metodom PCR

1. Na sobnoj temperaturi pripremljena je smeša za PCR koja je za svaku pojedinačnu reakciju sadržala: 2 µl SALSA PCR Primer Mix, 7,5 µl vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka) i 0,5 µl SALSA Polymerase,
2. smeša je promešana pipetiranjem gore-dole,
3. na sobnoj temperaturi, u svaku tubu sa proizvodima ligacije dodato je po 10 µl smeše za PCR,
4. smeša je homogenizovana pipetiranjem gore-dole,
5. reakcija PCR-a sastojala se od: 35 ciklusa denaturacije na 95°C 30 sekundi, hibridizacije prajmera na 60°C 30 sekundi i ekstenzije prajmera na 72°C 1 min. Finalna elongacija vršena je na 72°C 20 min, a uzorci su čuvani na 15°C do analize kapilarnom elektroforezom.

3.2.3.4. Kapilarna elektroforeza

Proizvodi PCR-a analizirani su kapilarnom elektroforezom koja podrazumeva razdvajanje fluorescentno obeleženih umnožaka korišćenjem genetičkog analizatora (ABI-3130 Genetic Analyzer, *Applied Biosystems*, SAD) i analizu rezultata korišćenjem odgovarajućeg softvera.

Priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu:

1. na optičku ploču sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD) naliveno je po 0,7 µl proizvoda reakcije MLPA,
2. u svaki bunarić sa uzorkom dodata je smeša od 0,2 µl standarda za dužinu DNK (Gene Scan 500 Lize Size Standard, *Applied Biosystems*, SAD) i 9 µl Hi-Di formamida (*Applied Biosystems*, SAD),
3. uzorci su denaturisani inkubiranjem optičke ploče u mašini za PCR na 86°C 3 min, a potom ohlađeni trenutnim stavljanjem ploče na led,
4. kapilarna elektroforeza vršena je pod sledećim uslovima: FragmentAnalysis modul za elektroforezu, 1,6 kV napon pri injektiranju uzorka, 15 s vreme injektiranja uzorka, 15 kV napon tokom elektroforeze, 1800 s trajanje elektroforeze, 60°C temperatura rerne, 36 cm dužina kapilare i POP4 (Performance Optimized Polymer™-4, *Applied Biosystems*, SAD) tip polimera.

Konačni odnos jačine fluorescencije određene probe testiranog uzorka i iste probe referentnog uzorka naziva se koeficijent doze (eng. *dosage quotient*, DQ) za datu probu. Za što preciznije tumačenje rezultata neophodno je da budu ispunjena dva kriterijuma: standardna devijacija svih proba referentnih uzoraka trebalo bi da bude $\leq 0,1$, a DQ kontrolnih proba ispitivanih uzoraka između 0,7 i 1,3. U Tabeli 3.2 su prikazane vrednosti DQ za svaku probu iz smeše proba, kao i broj kopija koji je odgovarao dobijenim vrednostima DQ tokom optimizacije metode MLPA.

Tabela 3.2. Koeficijenti doze za probe prisutne u smeši proba MLPA P021 A2 (*MRC-Holland*, Holandija) specifičnih za region 5q13.2 i dodeljeni broj kopija odgovarajućeg gena nakon analize u softveru Coffalyser.Net (*MRC-Holland*, Holandija).

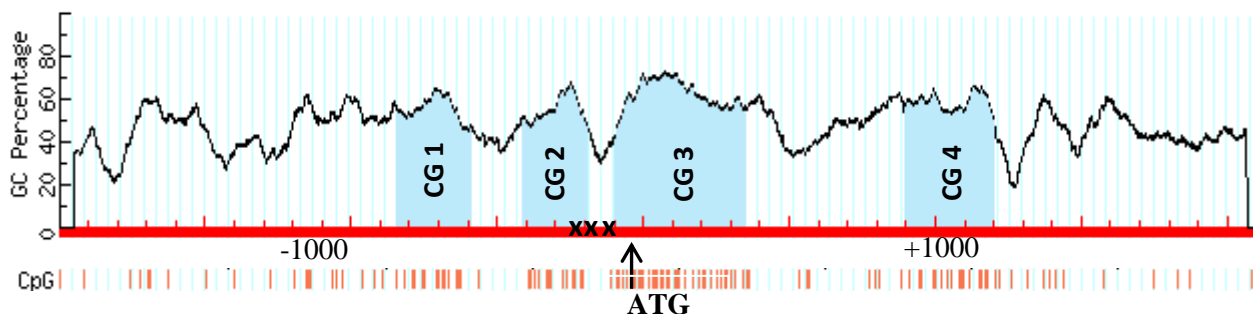
proba MLPA	gen u 5q13.2	egzon	broj kopija gena	DQ
SMN1-7	<i>SMN1</i>	egzon 7	1 kopija	0,39-0,65
		egzon 7	2 kopije*	0,89-1,03
SMN1-8	<i>SMN1</i>	egzon 8	1 kopija	0,41-0,66
		egzon 8	2 kopije*	0,95-1,09
SMN2-7	<i>SMN2</i>	egzon 7	1 kopija	0,38-0,61
		egzon 7	2 kopije	0,72-1,24
		egzon 7	3 kopije	1,41-1,75
		egzon 7	4 kopije	1,71-2,19
SMN2-8	<i>SMN2</i>	egzon 8	1 kopija	0,50-0,63
		egzon 8	2 kopije	0,87-1,24
		egzon 8	3 kopije	1,31-1,79
		egzon 8	4 kopije	1,80-2,53
NAIP-5	<i>NAIP</i>		1 kopija	0,44-0,63
			2 kopije	0,89-1,28
			3 kopije	1,47-1,84
			4 kopije	1,86-2,06
SERF1B-up	<i>SERF1</i>		2 kopije	0,41-0,56
			3 kopije	0,59-0,81
			4 kopije	0,83-1,15
SMN1-1	<i>SMN1+SMN2</i>		2 kopije	0,38-0,58
			3 kopije	0,63-0,81
			4 kopije	0,86-1,27
SMN1-4	<i>SMN1+SMN2</i>		2 kopije	0,40-0,79
			3 kopije	0,54-0,92
			4 kopije	0,85-1,47
SMN1-6	<i>SMN1+SMN2</i>		2 kopije	0,43-0,58
			3 kopije	0,65-0,99
SMN1-8	<i>SMN1+SMN2</i>		4 kopije	0,92-1,32
			2 kopije	0,37-0,63
			3 kopije	0,58-0,89
			4 kopije	0,82-1,22

* prisustvo dve kopije egzona 7 i 8 gena *SMN1* mogu poticati od genotipova 1/1 ili 2/0, što nije moguće razlikovati metodom MLPA

3.3. Određivanje stepena metilacije dela promotora gena *SMN2*

3.3.1. *In silico* predikcija položaja CpG ostrvaca

Predviđanje položaja četiri CpG ostrvaca u genu *SMN2* (Hauke et al. 2009) izvršeno je u softveru MethPrimer (Li & Dahiya 2002) (Slika 3.2).

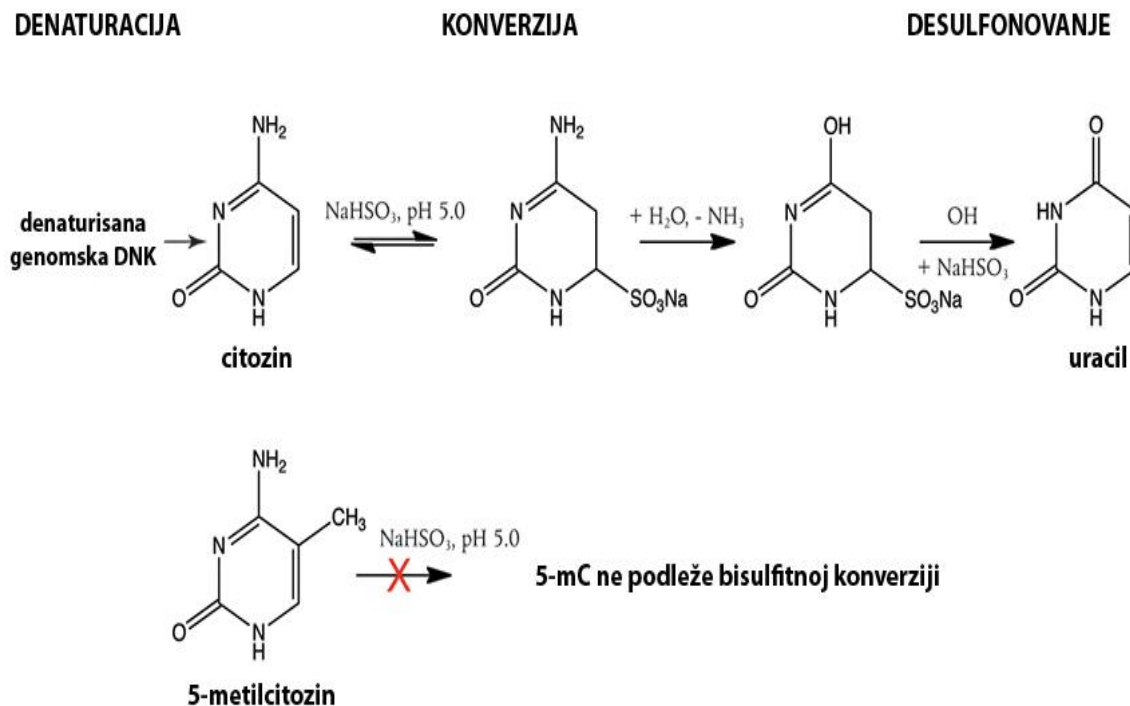


Slika 3.2. Položaj CpG ostrvaca u genu *SMN2* predviđen *in silico* analizom regiona dužine ~3000 bp uzvodno i nizvodno od start kodona korišćenjem softvera MethPrimer. Predstavljena su četiri CpG ostrvceta koja se nalaze na sledećim pozicijama: CG1 od -896 do -645, CG2 od -469 do -247, CG3 od -151 do +295, CG4 od +844 do +1146 u odnosu na start kodon ATG (Hauke et al. 2009). Strelicom je označen položaj start kodona ATG. Simbolom x predstavljeni su položaji triju mesta početka transkripcije.

3.3.2. Bisulfitna konverzija genomske DNK

Da bi se analizirao stepen metilacije sekvence DNK od interesa, neophodno je da ova epigenetička oznaka bude sačuvana i nakon PCR-a. Metoda koja se primenjuje kako bi se sačuvali 5-metil citozini jeste bisulfitna konverzija genomske DNK. Ona podrazumeva tretiranje genomske DNK natrijum-bisulfitom, što dovodi do dezaminacije citozina i nastanka uracila kroz tri koraka (Slika 3.3). Proces konverzije zasnovan je na hemijskoj reakciji jednolančane DNK sa natrijum-bisulfitom i odvija se u tri koraka. Prvi korak je sulfonovanje tokom koga dolazi do vezivanja grupe $-SO_3$ na poziciju C₆ citozinskog prstena i vodonikovog atoma na poziciju C₅, čime nastaje citozin-6-sulfonat u uslovima visoke temperature i niske vrednosti pH. Sledi hidrolitička dezaminacija koja se dešava u uslovima niskog pH, pri čemu nastaje uracil-6-sulfonat. Konačno, desulfonovanjem u uslovima

visokog pH nastaje uracil od uracil-6-sulfonata. Metilacija na atomu C₅ citozina sprečava sulfonovanje na atomu C₆ (Kristensen et al. 2009).



Slika 3.3. Bisulfitna konverzija citozina u uracil. Proces bisulfitne konverzije odvija se u tri koraka: sulfonovanjem nastaje citozin-6-sulfonat, potom hidrolitičkom dezaminacijom nastaje uracil-6-sulfonat, i desulfonovanjem nastao uracil. 5-mC – 5'-metilcitozin.

Bisulfitna konverzija genomske DNK izvršena je korišćenjem komercijalnog seta EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, SAD).

Pripremanje reagensa za bisulfitnu konverziju genomske DNK korišćenjem seta EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, SAD):

1. tuba sa praškastim reagensom CT za konverziju obavijena je aluminijumskom folijom budući da je reagens osetljiv na svetlost. U tubu je dodato 900 µl 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 naizmenično vorteksovana i mućkana okretanjem tube gore-dole na sobnoj

temperaturi u trajanju od 10 min. Svaka tuba pripremljenog reagensa CT za konverziju dovoljna je za deset odvojenih bisulfitnih tretmana DNK. Ako se odmah ne iskoristi, reagens CT za konverziju čuva se preko noći na sobnoj temperaturi, jednu nedelju na +4°C ili jedan mesec na -20°C. Uskladišteni reagens CT za konverziju se pre upotrebe zagreva na 37°C i zatim kratko vorteksuje,

2. rastvor pufera za ispiranje M (eng. *M-Wash buffer*) pripremljen je dodavanjem 96 ml 96% etanola u plastičnu bocu zapremine 24 ml koja je sadržala koncentrovan pufer za ispiranje M.

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

1. u mikrotubu zapremine 0,2 ml sa 20 µl uzorka DNK (200-500 ng) dodato je 130 µl reagensa CT za konverziju, nakon čega je rastvor promešan pipetiranjem gore-dole i smeša je kratko centrifugirana do 13 000 rpm (MiniSpin plus, *Eppendorf*, Nemačka),
2. ovako pripremljene semše denaturisane su na 98°C 10 min, a potom je usledila reakcija bisulfitne konverzije na 64°C 2,5 časova. Ovaj korak urađen je u mašini za PCR, a uzorci su do sledećeg koraka čuvani na +4°C,
3. u kolonu smeštenu u prihvatnu tubu dodato je 600 µl pufera za vezivanje M (eng. *M-Binding Buffer*), a potom i reakciona smeša sa prethodno konvertovanom DNK,
4. kolona je zatvorena i rastvor je promešan izvrtanjem kolone nekoliko puta i centrifugiran na 10 000 rpm 1 min,
5. prihvatna tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu prihvatnu tubu,
6. dodato je 100 µl pufera za ispiranje M u kolonu i centrifugirano je na 10 000 rpm 1 min,
7. prihvatna tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu prihvatnu tubu,
8. dodato je 200 µl pufera za desulfonovanje M (eng. *M-Desulphonation Buffer*) u kolonu i smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 15-20 min, a potom centrifugirana na 10 000 rpm 1 min,

9. prihvatna tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu kolektorsku tubu,
10. dodato je 200 µl pufera za ispiranje M u kolonu i centrifugirano je na 10 000 rpm 1 min,
11. prihvatna tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu prihvatnu tubu,
12. dodato je 200 µl pufera za ispiranje M u kolonu i centrifugirano je na 10 000 rpm 1 min,
13. prihvatna tuba sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u tubu zapremine 1,5 ml,
14. dodato je 10 µl vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka) na sredinu matriksa kolone, smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 10 000 rpm 1 min,
15. dobijeni uzorak bisulfitno konvertovane DNK čuvan je na temperaturi od -20°C do upotrebe.

Bisulfitno konvertovana DNK korišćena je kao matrica za umnožavanje dela promotora gena *SMN2*.

Provera uspešnosti bisulfitne konverzije genomske DNK vršena je samo tokom optimizacije metode, i to elektroforezom u 2% (w/v) agaroznom gelu pripremljenom prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. i hlađenjem agaroznog gela nakon elektroforeze u frižideru na 4°C u trajanju od 20 min, a pre izlaganja UV svetlu.

3.3.3. Dizajniranje prajmera za umnožavanje bisulfitno konvertovane DNK

Molekularno-biološke metode koje koriste umnožavanje bisulfitno konvertovane DNK metodom PCR mogu se podeliti u dve grupe na osnovu korišćenih prajmera. Jedna grupa metoda koristi prajmere koji umnožavaju ciljnu sekvencu na način zavisian od metilacije, poput metilaciono specifičnog PCR-a. Druga grupa metoda omogućuje umnožavanje ciljne sekvence nezavisno od njenog metilacionog statusa i zahteva dodatnu analizu dobijenih proizvoda PCR-a. U ovu grupu metoda ubraja se bisulfitno sekvenciranje, restrikciona digestija korišćenjem restrikcionih enzima čija je aktivnost zavisna od

metilacije, analiza krivih topljenja visoke rezolucije i molekularno kloniranje praćeno sekvenciranjem pojedinaćnih klonova. Srazmerno umnoŹavanje metilovanih i nemetilovanih matrica kljućno je za drugu grupu metoda, a preferencijalno umnoŹavanje samo jedne vrste matrice moŹe dovesti do pogrešnog tumaćenja rezultata. Sklonost PCR-a da preferencijalno umnoŹava jednu vrstu matrice zavisna je od sekvence. Kao što se u standardnom PCR-u lakše i brŹe umnoŹavaju kraći fragmenti DNK, tako se u PCR-u koji kao matricu koristi bisulfitno konvertovanu DNK lakše i brŹe umnoŹava nemetilovana DNK koja je siromašna nukleotidima G i C. Podešavanje temperature hibridizacije prajmera moŹe da pospeši umnoŹavanje metilovanih fragmenata DNK (Shen et al. 2007), ali ćak ni na ovaj naćin ne dolazi do znaćajnijeg pomeranja ravnoteŹe u njihovu korist (Warnecke et al. 1997; Wojdacz & Hansen 2006). Međutim, ukljućivanje dinukleotida CpG u sekvencu samih prajmera, i to što bliŹe 5' kraju, pomera ravnoteŹu u korist umnoŹavanja metilovanih sekvenci (Wojdacz & Dobrovic 2007), kompenzujući na taj naćin pomenutu „pristrasnost“ PCR-a. Dodatne osobine ispitivanog fragmenta koje treba uzeti u obzir u analizama metilacije jesu duŹina proizvoda umnoŹavanja i broj dinukleotida CpG u njima. Kao najuspešnji za analizu pokazali su se proizvodi duŹine 100-200 bp i sa najviše 16 dinukleotida CpG. Što je veći obuhvaćeni broj dinukleotida CpG, to će biti i veća razlika u krajnjim taćkama topljenja fragmenata koji su potpuno metilovani i onih koji su potpuno nemetilovani. Dizajn prajmera za umnoŹavanje bisulfitno konvertovane DNK predstavlja izazovan zadatak jer alatke za proveru specifićnosti vezivanja prajmera za bisulfitno konvertovanu ciljnu sekvencu nisu dostupne.

U ovoj doktorskoj tezi, za analizu stepena metilacije dela promotora gena *SMN2*, korišćena su dva para prajmera dizajnirana uz pomoć softvera Bisulfite Primer Seeker (www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker, Zymo Research, SAD). Prvi par prajmera (HRM_Met_F i HRM_Met_R) korišćen je za dobijanje proizvoda PCR-a za analizu krivih topljenja visoke rezolucije, dok je drugi par prajmera (HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R) korišćen za umnoŹavanje fragmenta za molekularno kloniranje i bisulfitno sekvenciranje. Sekvence prajmera sa ukupnom duŹinom umnoŹavanog fragmenta prikazane su u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Nazivi i sekvence prajmera korišćenih u analizi stepena metilacije promotorskog regiona gena *SMN2* sa prikazanim krajnjim dužinama proizvoda PCR-a.

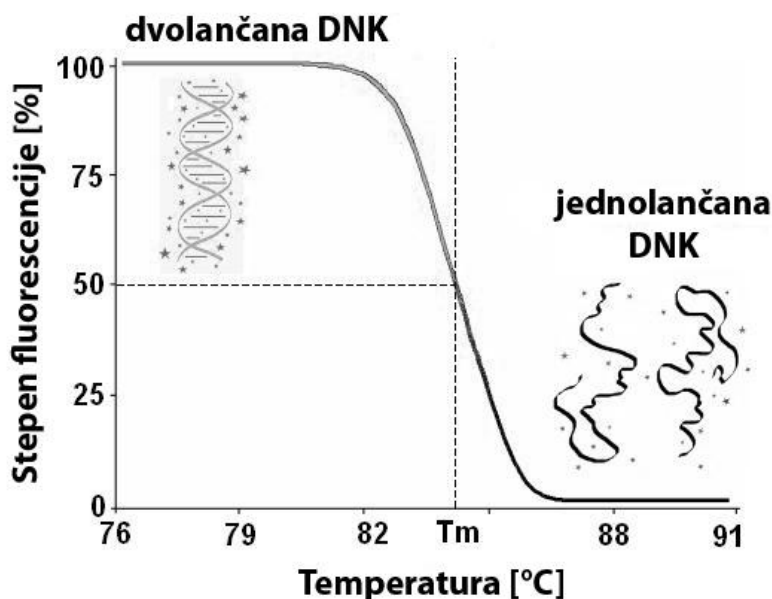
Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Dužina umnožavanog fragmenta
HRM_Met_F	5' TTATTGGGGAGGTTGAGGTGGGAGGAT 3'	104 bp
HRM_Met_R	5' TTGTATTTTAGTTTGAGCGATAGGGCGAGG 3'	
HRM_SMN2_F	5' GGAGGAT CGTTTGAGTTTAAGAAG 3'	200 bp
HRM_SMN2_R	5' GTTATAAATGTGGGAGGGCGATAATTA 3'	

3.3.4. Analiza krivih topljenja visoke rezolucije

Metoda analize krivih topljenja visoke rezolucije (eng. *High Resolution Melting*, HRM) je relativno nova i brza metoda za analizu sekvenci DNK koja se zasniva na topljenju umnožaka dobijenih metodom PCR. Omogućena je usavršavanjem boja koje se vezuju za dvolančanu DNK i razvojem nove generacije reagenasa i uređaja za brzi PCR u realnom vremenu (eng. *fast real-time PCR*) i softvera za obradu dobijenih podataka. Analizom HRM moguće je razlikovati sekvence DNK na osnovu nukleotidnog sastava, dužine i GC sadržaja, te se stoga može primeniti u analizi varijanti sekvence DNK (analiza mutacija, genotipizacija tačkastih genetičkih varijanti) ili stepena metilacije DNK.

Prvi korak u primeni ove metode je umnožavanje sekvence DNK od interesa metodom PCR u prisustvu zasićujuće fluorescentne boje koja se vezuje za dvolančanu DNK, kada i emituje najveći stepen fluorescencije. Jačina fluorescencije se meri nakon svakog ciklusa PCR-a kako bi se konstruisala kriva umnožavanja. Nakon umnožavanja sledi korak postepenog topljenja proizvoda PCR-a tokom koga dolazi do oslobađanja boje u rastvor i promene njene konformacije, što uzrokuje smanjenje fluorescencije, da bi nakon potpunog topljenja do jednolančanih molekula fluorescencija izostala. Navedeni proces topljenja predstavljen je krivom topljenja karakterističnom za odgovarajući molekul DNK (Slika 3.4).

Kako bi se odredio stepen metilacije fragmenta DNK od interesa, neophodno je da se njegova kriva topljenja uporedi sa krivama topljenja standarda poznatog stepena metilacije. U tu svrhu korišćen je EpiTect PCR Control DNA Set (*Qiagen*, Nemačka) koji sadrži bisulfitno konvertovanu univerzalno metilovanu (potpuno metilovanu) i univerzalno nemetilovanu (potpuno nemetilovanu) DNK, kao i nekonvertovanu nemetilovanu DNK. Univerzalno metilovana i univerzalno nemetilovana DNK mešane su u odgovarajućim zapreminskim odnosima kako bi se dobili standardi sa prelaznim stepenom metilacije (0%, 1%, 10%, 20%, 50%, 75%, 100%), a potom i jasno razdvojene krive topljenja nakon analize. Na ovaj način dobijene standardne krive topljenja mogu poslužiti kao referentne krive za određivanje stepena metilacije ispitivanog fragmenta.



Slika 3.4. Šematski prikaz smanjenja stepena fluorescencije tokom topljenja DNK u analizi HRM, sa odgovarajućom krivom topljenja (slika preuzeta sa https://www.dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html i modifikovana).

Sastav reakcione smeše i krajnje koncentracije komponenata za umnožavanje fragmenta DNK za analizu metodom HRM bili su sledeći: 1X MeltDoctor HRM Master Mix (*ThermoFisher Scientific*, SAD), 0,36 μ M prajmeri HRM_Met_F i HRM_Met_R, voda do krajnje zapremine smeše od 5 μ l. Temperaturni profil reakcije PCR-a bio je sledeći:

početna denaturacija i aktivacija enzima na 95°C 10 min, praćena sa ukupno 45 ciklusa od kojih se svaki sastojao od denaturacije na 95°C 15 s, hibridizacije prajmera i ekstenzije na odgovarajućoj temperaturi u trajanju od 30 s. U prvih 5 ciklusa temperatura hibridizacije i ekstenzija prajmera iznosila je 70°C, u narednih 5 ciklusa 68°C, potom u 15 ciklusa 65°C i u poslednjih 20 ciklusa 62°C. Proizvodi PCR-a su potom denaturisani na temperaturi od 95°C 15 s, a snižavanjem temperature na 60°C podsticana je njihova renaturacija. Dodatnim izlaganjem uzoraka temperaturi od 40°C između denaturacije i renaturacije stimulisan je nastanak heterodupleksa, odnosno dvolančanih molekula DNK koji sadrže nesparene nukleotide zbog prisustva različitih alela određene sekvence. Različito metilovani aleli iste sekvence, svaki sa drugačijim obrascem metilovanih i nemetilovanih dinukleotida CpG, označeni su kao epialeli. Temperatura je zatim ponovo povećavana do 95°C, ali postepeno, u dugom vremenskom periodu (0,5% najveće brzine promene temperature), što i predstavlja korak topljenja DNK. Eksperimentalne procedure izvođene su na uređaju StepOnePlus Real-Time PCR System (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, SAD). Za analizu dobijenih rezultata korišćeni su programi StepOnePlus™Software v2.3 (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, SAD) i High Resolution Melt Software v3.0.1 (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*, SAD).

3.3.5. Određivanje obrasca metilacije promotorskog regiona gena *SMN2* molekularnim kloniranjem i bisulfitnim sekvenciranjem

Molekularno kloniranje (kloniranje DNK) je postupak umnožavanja fragmenta DNK od interesa. Molekularno kloniranje omogućeno je:

1. stvaranjem rekombinantnog molekula DNK koji nastaje spajanjem (ligacijom) fragmenta DNK od interesa (insert) sa nosačem (vektorom) koji ima sposobnost da umnožava i sebe i primljeni insert,
2. procesom transformacije bakterija tokom kog se prethodno nastali rekombinantni molekul DNK unosi u bakterijsku ćeliju u kojoj se vrši njegovo umnožavanje,
3. odabirom klonova bakterijskih ćelija koji sadrže rekombinantni molekul DNK, njegovim daljim umnožavanjem, izolovanjem i identifikacijom.

U svrhu kloniranja fragmenta DNK od interesa korišćeno je kloniranje pomoću PCR-a (eng. *PCR cloning*). Najpre je umnožen deo promotora *SMN2* pomoću prajmera HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R. PCR je izvođen u zapremini od 25 µl. Sastav reakcione smeše PCR-a bio je sledeći: 50 ng bisulfitno konvertovane DNK, 1X KAPA Taq Buffer A with 15 mM MgCl₂ (*Kapa Biosystems*, SAD), 200 µM dNTP (*Fermentas*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,2 µM prajmera HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R, 0,04 U/µl (1U) KAPA Taq DNA Polymerase (*Kapa Biosystems*, SAD), i voda bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Temperaturni profil reakcije PCR-a sastojao se od početne denaturacije na 97°C 3 min, praćene sa 35 ciklusa od kojih se svaki sastojao od denaturacije na 95°C 30 s, hibridizacije prajmera na 63°C 30 s i ekstenzije prajmera na 72°C 1 min. Finalna elongacija na 72°C trajala je 10 min, a usledila je inkubacija na 20°C 20 min i inkubacije na +4°C do dalje analize.

3.3.5.1. Reakcija ligacije inserta i vektora

Usledila je reakcija ligacije fragmenta dobijenog metodom PCR i vektora pBluescriptT/A (dužine 2975 bp) dizajniranom prema proceduri opisanoj u Uzelac et al. 2015. Sastav reakcione smeše za ligaciju bio je sledeći: 1X T4 DNA Ligase Buffer (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 500 µM rATP (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), 0,2 U/µl (4 U) T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), ~50 ng vektora pBS-TA, 100 ng umnoženog fragmenta, dok je sveukupna smeša dopunjena vodom bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka) do krajnje zapremine od 20 µl. Reakcija ligacije odvijala se na 16°C preko noći. Ukupna dužina ovako nastalog rekombinantnog molekula DNK iznosila je 3175 bp. Po završetku reakcije ligacije, proizvodi reakcije čuvani su do dalje analize na +4°C u kraćem vremenskom roku ili na -20°C u dužem vremenskom roku. Vektor pBluescriptT/A zahteva korišćenje polimeraze koja svojom terminalno-transferaznom aktivnošću dodaje jedan molekul ATP na 3'-kraj svakog novosintetisanog lanca, i to nezavisno od matrice. Otuda ovakvi fragmenti sa A repićem (eng. *A-tail*) mogu biti ligirani sa vektorom, kao što je pBluescriptT/A, koji poseduje komplementarni T repić (eng. *T-tail*).

3.3.5.2. Pripremanje prekonodne bakterijske kulture

U erlenmajer je sipano ~10 ml sterilnog tečnog medijuma LB, nakon čega je vrh sterilne čačkalice (ili eze) uronjen u glicerolski štok bakterija i prenet u tečni medijum LB u sterilnim uslovima (sterilisati plamenikom zaptivač erlenmajera sa medijumom LB, kao i vrh erlenmajera; ceo postupak izvoditi na 20-30 cm daleko od plamenika). Prekonodna kultura dobijena je inkubiranjem bakterija u LB medijumu preko noći na 37°C i ljujanjem na brzini od 180 rpm. Korišćen je soj bakterija *Escherichia coli* DH5 α . 100 ml tečnog medijuma LB sadržalo je 1g triptona (*Torlak*, Srbija), 0,5 g ekstrakta kvasca (*Torlak*, Srbija) i 0,5 g natrijum-hlorida.

3.3.5.3. Pravljenje čvrste podloge za zasejavanje bakterija

100 ml čvrstog medijuma LB (tzv. agar LB) sadržalo je 1g triptona (*Torlak*, Srbija), 0,5 g ekstrakta kvasca (*Torlak*, Srbija), 0,5 g natrijum-hlorida i 1,5 g agara (*Torlak*, Srbija). Pripremljeni agar LB je sterilisan i u prohladeni medijum, pre polimerizacije, dodat je antibiotik ampicilin u krajnjoj koncentraciji 100 μ g/ml. U sterilnim uslovima agar LB je razliven u debljini od ~5 mm u Petrijeve posude prethodno obeležene na donjoj polovini posude. Nakon što je agar polimerizovao u posudama, posude su sušene na 37°C.

3.3.5.4. Pravljenje dnevne kulture bakterija

Narednog dana u sterilnim uslovima napravljeno je razblaženje prekonodne kulture od 100 puta dodavanjem 100 μ l prekonodne kulture bakterija u 10 ml sterilnog tečnog medijuma LB bez dodatog antibiotika. Brojnost bakterijske populacije u medijumu određena je spektrofotometrijski i izražena kroz optičku gustinu (eng. *Optical Density*, OD). Merenje OD vršeno je na uređaju Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo). na talasnoj dužini od $\lambda=620$ nm.

Dnevna kultura bakterija dobijena je inkubiranjem ovako pripremljene kulture ljujanjem na 37°C sve dok optička gustina nije dostigla vrednost od ~0,5. Treba imati u vidu da se OD udvostruči za ~20 min.

3.3.5.5. Pravljenje kompetentnih ćelija

Nakon što je OD dostigla vrednost od ~0,5, izvršena je transformacija bakterija pravljenjem kompetentnih ćelija koje su mogle da usvoje rekombinantni molekul DNK prema sledećem protokolu:

1. u mikrotubu od 1,5 ml u sterilnim uslovima nalivena je do vrha dnevna kultura,
2. mikrotuba je centrifugirana 2 min na 13 000 rpm,
3. odliven je supernatant,
4. dodato je 1,5 ml 0,1 M CaCl₂ ohlađenog na +4°C i smeša je promešana pipetiranjem gore-dole (ne vorteksovati),
5. smeša je inkubirana na ledu 30 min,
6. centrifugirano je 2 min na 13 000 rpm na temperaturi od +4°C,
7. odliven je supernatant i dodato je 50-100 µl 0,1 M CaCl₂ ohlađenog na +4°C,
8. smeša je inkubirana na ledu 15-30 min,
9. u mikrotubu je dodata celokupna smeša sa proizvodima ligacije,
10. smeša je inkubirana na ledu 45 min,
11. bakterije su izložene toplotnom šoku inkubiranjem 1 min na 42°C,
12. smeša je inkubirana na ledu 5 min,
13. na prethodno pripremljenu Petrijevu posudu sa agarom LB razliven je sadržaj mikrotube i dobro utrljan sterilnim štapićem po Drigalskom u podlogu u sterilnim uslovima,
14. Petrijeva posuda inkubirana je preko noći na 37°C okrenuta naopačke (kako bi se sprečilo prisustvo kondenzata direktno u bakterijskoj kulturi).

Narednog dana je Petrijeva posuda sa izraslim kolonijama bakterija čuvana na +4°C. Svaka kolonija iz Petrijeve posude čačalicom je prebačena u staklene flašice sa tečnim medijumom LB u koji je prethodno dodat ampicilin u koncentraciji 100 µg/ml (*Sigma-Aldrich by Merck KgaA*, Nemačka), čime je inkubiranjem u toku noći na 37°C dobijena prekonoćna kultura. Usledila je izolacija rekombinantnih molekula DNK iz bakterijskih ćelija metodom mini-prep.

3.3.5.6. Izolovanje rekombinantnih molekula DNK metodom mini-prep

1. u sterilnim uslovima iz svake staklene flašice sa prekonoćnom kulturom bakterija deo kulture odliven je u mikrotubu od 1,5 ml do njenog vrha,
2. mikrotube su centrifugirane 2 min na 13 000 rpm,
3. odliven je supernatant u posudu sa varikinom ili detergentom ostavljajući 50-100 μ l medijuma LB u mikrotubi zajedno sa talogom ćelija,
4. mikrotube su vorteksovane ~10 s,
5. dodato je 300 μ l sveže pripremljenog pufera TENS (za 1 ml pufera TENS potrebno je 100 μ l 10X pufer TE (pH=8), 10 μ l 10 N NaOH, 25 μ l 20% SDS i voda bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka)) i mikrotube su vorteksovane ~5 s,
6. dodato je 150 μ l 3 M natrijum-acetata (pH=5,2) i smeša je vorteksovana ~10 s do pojave plivajućeg belog krpičastog taloga,
7. mikrotube su centrifugirane 2 min na 13 000 rpm,
8. supernatant je prebačen u čistu mikrotubu od 1,5 ml,
9. dodato je 900 μ l 96% etanola ohlađenog na -20°C i izmešano okretanjem mikrotuba gore-dole nekoliko puta,
10. mikrotube su centrifugirane 2 min na 13 000 rpm kako bi se istaložile plazmidna DNK i RNK koje su nekada vidljive kao beli talog,
11. odliven je supernatant i dodat je 1 ml 70% etanola ohlađenog na -20°C i izmešano okretanjem mikrotuba gore-dole nekoliko puta,
12. mikrotube su centrifugirane 2 min na 13 000 rpm,
13. odliven je supernatant i osušen je talog,
14. dodato je 20-40 μ l vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka),
15. dodat je 1 μ l RNaze (10 mg/ml) (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) i inkubirano je 15 min na 37°C,
16. proverena je uspešnost izolacije plazmidne DNK na 1% agaroznom gelu nalivanjem 2-3 μ l izolata.

3.3.5.7. Provera specifičnosti ukloniranog inserta restrikcijom digestijom

Budući da su dužine vektora i inserta unapred poznate, na osnovu obrasca traka na agaroznom gelu dobijenih elektroforezom rekombinantne DNK digerirane restrikcijom enzimima može se eksperimentalno odrediti dužina inserta, na osnovu čega se posredno zaključuje o njegovoj specifičnosti. Restrikcijona mesta mogu da okružuju insert, čime on može u celosti biti isečen i oslobođen iz rekombinantnog molekula, ili restrikcijono mesto može da se nalazi u samom insertu. U ovoj doktorskoj tezi korišćena su oba pomenuta pristupa u cilju provere specifičnosti inserta. Prva restrikcijona digestija izvršena je pomoću restrikcijonog enzima *DraI* (*Thermo Fisher Scientific, SAD*), čije se restrikcijono mesto 5'TTT ↓ AAA3' nalazi u sekvenci inserta, kao i u sekvenci vektora, čime su se dobijali fragmenti dužina 19 bp, 692 bp, 1158 bp i 1306 bp. Druga restrikcijona digestija vršena je upotrebom restrikcijonog enzima *BamHI* (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) čija restrikcijona mesta 5'G ↓ GATCC3' okružuju insert i hidrolizom na ovim mestima dolazi do njegovog oslobađanja zajedno sa delom okolne sekvence, čime se dobijaju fragmenti dužina 217 bp i 2958 bp. Po 1 µl izolovanog rekombinantnog molekula korišćen je kao supstrat za restrikcijone digestije u reakcionoj smeši čija je krajnja zapremina iznosila 10 µl. Ova smeša sadržala je i 2 U restrikcijonog enzima *DraI* ili *BamHI* (*Thermo Fisher Scientific, SAD*), 1X pufer Tango (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) i vodu bez nukleaza (*Qiagen, Nemačka*).

Proizvodi restrikcijone digestije razdvajani su elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Priprema gela, elektroforeza i vizuelizacija fragmenata DNK opisana je u poglavlju 3.2.1.

3.3.6. Identifikacija epialela Sangerovim sekvenciranjem

Provera specifičnosti inserta i određivanje obrasca metilacije izvršeni su Sangerovim sekvenciranjem. U mikrotube sa izolovanim rekombinantnim molekulima DNK dodato je po 200 µl 96% etanola, a zatim je celokupna smeša nalivena na kolonu sa silika membranom i dalje prečišćavana po protokolu za izolaciju DNK opisanom u poglavlju 3.2.1.

Reakcija Sangerovog sekvenciranja izvršena je pomoću BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) 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, 0,16 µM prajmer T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'), 1,27 M betain i prečišćeni rekombinantni molekul DNK do pune zapremine. Sekvence su očitavane u softveru Sequencing Analysis Software v6.0 (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) i analizirane u softveru BioEdit (*Ibis Biosciences, SAD*).

3.4. Statistička obrada rezultata

Sve statističke analize izvršene su u softverskom okruženju R za statističko računanje i grafički prikaz, verzija 3.3.3 (R Core Team 2017). U svim analizama prag značajnosti bio je 0,05, osim u slučaju višestrukih poređenja kada je prag značajnosti korigovan Bonferonijevom korekcijom.

Korelacija broja kopija gena *SMN2*, *SERFI* i *NAIP* sa tipom dečije SMA, kao pokazateljem težine bolesti, testirana je Spirmanovim testom korelacije. Najbolji minimalni model koji objašnjava fenotipsku varijabilnost dečije SMA sa malim brojem prediktorskih varijabli dobijen je primenom generalizovanih linearnih modela i eliminacijom unazad (eng. *backward elimination*). Početni model je obuhvatio sve nezavisne (prediktorske) promenljive: broj kopija gena *SMN2*, *SERFI* i *NAIP*, kao i njihove interakcije. Eliminacijom unazad odbacivana je po jedna prediktorska promenljiva, i to počevši od one koja je bila najmanje statistički značajna (tj. imala najvišu p-vrednost). Modeli su upoređivani na osnovu Akaike informacionog kriterijuma (AIC) koji predstavlja relativnu meru kvaliteta modela primenjenog na odgovarajući skup podataka. Model koji je obuhvatio najmanji broj statistički značajnih prediktorskih promenljivih i koji je imao najmanju vrednost AIC odabran je kao najbolji minimalni model.

Analiza i grafički prikaz ukupnog vremena preživljavanja bolesnika sa SALS izvršeni su u paketima *survival* (Therneau 2015) i *survminer* (Kassambara & Kosinski 2017) softverskog okruženja R. Ukupno vreme preživljavanja definisano je kao vreme

između trenutka postavljanja dijagnoze i krajnje tačke posmatranja bolesnika, što je bio datum smrti za umrle ili desna strana perioda praćenja (kraj juna 2017.) za bolesnike bez izveštaja o smrtnom ishodu, tzv. bolesnike cenzurisane udesno.

Testiranje asocijacije broja kopija *SMN1*, *SMN2*, *NAIP* i *SERF1* sa *SALS* vršeno je Fišerovim testom tačne verovatnoće.

Kumulativna verovatnoća preživljavanja, definisana kao verovatnoća preživljavanja do određene tačke u vremenu i jednaka proizvodu verovatnoća preživljavanja svake prethodne vremenske tačke, procenjena je Kaplan-Majerovim metodom. Srednje vreme preživljavanja definisano je kao tačka u vremenu u kojoj je 50% bolesnika živo.

Svaka genetička, demografska i klinička promenljiva bila je podeljena u podgrupe (stratifikovana) i krive preživljavanja različitih podgrupa unutar iste promenljive bile su poređene log-rank testom. Da bi se log-rank test primenio na kontinuirane promenljive, bilo je neophodno podeliti ih na diksretne intervale procesom dihotomizacije korišćenjem odgovarajuće granične vrednosti. Starost na početku bolesti, zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze i dijagnostičko kašnjenje podeljeni su na dve podgrupe korišćenjem medijane kao granične vrednosti, dok je za dihotomizaciju zbira MMSE i FVC u trenutku dijagnoze kao granična vrednost uzeta ona vrednost koja je ukazivala na blag kognitivni poremećaj (<24) ili poremećaj disanja (<90), redom (Tombaugh et al. 1992).

Pod pretpostavkom da pojedinačne promenljive posmatrane nezavisno ne mogu dovoljno dobro da objasne preživljavanje, da efekat pojedinačnih promenljivih može biti mali, sakriven ili izmenjen prisustvom konfaundera (Craig 2008), primenjena je multivarijabilna Koksova regresiona analiza kojom je ispitivan uticaj većeg broja prediktorskih promenljivih na preživljavanje. Univarijabilna Koksova regresiona analiza poslužila je kao metoda odabira kliničkih promenljivih (tzv. kovarijata) za model koji će biti testiran multivarijabilnom Koksovom regresionom analizom. Kao i generalizovani linearni modeli, i multivarijabilna analiza zasnovana je na logističkoj regresiji i postupnom odbacivanju prediktorskih promenljivih iz modela eliminacijom unazad. Ukupna značajnost dobijenog Koksovog regresionog modela opisana je testom količnika verodostojnosti (eng.

Likelihood ratio test, LRT) između modela koji sadrži prediktorsku promenljivu i nultog modela, tj. onog koji je ne sadrži i u kom su svi regresioni koeficijenti β jednaki nuli. I u univarijabilnoj i u multivarijabilnoj Koksovoj regresionoj analizi kao mera procenta objašnjene varijabilnosti preživljavanja korišćen je koeficijent determinacije R^2 . Vrednosti koeficijenta determinacije mogu se kretati između 0 i 1, gde vrednosti bliže jedinici ukazuju na to da model bolje objašnjava varijabilnost zavisne promenljive, u ovom slučaju vremena preživljavanja. Uticaj promenljivih iz krajnjeg Koksovog regresionog modela procenjen je konstruisanjem krivih preživljavanja. Važan deo Koksovih regresionih analiza predstavlja provera pretpostavke na kojoj ova analiza počiva, a to je pretpostavka o srazmernosti rizika za umiranje tokom vremena. U tu svrhu, za svaku prediktorsku promenljivu u krajnjem modelu i za model u celini korišćen je Schoenfeld [Šonfeld] test reziduala za analizu zavisnosti Šonfeldovih reziduala od vremena. Pretpostavka o srazmernosti rizika za umiranje tokom vremena je narušena ukoliko između Šonfeldovih reziduala i vremena postoji statistički značajna veza ($p < 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Spinalna mišićna atrofija

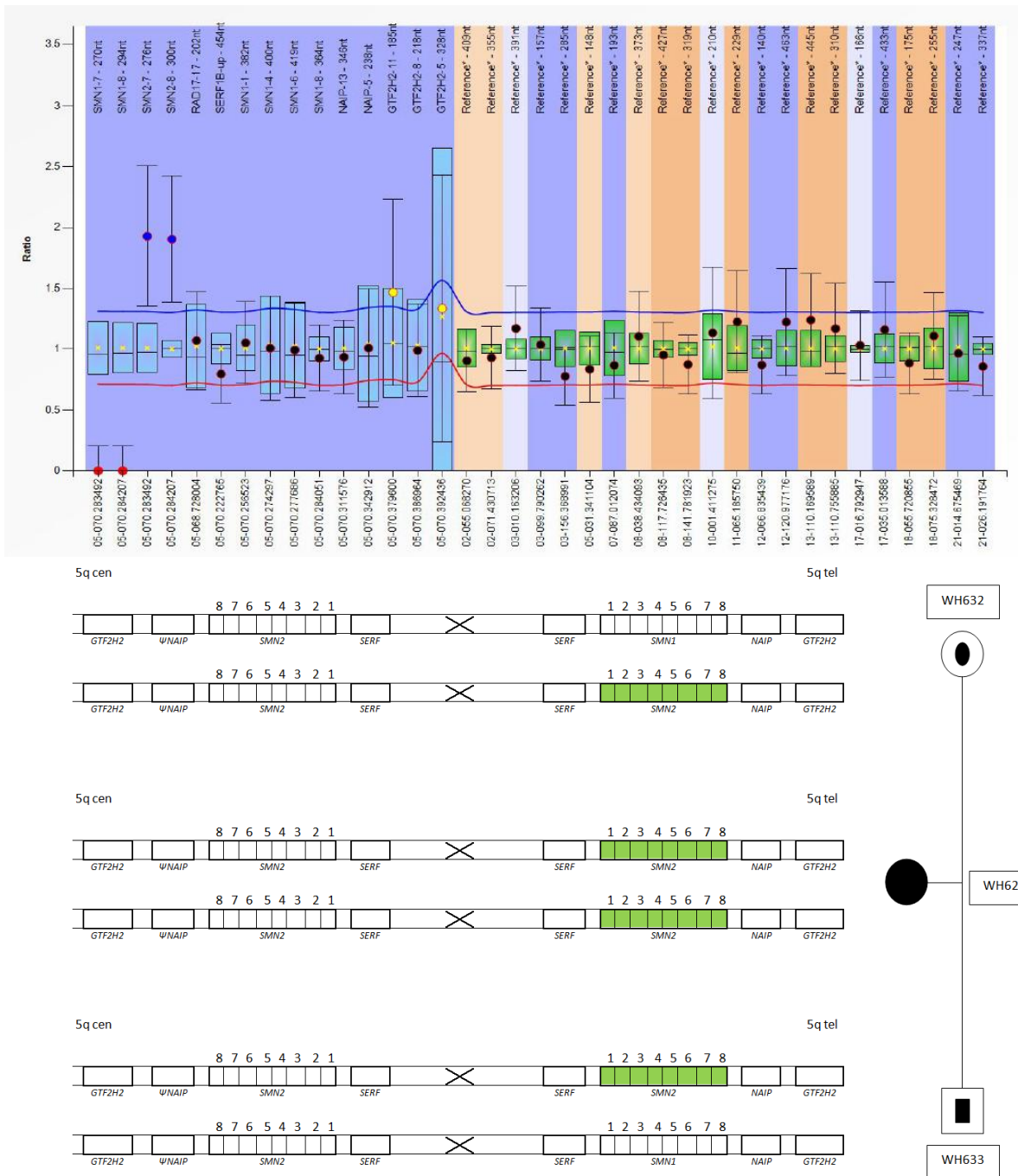
4.1.1. Status gena *SMNI* kod ispitivanih SMA bolesnika i roditelja

Metodom MLPA je kod svih SMA bolesnika utvrđeno homozigotno odsustvo egzona 7 gena *SMNI*. Kod ~95% (94/99) bolesnika ceo gen *SMNI* bio je odsutan u homozigotnom stanju, dok je kod preostalih ~5% (5/99) u jednom od alela egzon 8 bio prisutan.

U grupi roditelja SMA bolesnika status nosioca potvrđen je kod gotovo svih: 95,9% (117/122) roditelja posedovalo je jednu kopiju gena *SMNI* (genotip 1/0 ili *trans* konfiguracija), a 2,46% (3/122) roditelja posedovalo je dve kopije gena *SMNI* na istom hromozomu (genotip 2/0 ili *cis* konfiguracija). Kod preostala dva roditelja (1,64%) status nosioca nije utvrđen u ćelijama periferne krvi. Kod ovakvih roditelja pozitivan test majčinstva, odnosno očinstva ukazao je na mutaciju nastalu *de novo* (delecija jedne kopije gena *SMNI* i konverzija druge kopije) ili na germinativni mozaicizam.

4.1.2. Hromozomski rearanžmani i genetička struktura telomernog dela 5q13.2

Genetička struktura telomernog dela regiona 5q13.2 i priroda hromozomskih rearanžmana u njemu utvrđena je kod svih ispitivanih osoba na osnovu broja kopija gena dobijenog metodom MLPA (Slika 4.1; Prilog 3). Kod 66 od 99 SMA bolesnika rekonstrukcija događaja u regionu 5q13.2 izvršena je pomoću porodične segregacione analize zahvaljujući dostupnim uzorcima roditelja. Od preostala 33 bolesnika, za koje uzorci roditelja nisu bili dostupni, 13 je bilo sa tipom II, a 20 sa tipom III. Iako kod ovih bolesnika porodična segregaciona analiza nije bila moguća, rekonstrukcija regiona 5q13.2 izvršena je nedvosmisleno budući da su se ovi bolesnici odlikovali jedino povećanim brojem kopija gena *SMN2* (tj. trima ili četirma kopijama), dok je za druge gene u ovom regionu utvrđen normalan broj kopija, što je ukazalo na to da oni nisu bili zahvaćeni rearanžmanima. Iz ovoga sledi da je jedini uočeni rearanžman kod ovih bolesnika bila konverzija jedne ili obeju kopija gena *SMN1* u gen *SMN2*.



Slika 4.1. Rekonstrukcija hromozomskih rearanžmana i genetičke strukture u telomernom delu regiona 5q13.2 metodom MLPA i porodičnom segregacionom analizom. U gornjem delu slike prikazan je rezultat analize iz softvera Coffalyser.Net, dok je u donjem delu slike prikazano porodično stablo (proband i oba roditelja) sa uočenim hromozomskim rearanžmanima. Proband WH629 sadržao je četiri kopije gena *SMN2*. Analiza MLPA kod roditelja, WH632 i WH633, ukazala je da su dodatne kopije gena *SMN2* kod probanda WH629 nastale genskom konverzijom *SMN1* u *SMN2*.

Nakon završene rekonstrukcije genetičke strukture telomernog dela regiona 5q13.2, u ukupno 442 analizirana hromozoma uočeno je dvadeset različitih alela (Slika 4.2). Trinaest alela asociranih sa bolešću, prisutnih kako kod bolesnika, tako i kod njihovih roditelja, svrstano je u 6 tipova označenih slovima A-F. Grupisanje u tipove izvršeno je u zavisnosti od veličine rearanžmana procenjene na osnovu zahvaćenosti gena *SERF1A* i *NAIP*. U tipovima A-D gen *SMN1* bio je u celosti odsutan, dok je njegovo odsustvo u tipovima E i F bilo delimično. Unutar svakog alela (tipa) napravljena je dalja podela na osnovu toga da li je odsustvo gena *SMN1* bilo posledica delecije (podtip 1) ili genske konverzije (podtip 2). Dva najčešće asocirana alela sa bolešću bila su A1 sa velikom delecijom koja je zahvatila gene *SERF1A*, *SMN1* i *NAIP* (ukupno 78 hromozoma) i D2a (sa konverzijom *SMN1* u *SMN2* (ukupno 124 hromozoma). Aleli G-M uočeni su isključivo u grupi roditelja bolesnika i odlikovali su se povećanim brojem kopija gena *SMN1* ili gena *NAIP*. Duplikacije gena *NAIP* uočene su i kod ~7% hromozoma koji su nosili normalan broj kopija *SMN1*, tj. jednu kopiju.

	SMA I	SMA II	SMA III
A1	24/20	17/10	4/3
A2			1/-
B1	7/5	1/-	1/-
B2			1/1
C1	9/9	11/7	8/6
C2		3/2	
D1	2/1	6/5	4/1
D2a	4/4	30/17	50/19
D2b		1/1	6/2
E1		2/2	2/2
E2		1/1	
F1			1/1
F2		1/1	
G			-/1
H	-/2		
I	-/35	-/42	-/34
J	-/2	-/3	-/1
K	-/1		-/1
L	-/1		
M		1/1	

Slika 4.2. Dvadeset različitih alela telomernog dela regiona 5q13.2 uočenih kod 442 hromozoma dobijenih analizom 99 bolesnika sa dečijom SMA i 122 roditelja bolesnika iz populacije Srbije. Aleli su svrstani u tipove A-F prema veličini rearanžmana procenjenoj na osnovu zahvaćenosti gena *SERF1A* i *NAIP*, i podtipove u zavisnosti od toga da li je odsustvo gena *SMN1* bilo posledica delecije (podtip 1) ili genske konverzije (podtip 2). Alel E1 ($SMN1^{ex8}$) posedovao je samo egzon 8 poreklom od gena *SMN1*, dok je uzvodni deo gena bio deletiran, dok je u alelu E2 ($SMN^{C/T}$) uzvodni deo gena bio konvertovan u *SMN2*. U alelu F1 delecija je zahvatila samo egzon 7 gena *SMN1* ($SMN1^{del\ ex7}$), dok je u alelu F2 ($SMN^{T/C/T}$) samo egzon 7 bio konvertovan u *SMN2*. Aleli G-M bili su prisutni samo u grupi roditelja. Tip G posedovao je dve kopije *SMN1*, a tipovi H-L varijabilan broj kopija gena *NAIP*: 0, 1, 2, 3 i 4 kopije, redom. Alel M posedovao je dve kopije gena *SMN1* i tri kopije gena *NAIP*. Crno obojene površine označavaju deleciju odgovarajućeg gena ili njegovog dela, šrafirane površine gensku konverziju gena ili dela gena, a bele površine prisustvo gena. Broj bolesnika i broj roditelja kod kojih je odgovarajući alel uočen navedeni su sa desne strane slike i razdvojeni kosom crtom (bolesnici/roditelji). Ukoliko naznačeni alel nije uočen ni kod jednog ispitanika, korišćen je znak „-“. Slika nije verni prikaz fizičke razdaljine između gena, kao ni njihove stvarne veličine.

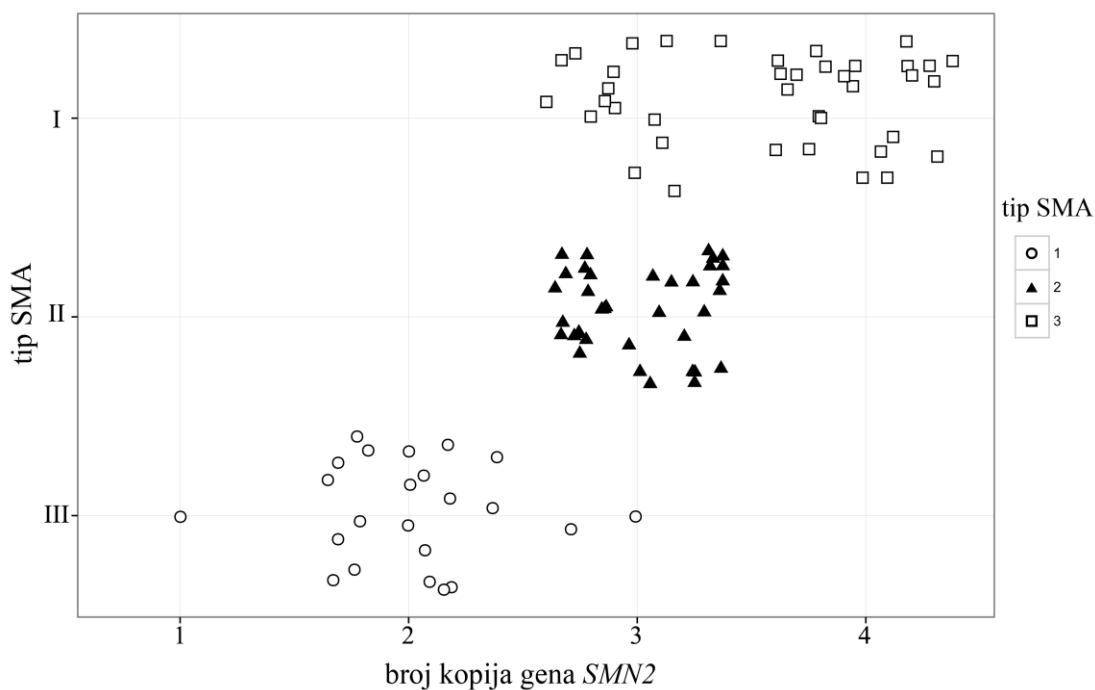
4.1.3. Korelacija broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa tipom SMA

Raspodela broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* kod tipova I, II i III SMA i korelacija uočenog broja kopija navedenih gena sa tipom SMA testirana Spirmanovim testom korelacije prikazani su u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Zastupljenost broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* među tri tipa SMA bolesnika sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1* i rezultati Spirmanovog testa korelacije.

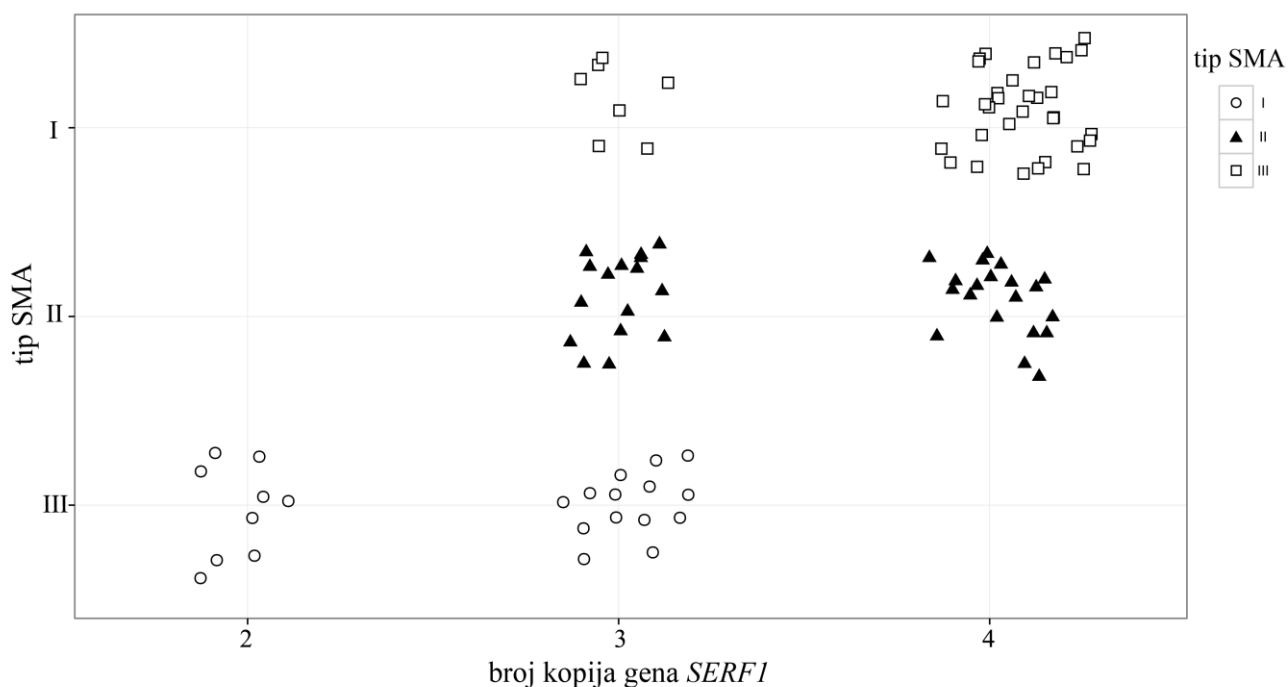
tip SMA	broj osoba	broj kopija gena									
		<i>SMN2</i>				<i>SERF1</i>			<i>NAIP</i>		
		1	2	3	4	2	3	4	0	1	2
I	23	1	20	2	0	9	14	0	10	12	1
II	37	0	0	37	0	0	18	19	3	26	8
III	39	0	0	15	24	0	7	32	1	17	21
broj osoba	99	1	20	54	24	9	39	51	14	55	30
Spirmanov test korelacije		$\rho=0,85$ $p=2,2e-16$				$\rho=0,659$ $p=1,278e-13$			$\rho=0,523$ $p=2,722e-8$		

Većina bolesnika sa tipom I, tačnije 86,96% (20/23), posedovala je dve kopije gena *SMN2*, 4,35% (1/23) posedovalo je jednu kopiju gena, dok je 8,69% (2/23) imalo tri kopije ovog gena. Svi bolesnici sa tipom II imali su tri kopije *SMN2*. Među pacijentima sa tipom III, 38,46% (15/39) imalo je tri kopije gena *SMN2*, a 61,54% (24/39) četiri kopije. Navedeni rezultati prikazani su na Slici 4.3. Između broja kopija gena *SMN2* i tipa dečije SMA uočena je statistički značajna obrnuto srazmerna korelacija (Spirmanov test korelacije, $\rho=0,85$, $p=2,2e-16$) (Tabela 4.1).



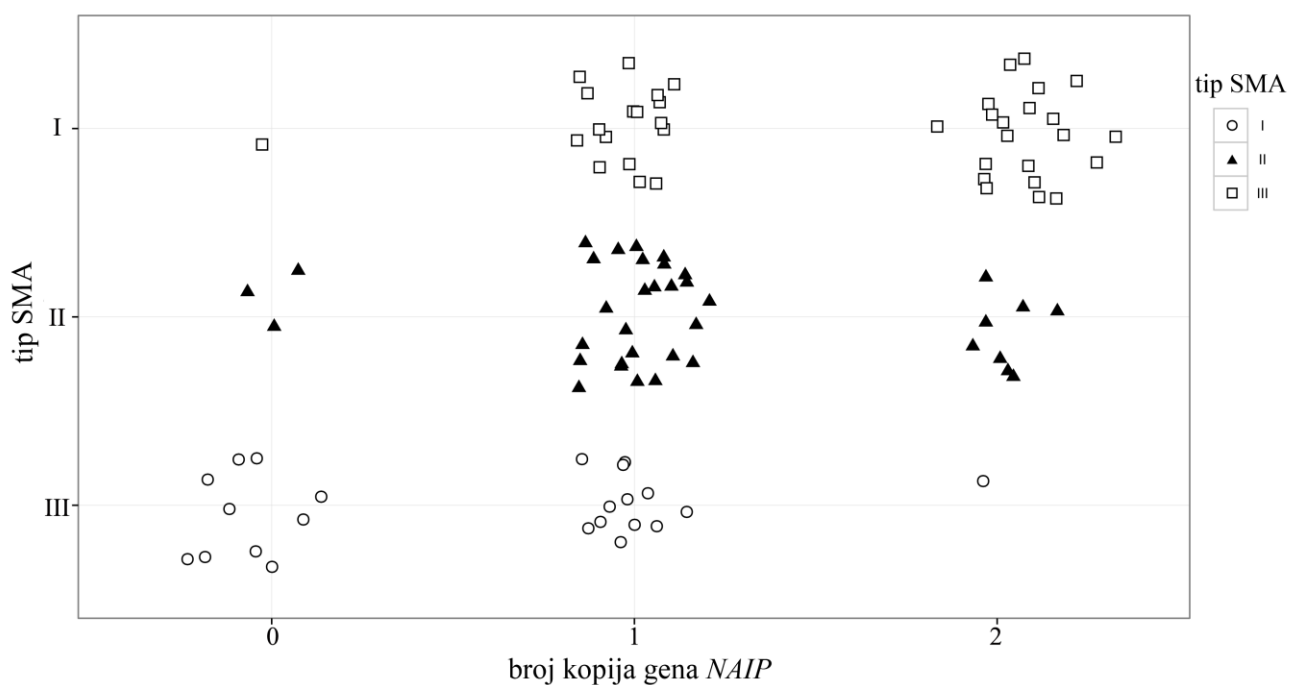
Slika 4.3. Raspodela broja kopija gena *SMN2* među tri tipa SMA bolesnika sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1*.

Među bolesnicima sa tipom I, 39,13% (9/23) posedovalo je homozigotnu deleciju gena *SERF1A*, dok kod bolesnika sa tipom II i III ovakav genotip nije uočen. Dodatno, nijedan pacijent sa tipom I nije posedovao sve četiri kopije gena *SERF1*. Raspodela broja kopija gena *SERF1* prema tipu SMA prikazana je na Slici 4.4. Statistički značajna korelacija uočena je i između broja kopija gena *SERF1* i tipa bolesti ($p=0,626$, $p=4,264e-10$) (Tabela 4.1).



Slika 4.4. Raspodela broja kopija gena *SERF1* među tri tipa SMA bolesnika sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1*.

Homozigotna delecija gena *NAIP* bila je prisutna kod 43,48% (10/23) pacijenata sa tipom I, 8,11% (3/37) pacijenata sa tipom II i 2,56% (1/39) pacijenata sa tipom III. Dodatno, samo je 4,35% (1/23) pacijenata sa tipom I posedovalo obe telomerne kopije *NAIP*, dok je učestalost takvog genotipa među bolesnicima sa tipom II i III iznosila 21,62% (8/37) i 53,85% (21/39), redom. Raspodela broja kopija *NAIP* prema tipu SMA prikazana je na Slici 4.5. Obrnuto srazmerna statistički značajna korelacija uočena je između broja telomernih kopija gena *NAIP* i tipa SMA ($\rho=0.523$, $p=2.722e-8$) (Tabela 4.1).



Slika 4.5. Raspodela broja telomernih kopija gena *NAIP* među tri tipa SMA bolesnika sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1*.

4.1.4. Obrasci kombinovanog odsustva gena *SERF1A*/*SMN1*/*NAIP* i broj kopija *SMN2*

Na osnovu obrasca delecije gena *SERF1A* i *NAIP*, bolesnici sa homozigotnom odsustvom *SMN1* podeljeni su u četiri grupe (Tabela 4.2). Homozigotna delecija *SERF1A* i/ili *NAIP* bila je prisutna isključivo kod bolesnika sa tipom I, gde su se u ovakvim hromozomskim parovima uglavnom nalazile dve kopije gena *SMN2*, osim kod jednog bolesnika gde je bila prisutna samo jedna kopija *SMN2* (uokvireno isprekidanom linijom u Tabeli 4.2). Kombinacija od najmanje jedne kopije gena *SERF1A* i bar jedne kopije gena *NAIP* bila je prisutna kod bolesnika sa svim trima tipovima bolesti, ali, za razliku od prethodno pomenutih dvaju obrazaca, ovaj je bio prisutan kod gotovo svih bolesnika sa tipom II i III, a mnogo ređe među bolesnicima sa tipom I (uokvireno punom linijom u Tabeli 4.2). Dodatna odlika ovog obrasca bio je povećan broj kopija gena *SMN2*.

Tabela 4.2. Zastupljenost četiri obrasca kombinovanog odsustva gena *SERF1A*/*SMN1*/*NAIP* kod tri tipa SMA bolesnika sa prikazanim brojem kopija gena *SMN2*.

telomerni region 5q13.2			broj SMA bolesnika (broj kopija <i>SMN2</i>)		
<i>SERF1A</i>	<i>SMN1</i>	<i>NAIP</i>	tip I	tip II	tip III
-	-	-	5/23 (1-2)	0	0
-	-	+	4/23 (2)	0	0
+	-	-	6/23 (2)	2/37 (3)	1/39 (3)
+	-	+	8/23 (2-3)	35/37 (3)	38/39 (3-4)

„-“ – homozigotno odsustvo naznačenog gena

„+“ – prisustvo bar jedne kopije naznačenog gena

uokvireno isprekidanom linijom – homozigotna delecija gena *SERF1A* i/ili *NAIP*

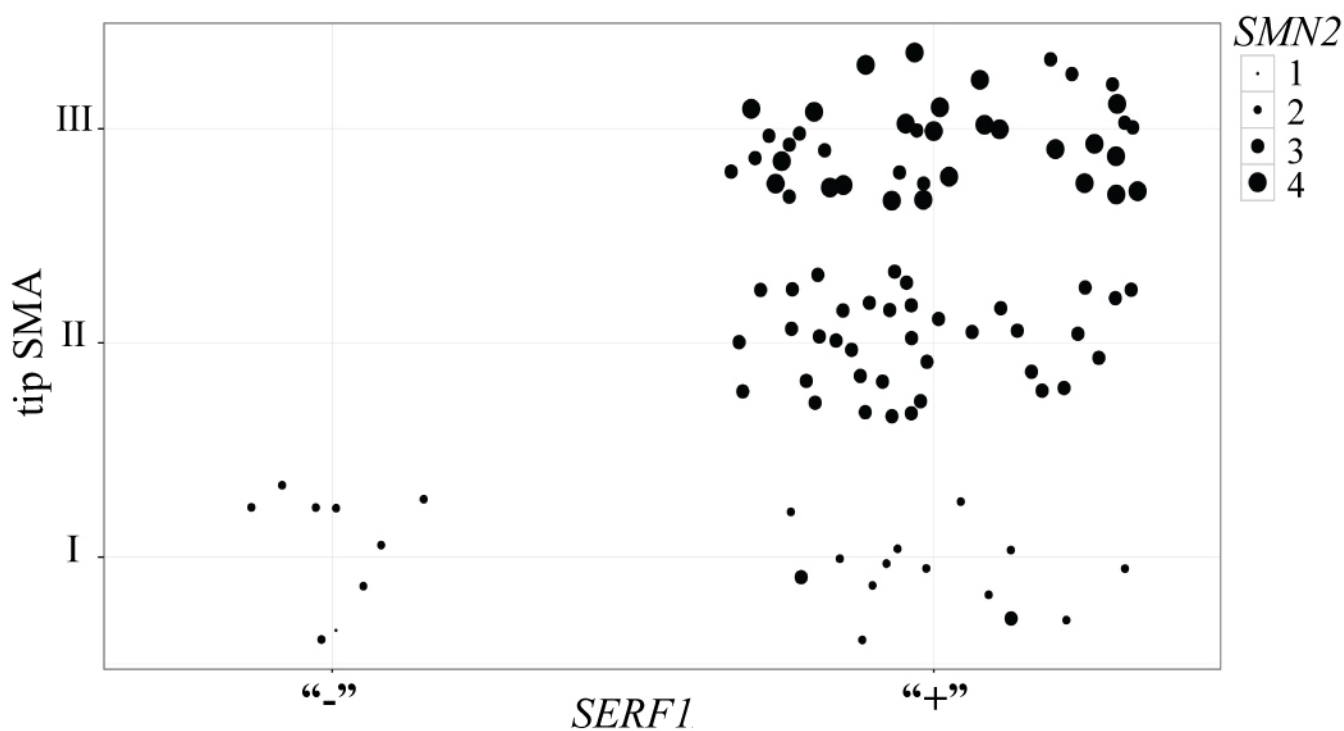
uokvirenom punom linijom – prisustvo bar jedne kopije gena *SERF1A* i bar jedne kopije gena *NAIP*

Imajući u vidu statistički značajnu obrnuto srazmernu korelaciju pojedinačnog broja kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa tipom SMA, ispitan je udruženi efekat broja kopija svih navedenih gena na fenotipsku varijabilnost SMA korišćenjem generalizovanog linearnog modela. Najbolji minimalni model koji objašnjava fenotipsku varijabilnost dečije SMA sadržao je kao prediktorske promenljive broj kopija gena *SMN2* ($p < 2e-16$) i *SERF1* ($p < 2e-16$), kao i interakciju ovih dvaju gena *SMN2*SERF1* ($p = 0.02628$) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Najbolji minimalni model koji objašnjava fenotipsku varijabilnost dečije SMA

Najbolji minimalni model: tip SMA \sim <i>SMN2</i> + <i>SERF1</i> + <i>SMN2*SERF1</i>	
<i>prediktorska promenljiva</i>	<i>p-vrednost</i>
<i>SMN2</i>	$p < 2e-16$
<i>SERF1</i>	$p < 2e-16$
<i>SMN2*SERF1</i>	$p = 0.02628$

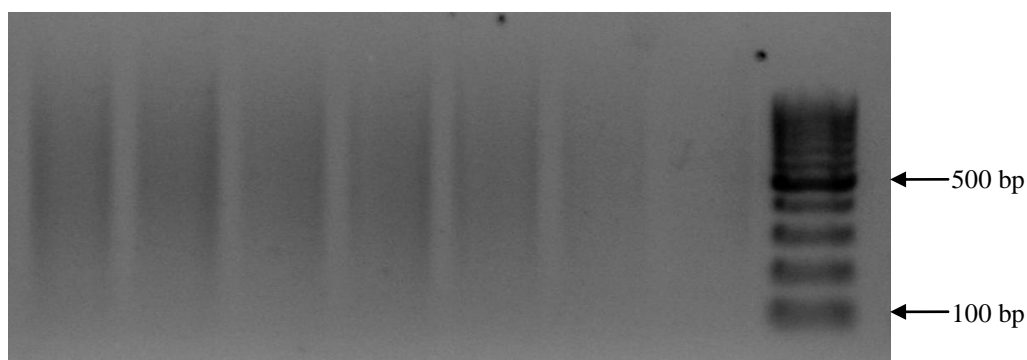
Sa Slike 4.6 vidi se da su bolesnici sa tipom I bili jedini koji su imali homozigotnu deleciju gena *SERF1* koja je bila praćena prisustvom dveju i kod jednog bolesnika prisustvom jedne kopije gena *SMN2*. Bolesnici sa tipovima II i III posedovali su bar jednu kopiju gena *SERF1*, dok se broj kopija *SMN2* povećavao sve do četiri kopije prisutne kod bolesnika sa tipom III.



Slika 4.6. Udruženi efekat broja kopija gena *SMN2* i *SERF1* na tip dečije SMA. „-“ – homozigotno odsustvo gena *SERF1*; „+“ – prisustvo bar jedne kopije gena *SERF1*.

4.1.5. Bisulfitna konverzija DNK

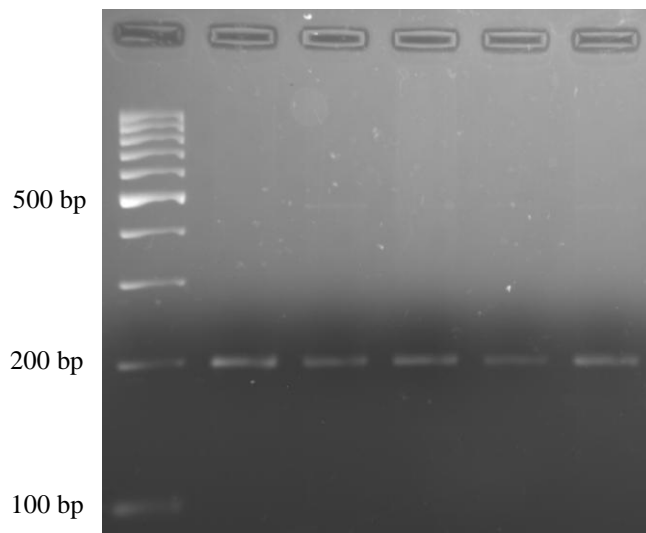
Nakon bisulfitne konverzije lanci DNK više nisu međusobno komplementarni, značajno su fragmentisani, i kao jednolančani ne vezuju EtBr efikasno kao dvolančana DNK. Nakon elektroforeze i hlađenja agaroznog gela na 4°C dolazi do dovoljnog baznog sparivanja, što omogućuje interkaliranje EtBr i vizuelizaciju jednolančanih fragmenata DNK u vidu razmaza (slika 4.7). To ukazuje na uspešnu bisulfitnu konverziju DNK.



Slika 4.7. Rezultati provere uspešnosti bisulfitne konverzije DNK u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0,5 µg/ml) i ohlađenom na 4°C. Sa leva na desno naliveni su uzorci DNK korišćeni za optimizaciju procesa bisulfitne konverzije. U poslednji bunar naliven je standard za dužinu fragmenata GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific, SAD*).

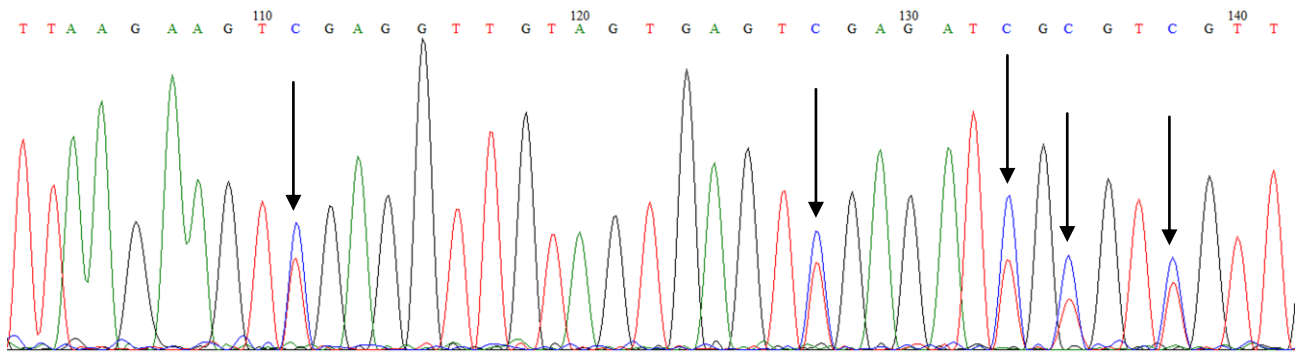
4.1.6. Provera uspešnosti PCR-a izvedenog iz bisulfitno konvertovane DNK

Na Slici 4.8. predstavljen je rezultat provere uspešnosti PCR-a za umnožavanje fragmenta DNK dužine 200 bp iz bisulfitno konvertovane DNK. Diskretna traka na agaroznom gelu potvrdila je specifičnost dizajniranih prajmera HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R.



Slika 4.8. Rezultati provere uspešnosti proizvoda PCR-a korišćenjem prajmera HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R. U prvi bunar naliven je standard za dužinu fragmenata GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific*, SAD). U ostalim bunarima agaroznog gela vidi se specifičan proizvod dužine 200 bp.

Nekolicina proizvoda PCR-a dobijena na ovaj način direktno je sekvencirana. Na Slici 4.9. predstavljena je sekvenca koja je na mestu svakog dinukleotida CpG obuhvaćenog parom prajmera posedovala preklopljene signale C/T. Ovakva sekvenca ukazivala je na heterogenu metilaciju ispitivanog dela promotora *SMN2*.



Slika 4.9. Deo sekvence dobijen direktnim sekvenciranjem regiona CG2 gena *SMN2* korišćenjem prajmera HRM_ *SMN2*_F i HRM_ *SMN2*_R. Preklapljeni signali C/T na poziciji svakog dinukleotida CpG obuhvaćenog prajmerima označeni su crnim strelicama. Visina signala ne odgovara stvarnoj proporciji metilovanih i nemetilovanih fragmenata, te se ne može koristiti za određivanje stepena metilacije na naznačenim pozicijama.

4.1.7. Analiza stepena metilacije regiona CG2 gena *SMN2* metodom HRM

Analiza stepena metilacije dela promotorskog regiona gena *SMN2* označenog kao CG2 metodom HRM obuhvatila je 25 bolesnika klasifikovanih u sva tri tipa SMA. Raspodela bolesnika po tipovima i broj kopija *SMN2* koje su posedovali prikazani su u Tabeli 4.4.

Dobijene krive topljenja bile su složene i odlikovale su se sa dvama signalima na različitim temperaturama topljenja. Jedini izuzetak je bio uzorak bolesnika WH870. Levi signal je imao nižu temperaturu topljenja i mogao bi odgovarati manje metilovanim fragmentima. Alternativno, on može biti posledica heterodupleksa u slučaju da su analizirane heterogeno metilovane sekvence u smislu postojanja različitih epialela u uzorku. Naime, heterodupleksi se tope na nižim temperaturama usled veće nestabilnosti uzrokovane prisustvom sekvenci koje nisu apsolutno komplementarne. Desni signal odgovarao bi frakciji sa većim stepenom metilacije, koja se usled svog baznog sastava (veći broj nukleotida C u odnosu na nemetilovane sekvence) odlikovala višom temperaturom topljenja (Slika 4.7). Levi i desni signal bili su različitih visina, što je posledica razlika u jačini fluorescentnog signala, a oslikava odnos broja manje i više metilovanih fragmenata u

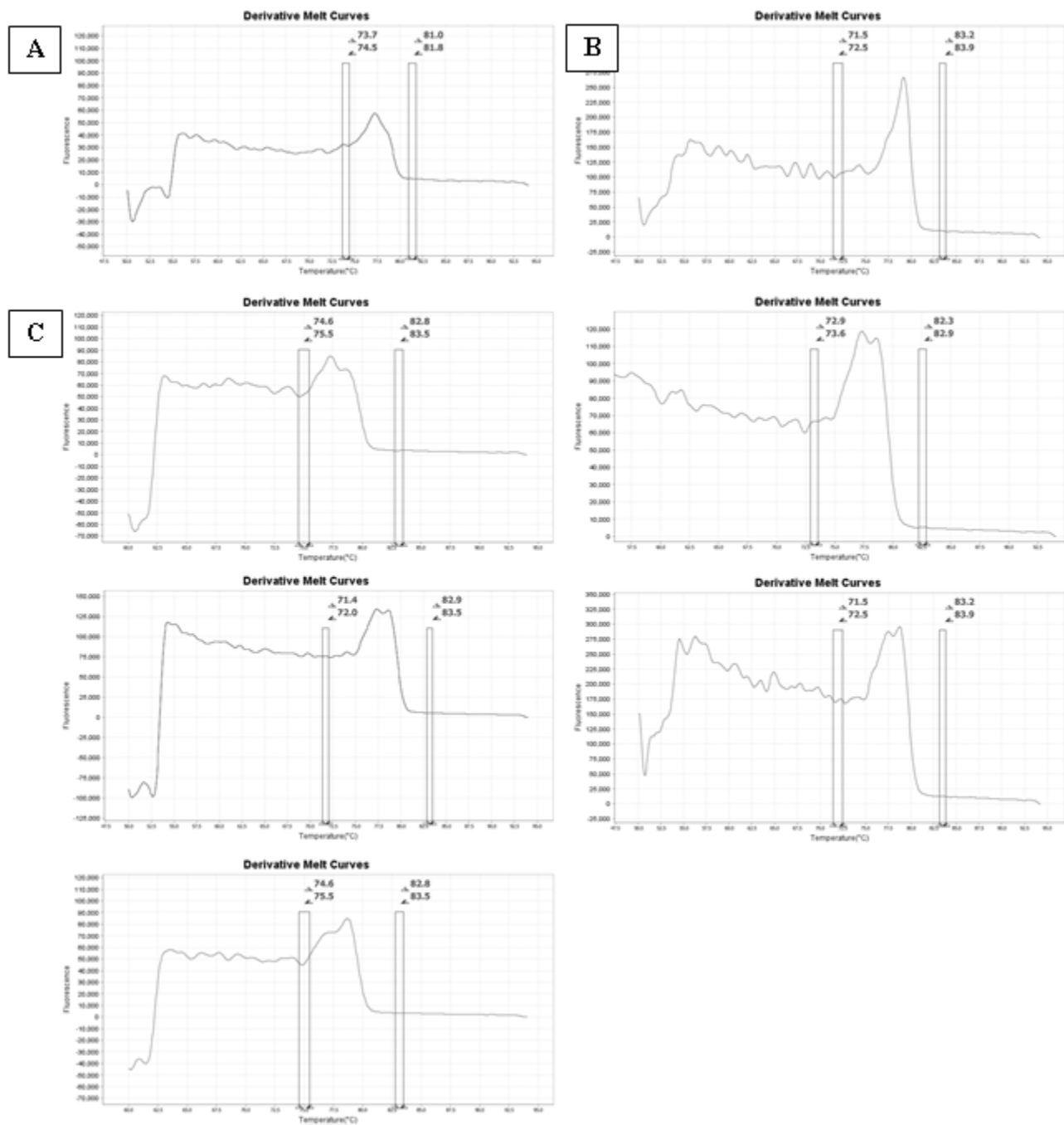
uzorku. U Tabeli 4.4 prikazane su eksperimentalno dobijene temperature topljenja. Tamo gde je navedena samo jedna temperatura topljenja bio je prisutan samo jedan signal, što ukazuje na smanjenu heterogenost metilacije u datom uzorku.

Dobijene krive topljenja bile su reproducibilne unutar pojedinačnih uzoraka DNK, ali usled velikog odstupanja njihovog oblika u odnosu na oblik krivih topljenja korišćenih kontrolnih DNK poznatog stepena metilacije nije bilo moguće kvantifikovati stepen metilacije ispitivanih fragmenata. Iz tog razloga dobijeni profili su podesni uglavnom za opisno (kvalitativno) tumačenje. Tako je kod 25 analiziranih bolesnika uočeno najmanje 5 različitih profila složenih krivih topljenja (Slika 4.10) bez pravilnosti u njihovoj zastupljenosti po tipovima SMA. Dobijene krive topljenja ukazale su ne samo na prisusvo heterogene metilacije u odnosu na svaku moguću poziciju metilovanja, već i na verovatno prisustvo heterogene metilacije u smislu postojanja većeg broja epialela u jednom uzorku.

Tabela 4.4. Eksperimentalno određene temperature topljenja (T_{m1} i T_{m2}) u složenim krivama topljenja dobijenim analizom regiona CG2 gena *SMN2* metodom HRM kod 25 SMA bolesnika. U tabeli su prikazani i tip SMA i broj kopija *SMN2* za svakog analiziranog bolesnika.

Laboratorijska oznaka uzorka	T_{m1}	T_{m2}	tip SMA	broj kopija <i>SMN2</i>
WH875	77.5	78.9	I	2
WH962	77.4	78.9	I	2
WH804	77.3	78.6	I	2
WH723	77.7	78.9	I	2
WH924	77.4	78.8	II	3
WH909	77.1	78.7	II	3
WH931	77.3	78.6	II	3
WH841	77.3	78.6	II	3
WH799	77.2	78.7	II	3
WH785	77.5	78.7	II	3
WH773	77.2	78.4	II	3
WH721	77.2	78.5	II	3
WH720	77.3	78.6	II	3
WH731	77.6	78.9	II	3
WH892	77.2	78.5	III	3
WH870	77.2	-	III	3
WH774	77.2	78.5	III	3
WH760	77.2	78.5	III	3
WH739	77.2	78.5	III	3
WH713	77.4	78.6	III	3
WH693	77.3	78.5	III	4
WH742	77.7	78.9	III	4
WH918	77.4	78.8	III	4
WH955	77.1	-	III	4
WH891	77.5	78.7	III	4

T_{m1} – temperatura topljenja levog signala nakon analize HRM; T_{m2} - temperatura topljenja desnog signala nakon analize HRM; „-“ – odsustvo signala.

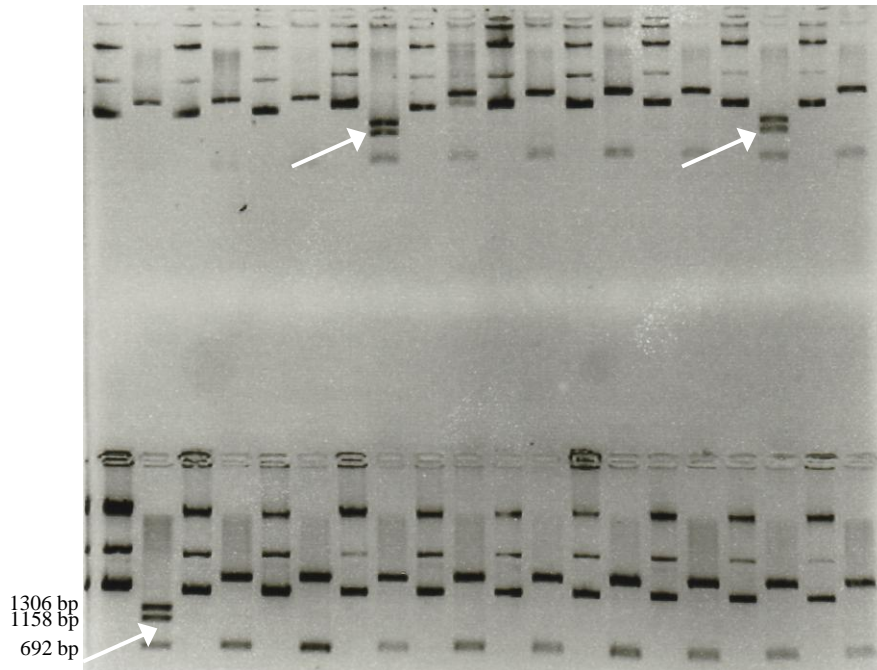


Slika 4.10. Krive topljenja regiona CG2 promotora gena *SMN2* dobijene metodom HRM. Krive topljenja kontrolnih DNK: potpuno nemetilovane (A) i potpuno metilovane (B). Pet uočenih obrazaca krivih topljenja kod 25 analiziranih SMA bolesnika (C).

4.1.8. Analiza obrasca metilacije regiona CG2 gena *SMN2* metodom sekvenciranja pojedinačnih klonova

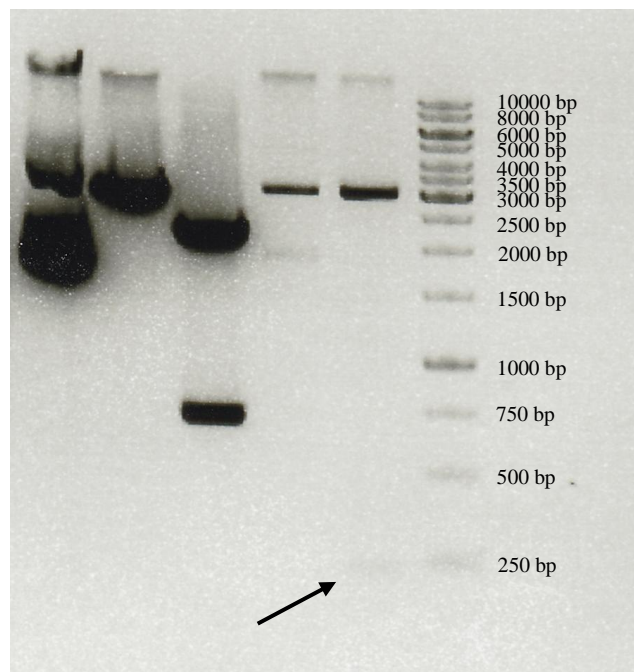
Identifikacija pojedinačnih metilovanih alela (epialela) izvršena je molekularnim kloniranjem i Sangerovim sekvenciranjem pojedinačnih klonova kod dva bolesnika. Bolesnici su odabrani tako da predstavljaju dve krajnosti na kontinuumu fenotipa dečije SMA, tj. analizirani su uzorci jednog bolesnika sa SMA tipom I i jednog sa SMA tipom III, jer su se prema literaturnim podacima između ovih dvaju tipova očekivale najizraženije razlike u stepenu metilacije promotorskog regiona *SMN2* (Hauke et al. 2009; Cao et al. 2016).

Na osnovu obrasca traka dobijenih elektroforetskim razdvajanjem proizvoda digestije restrikcijom enzimom *DraI* odabrani su klonovi koji će biti analizirani Sangerovim sekvenciranjem. Na Slici 4.11 prikazani su rezultati digestije izolovanih rekombinantnih molekula korišćenjem restrikcijom enzima *DraI*.



Slika 4.11. Analiza izolovanih rekombinantnih molekula DNK nakon restriktione digestije enzimom *DraI* u 1% agarozonm gelu. S leva na desno nalivani su izolovani rekombinantni molekuli DNK, i to naizmenično nedigerirani i digerirani izolati. Ukoliko je u rekombinantnom molekulu DNK prisutan insert nastao umnožavanjem pomoću prajmera HRM_SMN2_F i HRM_SMN2_R, obrazac traka dobijen restriktinom digestijom sa *DraI* je 19 bp, 692 bp, 1158 bp i 1306 bp. Ovakvi bunari označeni su belim strelicama. U njima se ne vidi najkraći fragment dužine 19 bp.

Dodatni korak provere specifičnosti inserta sproveden je digestijom rekombinantnih molekula DNK restrikcionim enzimom *Bam*HI i analizom u 1% agaroznom gelu (Slika 4.12).



Slika 4.12. Analiza izolovanih rekombinantnih molekula DNK nakon digestije restrikcionim enzimom *Bam*HI u 1% agaroznom gelu. Redosled nalivenih uzoraka s leva na desno je sledeći: vektor pBluescriptT/A, vektor pBluescriptT/A digeriran restrikcionim enzimom *Bam*HI, vektor pBluescriptT/A digeriran restrikcionim enzimom *Dra*I, negativan klon digeriran restrikcionim enzimom *Dra*I, pozitivan klon odabran na osnovu rezultata restrikcione digestije sa *Dra*I digeriran restrikcionim enzimom *Bam*HI. Restrikcionom digestijom sa *Bam*HI dobijaju se fragmenti dužina 217 bp i 2958 bp. Crnom strelicom označen je fragment dužine 217 bp. Kao standard za dužinu korišćen je GeneRuler 1 kb DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific, SAD*).

Sangerovim sekvenciranjem najmanje 10 nasumično izabranih pozitivnih klonova za dva analizirana SMA bolesnika neposredno je proverena specifičnost inserta i određen je obrazac metilacije dobijenih epialela. Uočeni epialeli i njihovi obrasci metilacije predstavljeni su na Slici 4.13 (bolesnik sa SMA tipom III) i Slici 4.14 (bolesnik sa SMA tipom I).

				-296	-290							broj detektovanih klonova
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	□	□	□	■	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	■	1

Slika 4.13. Epialeli uočeni molekularnim kloniranjem i Sangerovim sekvenciranjem pozitivnih klonova kod jednog bolesnikasa SMA tipom III. Sivi kvadrati predstavljaju nemetilovane dinukleotide CpG, crni kvadrati metilovane dinukleotide CpG. Označeni su dinukleotidi na pozicijama -296 bp i -290 bp (u odnosu na start kodon ATG). fw – uzvodni prajmer; rev – nizvodni prajmer.

	fw	CG	CG	-296 CG	-290 CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	broj detektovanih klonova
	■	■	□	■	□	■	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	■	■	■	■	□	□	□	□	■	9
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	4
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	□	□	■	□	□	□	□	■	2
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	□	■	■	■	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	■	4
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	□	■	■	■	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	4
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	3
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	□	□	□	■	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	■	□	■	□	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	■	■	□	□	□	□	□	□	■	2
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	■	□	■	□	□	□	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	□	■	■	■	■	□	■	□	□	■	1
	fw	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	rev	
	■	■	□	■	■	□	□	□	□	□	■	1

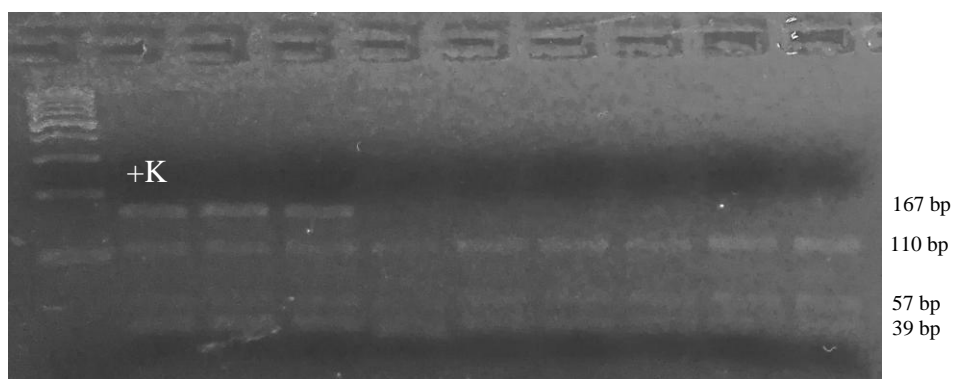
Slika 4.14. Epialeli uočeni molekularnim kloniranjem i Sangerovim sekvenciranjem pozitivnih klonova kod jednog bolesnika sa SMA tipom I. Sivi kvadrati predstavljaju nemetilovane citozine u okviru dinukleotida CpG, crni kvadrati metilovane citozine u okviru dinukleotida CpG. Označeni su citozini na pozicijama -296 bp i -290 bp (u odnosu na start kodon ATG). fw – uzvodni prajmer; rev – nizvodni prajmer.

Obrasci metilacije u identifikovanim epialelima ukazuju na heterogenu metilaciju ispitivanog dela promotorskog regiona gena *SMN2*. Kvalitativnim upoređivanjem epialela između bolesnika sa SMA tipom I i SMA tipom III nije uočena razlika u obrascima metilacije. Bolesnik sa SMA tipom I posedovao je, između ostalih, i epialele koji su bili potpuno nemetilovani na svim ili većini obuhvaćenih dinukleotida CpG, kao što je bolesnik sa SMA tipom III imao epialele u kojima je većina obuhvaćenih dinukleotida CpG bila metilovana. Međutim, može se primetiti da je najnižvodniji dinukleotid CpG bio nemetilovani čak i u onim epialelima koji su imali metilovan veći broj dinukleotida CpG. Potpuno metilovani epialeli nisu uočeni ni kod bolesnika sa SMA tipom I ni kod bolesnika sa SMA tipom III.

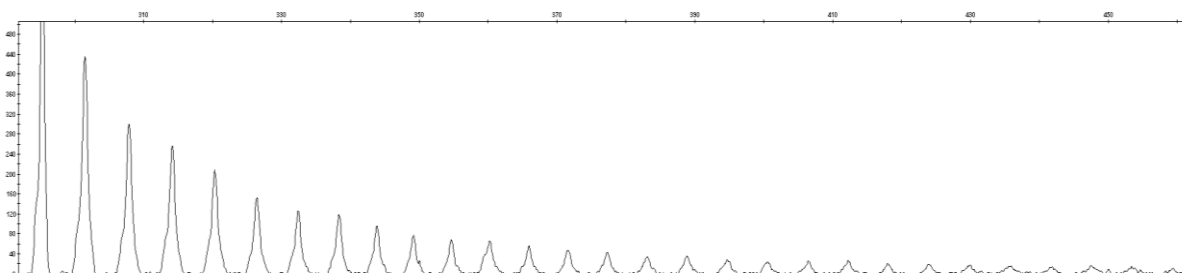
4.2. Amiotrofična lateralna skleroza

4.2.1. Učestalost mutacija u genima *SOD1* i *C9orf72* kod bolesnika sa sporadičnom amiotrofičnom lateralnom sklerozom iz Srbije

U grupi od 153 bolesnika sa SALS, kod ukupno 10 bolesnika (6,54%) identifikovana je mutacija p.Leu145Phe u genu *SOD1* (Slika 4.15), dok je kod 9 bolesnika identifikovana ekspanzija ponovljenog motiva GGGGCC u genu *C9orf72* (Slika 4.16).



Slika 4.15. Detekcija mutacije p.Leu145Phe u genu *SOD1* restrikcionom digestijom pomoću enzima *Cvi*I1. Fragmenti dužine 167, 110, 57 i 39 bp ukazuju na prisustvo mutacije u heterozigotnom stanju, dok fragmenti dužine 110, 57 i 39 bp ukazuju na odsustvo mutacije. +K – pozitivna kontrola (osoba sa mutacijom u heterozigotnom stanju identifikovana Sangerovim sekvenciranjem). Kao standard za dužinu fragmenata korišćen je GeneRuler 100 bp DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific*, SAD).



Slika 4.16. Detekcija mutacije tipa ekspanzije ponovljenog motiva GGGGCC u genu *C9orf72* metodom RP-PCR. Karakterističan signal u vidu pikova opadajućeg intenziteta na razdaljini od 6 bp nakon kapilarne elektroforeze ukazuje na prisustvo mutacije.

4.2.2. Asocijacija broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* sa rizikom za pojavu sporadične amiotrofične lateralne skleroze kod bolesnika iz Srbije

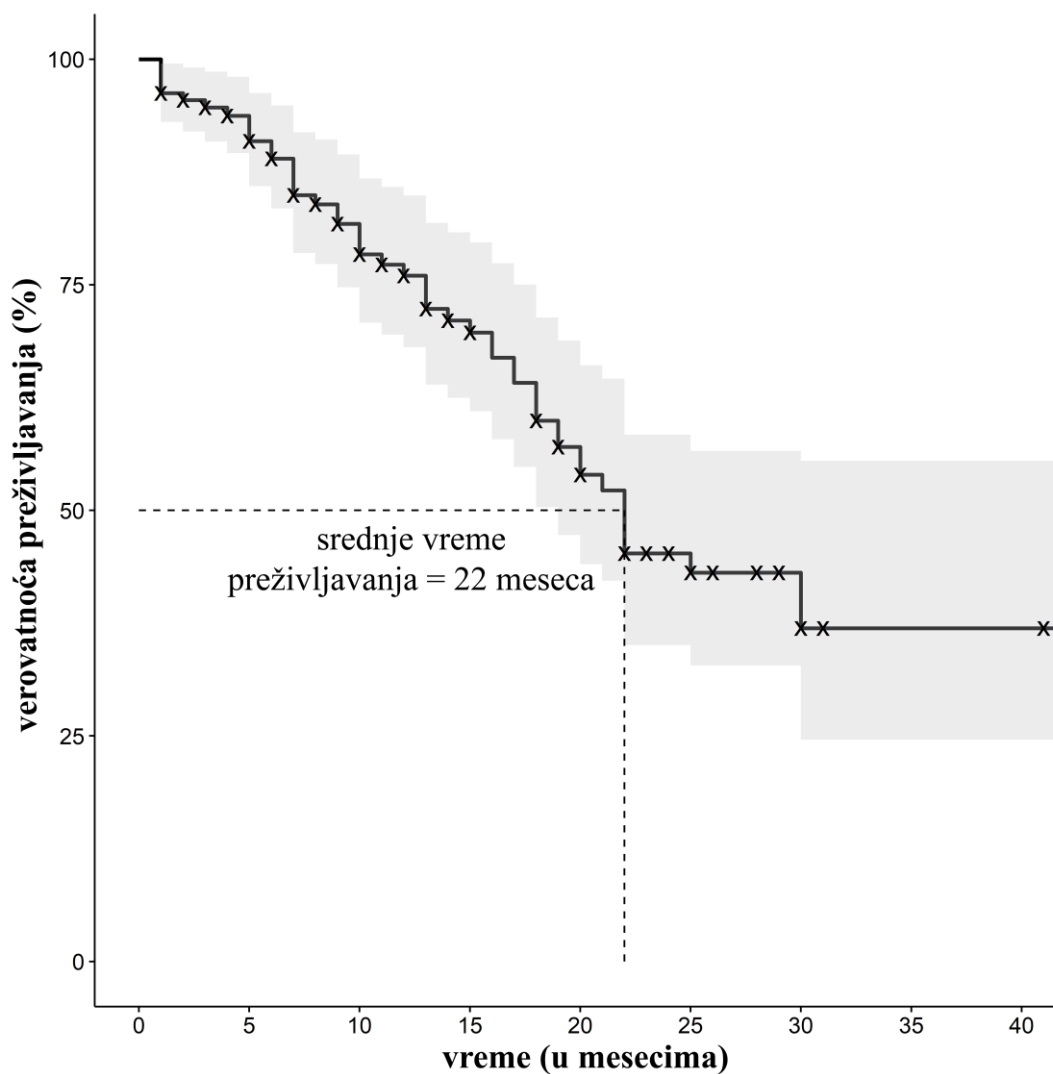
Fišerov test tačne verovatnoće nije pokazao postojanje statistički značajne asocijacije između broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* i rizika za pojavu SALS u analiziranoj grupi bolesnika iz populacije Srbije (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Raspodela broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* kod bolesnika sa SALS iz Srbije (n=153) i kontrolnih uzoraka (n=153).

gen	broj kopija	bolesnici	kontrole	p-vrednost*
<i>SMN1</i>	1	6	9	0.650
	2	134	134	
	3	13	10	
<i>SMN2</i>	0	6	10	0.369
	1	62	54	
	2	82	82	
	3	3	7	
<i>SERF1</i>	2	3	3	0.257
	3	18	30	
	4	127	114	
	5	5	6	
<i>NAIP</i>	1	11	12	0.908
	2	119	115	
	3	20	20	
	4	3	5	
	5	0	1	

4.2.3. Kaplan-Majerova kriva kumulativne verovatnoće preživljavanja

Srednje vreme preživljavanja, izračunato na uzorku od ukupno 153 bolesnika, od čega 54 umrlih, iznosilo je 22 meseca (Slika 4.17).



Slika 4.17. Kaplan-Majerova kriva kumulativne verovatnoće preživljavanja od trenutka postavljanja dijagnoze za ispitivane bolesnike sa SALS iz Srbije (n=153). Cenzurisani bolesnici predstavljeni su oznakom „x“, a interval poverenja od 95% označen je zasenčenom površinom.

4.2.4. Log-rank poređenje preživljavanja

Log-rank test je pokazao postojanje statistički značajnih razlika među krivama preživljavanja između podgrupa nekoliko kliničkih promenljivih (Tabela 4.6). Preživljavanje je bilo značajno kraće u sledećim podgrupama: kod starijih bolesnika (>60 godina, $p=1,7e-02$), bolesnika sa manjim zbirom skale ALSFRS-R (≤ 39 , $p=5e-05$) i nižim FVC ($\leq 90\%$, $p=7,1e-07$) u trenutku dijagnoze, manjim zbirom MMSE (< 24 , $p=4,3e-04$), kraćim dijagnostičkim kašnjenjem (< 11 meseci, $p=2,7e-02$) i u podgrupi u kojoj su oba motorna neurona bila zahvaćena bolešću ($p=2,6e-02$). Uprkos činjenici da se krive preživljavanja bolesnika sa različitim brojem kopija gena *SMN1* nisu statistički značajno razlikovale ($p=0.242$), njihova srednja vremena preživljavanja bila su drugačija: kriva preživljavanja bolesnika sa jednom kopijom *SMN1* nije ni dostigla srednje vreme preživljavanja od 50%, dok je srednje vreme preživljavanja bolesnika sa dvema kopijama *SMN1* iznosilo 22 meseca, a onih sa trima kopijama *SMN1* 19 meseci.

Tabela 4.6. Statistički značajni rezultati log-rank testa dobijeni poređenjem preživljavanja između podgrupa kliničkih promenljivih na analiziranom uzorku bolesnika sa SALS iz Srbije.

<i>Klinička promenljiva (podgrupa sa kraćim preživljavanjem)</i>	<i>p-vrednost</i>
vreme početka bolesti (>60 godina)	1,7e-02
ALSFRS-R (≤ 39)	5e-05
FVC ($\leq 90\%$)	7,1e-07
MMSE (< 24)	4,3e-04
dijagnostičko kašnjenje (< 11 meseci)	2,7e-02
tip motoneurona zahvaćen bolešću (gornji i donji)	2,6e-02

4.2.5. Univarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja

Univarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja pokazala je da statistički značajan zaštitni efekat na preživljavanje ostvaruju sledeće kliničke promenljive: zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze (odnos rizika [HR]=0.939, 95% IP 0.910-0.968, $p=1.415e-04$), FVC u trenutku dijagnoze (HR=0.975, 95% IP 0.964-0.987, $p=8.799e-05$) i dijagnostičko kašnjenje (HR=0.955, 95% IP 0.921-0.990, $p=3.025e-03$). Statistički značajan rizičan faktor za preživljavanje pokazala je promena zbira ALSFRS-R kroz vreme (Δ ALSFRS: HR=2.253, 95% IP 1.713-2.964, $p=4.886e-07$). Za uticaj broja kopija *SMN1* na preživljavanje uočen je statistički trend (HR=1.811, 95% IP 0.910-3.607, $p=0.091$). P-vrednosti koje su ostale statistički značajne nakon Bonferonijeve korekcije za 16 kliničkih promenljivih ($0,05/16=3,1e-03$) predstavljene su podebljanim slovima u Tabeli 4.7. Na osnovu koeficijenta determinacije R^2 , koji pokazuje koliki je procenat varijabilnosti zavisne promenljive objašnjen varijabilnošću nezavisnih promenljivih, Δ ALSFRS u najvećem stepenu objašnjava varijabilnost preživljavanja sa vrednošću od 24,3%.

Tabela 4.7. Rezultati univarijabilne Koksove regresione analize preživljavanja izvršene na analiziranom uzorku bolesnika sa SALS iz Srbije.

<i>prediktorske promenljive</i>	<i>HR</i>	<i>HR 95% IP</i>	<i>R²</i>	<i>LRT</i>	<i>LRT p-vrednost</i>	<i>n</i>	<i>d</i>
<i>SMNI</i>	1.811	0.910-3.607	0.017	2.68	9.1e-02	153	54
starost na početku bolesti	1.029	1.001-1.058	0.028	4.32	3.761e-02	151	53
dijagnostičko kašnjenje	0.955	0.921-0.990	0.056	8.6	3.025e-03	149	52
ALSFRS-R	0.939	0.910-0.968	0.093	14.48	1.415e-04	149	53
Δ ALSFRS	2.253	1.713-2.964	0.243	25.31	4.886e-07	91	28
FVC	0.975	0.964-0.987	0.109	15.38	8.799e-05	133	46

HR – odnos rizika; R^2 – koeficijent determinacije; LRT – test količnika verodostojnosti; n – broj bolesnika za koje su vrednosti date promenljive bile dostupne; n – broj bolesnika za koje su vrednosti ispitivane promenljive bile dostupne, d – broj umrlih bolesnika u broju bolesnika n. Podebljanim brojevima u tabeli prikazane su p-vrednosti koje su nakon Bonferonijeve korekcije ($5.0e-02/16=3.1e-03$) ostale statistički značajne.

U cilju provere smera delovanja varijabli identifikovanih kao statistički značajnih za preživljavanje u univarijabilnoj Koksovoj regresionoj analizi, ova analiza je ponovljena prevođenjem svih kontinuiranih promenljivih u kategoričke koristeći medijanu kao graničnu vrednost, ili u slučaju FVC vrednost od 90%. Na ovaj način identifikovane su sledeće podgrupe sa zaštitinim efektom na preživljavanje: zbir skale ALSFRS-R>39 (HR=0.299, 95% IP 0.161-0.555), FVC>90% (HR=0.249, 95% IP 0.138-0.450), dijagnostičko kašnjenje>11 meseci (HR=0.541, 95% IP 0.311-0.942). Dodatno, identifikovana je i sledeća rizična podgrupa: Δ ALSFRS>0.9 (HR= 8.249, 95% IP 3.08-22.1).

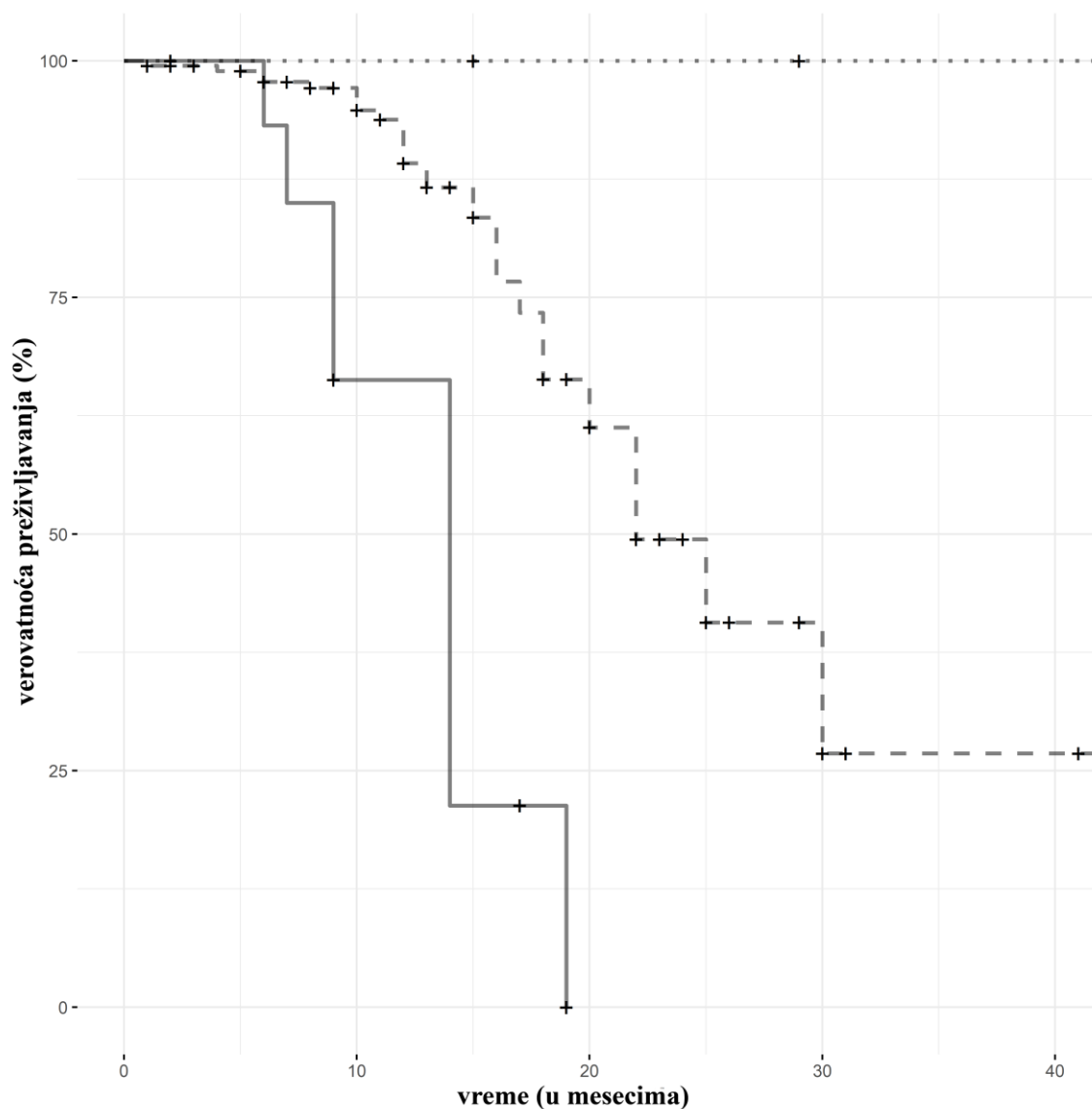
4.2.6. Multivarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja

Multivarijabilna Koksova regresiona analiza preživljavanja obuhvatila je samo one promenljive koje su se u univarijabilnoj analizi pokazale kao statistički značajne za preživljavanje (ALSFRS-R, FVC, Δ ALSFRS i dijagnostičko kašnjenje), kao i ispitivane genetičke promenljive (broj kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP*). Za ukupno 90 pacijenata uključenih u multivarijabilnu Koksovu regresionu analizu, od kojih je 28 umrlo, vrednosti svih pomenutih promenljivih bile su dostupne. Kontinuirane promenljive nisu bile dihotomizovane u podgrupe. Dobijeni Koksov regresioni model objasnio je 41,2% varijabilnosti preživljavanja i identifikovao zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze, (HR = 0.885, 95% IP 0.834-0.938), promenu zbira ALSFRS-R kroz vreme (HR = 2.193, 95% IP 1.618-2.972), dijagnostičko kašnjenje (HR = 0.939, 95% IP 0.888-0.994) i broj kopija *SMN1* (HR = 10.276, 95% IP 3.106-33.998) kao nezavisne promenljive značajne za preživljavanje. Tačnije, niži zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze, brži pad funkcionalnosti (Δ ALSFRS), kraće dijagnostičko kašnjenje i veći broj kopija gena *SMN1* rezultovali su kraćim preživljavanjem bolesnika sa SALS iz Srbije (Tabela 4.8). Verovatnoća preživljavanja bolesnika sa jednom kopijom *SMN1* iznosila je 100%, onih sa dvema kopijama *SMN1* 39,2%, a onih sa trima kopijama samo 0,03% (Slika 4.18).

Tabela 4.8. Koksov regresioni model sa statistički značajnim promenljivama za preživljavanje dobijen multivarijabilnom Koksovom regresionom analizom.

<i>prediktorske promenljive</i>	<i>HR</i>	<i>HR 95% IP</i>	<i>R² modela</i>	<i>LRT</i>	<i>LRT p-vrednost</i>	<i>n</i>	<i>d</i>
<i>ALSFRS</i>	0.885	0.834-0.938	0.412	47.83	1.022e-09	90	28
Δ <i>ALSFRS</i>	2.193	1.618-2.972					
<i>dijagnostičko kašnjenje</i>	0.939	0.888-0.994					
<i>broj kopija SMN1</i>	10.276	3.106-33.998					

HR – odnos rizika; R^2 – koeficijent determinacije; LRT – test količnika verodostojnosti; n – broj bolesnika za koje su vrednosti sve četiri promenljive bile dostupne; d – broj umrlih bolesnika u broju bolesnika n.



Slika 4.18. Krive preživljavanja za uticaj broja kopija gena *SMN1* na verovatnoću preživljavanja zasnovane na modelu dobijenom multivarijabilnom Koksovom regresionom analizom (n=90). Istačkanom linijom predstavljena je kriva preživljavanja bolesnika sa jednom kopijom *SMN1*, isprekidanom linijom bolesnika sa dvema kopijama *SMN1*, a punom linijom bolesnika sa trima kopijama *SMN1*.

4.2.7. Provera pretpostavke o srazmernosti rizika za umiranje

Pretpostavka o srazmernosti rizika za umiranje testirana Šonfeldovim testom reziduala bila je ispunjena: za zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze dobijena p-vrednost iznosila je $p=0.325$; za promenu ALSFRS-R kroz vreme (Δ ALSFRS) $p=0.088$; za dijagnostičko kašnjenje $p=0.548$; za broj kopija *SMN1* $p=0.265$; za celokupan model $p=0.329$). Na ovaj način potvrđena je verodostojnost dobijenih rezultata.

5. Diskusija

Spinalna mišićna atrofija i amiotrofična lateralna skleroza predstavljaju izuzetno teške bolesti motoneurona između kojih postoje patološke, ćelijske, molekularne i genetičke sličnosti. Usled toga, eksperimentalni pristupi u analizi uzročnog gena i gena modifikatora SMA, kao i patološki mehanizmi i klinički uvidi u ovoj monogenskoj bolesti mogu biti od ogromne važnosti za razumevanje bar dela složenog fenotipa kakav je ALS.

U okviru ove studije urađena je detaljna i precizna rekonstrukcija složenih hromozomskih rearanžmana u regionu 5q13.2 i određena je genetička struktura njegovog telomernog dela kod 99 nesrodnih bolesnika iz Srbije sa homozigotnom delecijom egzona 7 gena *SMN1* i 122 roditelja bolesnika dostupnih za analizu.

Inherentna nestabilnost regiona 5q13.2 potvrđena je identifikacijom 20 različitih alela njegovog telomernog dela u grupi od ukupno 442 ispitivana hromozoma. Kod ~95% analiziranih bolesnika metodom MLPA potvrđeno je homozigotno odsustvo ne samo egzona 7, već celog gena *SMN1*. Kod preostalih ~5% slučajeva hromozomskim rearanžmanima nije bio zahvaćen egzon 8, već je jedna njegova kopija bila prisutna, što je u skladu sa ranije prijavljenom učestalošću ovog tipa rearanžmana (Wirth et al. 2006). Najčešće uočeni hromozomski rearanžmani bili su velike delecije, koje su zahvatale gene *SMN1*, *SERF1A* i/ili *NAIP*, kao i genska konverzija gena *SMN1* u *SMN2*, oba različitih razmera. Velike delecije bile su najzastupljenije kod bolesnika sa SMA tipom I i retko kod bolesnika sa SMA tipom III, dok je genska konverzija gena *SMN1* u *SMN2* bila gotovo isključivo odlika bolesnika sa SMA tipom II i SMA tipom III. Imajući ovo u vidu, treba istaći razliku u značenju sintagme *homozigotno odsustvo gena SMN1* među različitim tipovima SMA, gde kod bolesnika sa SMA tipom I ona gotovo isključivo označava homozigotnu deleciju *SMN1*, a kod SMA tipa II i SMA tipa III gensku konverziju bar jedne kopije gena *SMN1* u gen *SMN2*. Povećan broj kopija gena *NAIP* i/ili *SMN1* zapažen je samo kod alela koji nisu bili asocirani sa bolešću.

Pokazana korelacija između broja kopija gena *SMN2* i tipa dečije SMA u skladu je sa prethodnim nalazima (Burghes 1997; Feldkötter et al. 2002; Wirth et al. 2006). U našem

ispitivanom uzorku najveći broj bolesnika sa tipom I (~90%) posedovao je dve kopije *SMN2*, svi bolesnici sa tipom II imali su tri kopije, a oni sa tipom III nosili su tri ili četiri kopije gena *SMN2* (~38% i ~62%, redom). Ovakav rezultat navodi na zaključak da između broja kopija *SMN2* i prirode rearanžmana u regionu 5q13.2 postoji jasan uzročno-posledičan odnos. Dva bolesnika sa tipom I, koja su posedovala po tri kopije *SMN2* i tri kopije *SERF1*, nisu imala sposobnost samostalnog sedenja, što ukazuje na postojanje dodatnih modifikatora fenotipa SMA. Imajući u vidu da bolesnici sa pet ili šest kopija *SMN2* razvijaju blage simptome bolesti (Wirth et al. 2006), a da osam kopija gena *SMN2* potpuno štiti osobu sa homozigotnom delecijom egzona 7 gena *SMN1* od pojave bolesti (Brahe 2000), nije neobično što u ispitivanom uzorku SMA bolesnika iz Srbije nisu uočeni genotipovi sa više od četiri kopije *SMN2*.

Određivanje broja kopija gena *SMN2* omogućuje u izvesnoj meri procenu toka bolesti i njene težine: verovatnoća da će bolesnik sa 1-2 kopije *SMN2* razviti tip I iznosi >97%, a da će bolesnik sa 3 kopije gena razviti tip II iznosi 83% (Feldkötter et al. 2002). Međutim, nisu sve prisutne kopije gena *SMN2* međusobno funkcionalno jednake (Borghes 1997). Himerne kopije *SMN2*, kod kojih je 5'-kraj gena zadržao sekvencu *SMN1*, imaju veću sposobnost da ublaže kliničku sliku u odnosu na kopije gena kod kojih je i ovaj deo gena bio zahvaćen genskom konverzijom. U ispitivanom uzorku SMA bolesnika uočene su ukupno dve himerne kopije – jedna u kojoj je samo egzon 7 imao sekvencu gena *SMN2*, i druga u kojoj je samo egzon 8 zadržao sekvencu gena *SMN1*, dok je uzvodni deo gena bio *SMN2*. Obe himerne kopije bile su prisutne kod bolesnika sa SMA tipom II. Intragenske mutacije u genu *SMN2*, male delecije ili duplikacije (Feldkötter et al. 2002), kao i različit stepen metilacije promotora *SMN2* (Hauke et al. 2009), mogu takođe usloviti razlike u funkcionalnosti između različitih kopija ovog gena.

Činjenica da su velike delecije isključivo prisutne kod bolesnika sa SMA tipom I (Burllet et al. 1996) potvrđena je i rezultatima ove teze koji pokazuju da je homozigotna delecija telomernog gena *SERF1A* bila prisutna samo kod bolesnika sa najtežim tipom SMA. Prethodnim studijama pokazano je da je *SERF1A* mnogo češće zahvaćen delecijom u odnosu na *NAIP*, a podjednako često kao *SMN1* kod bolesnika sa tipom I (Scharf et al.

1998; Amara et al. 2012), najverovatnije usled toga što je fizički najbliži genu *SMN1* u odnosu na sve druge gene iz regiona 5q13.2. U studiji sprovedenoj na 149 SMA bolesnika iz kineske populacije sa homozigotnom delecijom gena *SMN1*, od čega njih 48 sa tipom I, nije uočena delecija gena *SERF1* (He et al. 2013), pod čime autori najverovatnije podrazumevaju homozigotnu deleciju njegove telomerne kopije *SERF1A*. Zanimljivo je da je 7 od 48 bolesnika sa tipom I posedovalo fizički veliku homozigotnu deleciju koja je obuhvatila gene *SMN1*, *NAIP* i *GTF2H2*, ali ne gen *SERF1A*. Budući da proba *SERF1B*-up omogućuje određivanje ukupnog broja kopija gena *SERF1A* i *SERF1B*, samo dobro odabrana referentna grupa, porodična segregaciona analiza, kao i veština i iskustvo u proceni broja kopija mogu dovesti do nedvosmilnog prepoznavanja homozigotne delecije gena *SERF1A*. Uzevši sve navedeno u obzir, odsustvo porodične segregacione analize u navedenoj studiji može biti mogući uzrok nedektovanja smanjenja broja kopija gena *SERF1A*.

Prema rezultatima ranijih studija, *NAIP* je odsutan kod više od 50% bolesnika sa tipom I, a mnogo ređe kod bolesnika sa tipovima II i III (Roy et al. 1995; Velasco et al. 1996; Amara et al. 2012; He et al. 2013). Ovakav rezultat proizilazi i iz rezultata ove teze prema kojima je homozigotna delecija *NAIP* uočena gotovo isključivo kod bolesnika sa tipom I, dok se prisustvo obeju telomernih kopija gena *NAIP* sreće pretežno kod bolesnika sa tipom II i III, a gotovo da izostaje kod bolesnika sa tipom I. Broj kopija gena *NAIP* može varirati nezavisno od ostalih gena u regionu 5q13.2, što je zapaženo i u istraživanju koje je dovelo do otkrića samog gena (Roy et al. 1995), a pokazano je i u okviru ove teze detektovanjem povećanog broja kopija ovog gena kod 7,5% hromozoma sa normalnim brojem kopija *SMN1*, tj. jednom kopijom.

Najbolji minimalni generalizovani linearni model koji objašnjava fenotipsku varijabilnost dečije SMA ukazao je na udruženi uticaj broja kopija gena *SMN2* i *SERF1A*. Prisustvo broja kopija *SMN2* u ovom modelu nije iznenađujuće budući da njegovi transkripti daju 10% funkcionalnog proteina SMN (Monani et al. 1999), što ga čini glavnim priznatim genetičkim modifikatorom fenotipa SMA i glavnom metom savremenih terapijskih pristupa zasnovanih na primeni antisens oligonukleotida sa ciljem povećanja

ekspresije gena *SMN2* i količine dobijenog proteina SMN. Međutim, uticaj funkcionalnog gubitka gena *SERF1A* na pogoršanje fenotipa SMA zahteva dalja ispitivanja. *SERF1A* predstavlja opšti regulator agregacije proteina, ali nije poznato da li ovakav proces leži u osnovu patologije SMA (van Ham et al. 2010). Takođe, nije poznato da li funkcionalni gubitak gena *SERF1A* može biti delimično nadoknađen prisustvom njegovog centromernog paraloga *SERF1B*.

U izvesnom broju slučajeva uočeno je da članovi iste porodice, svi sa homozigotnim odsustvom gena *SMN1*, istovetnim brojem kopija gena *SMN2* i istim 5q13 haplotipovima, mogu drastično da se razlikuju po kliničkom ispoljavanju bolesti, do toga da pojedini članovi uopšte ne ispoljavaju simptome, a da drugi obolevaju od SMA tipa I (Cobben et al. 1995; Hahnen et al. 1995; Wang et al. 1996). U ovom smislu naročito je važan pol jer je u najvećem broju pomenutih slučajeva ženski pol bio bez simptoma bolesti. Neispoljavanje simptoma kod ženskih osoba koje genetički imaju SMA u odnosu na njihove muške srodnike može se objasniti povećanom ekspresijom gena *plastin-3 (PLS3)* smeštenog na hromozomu X (Oprea et al. 2008), koji usled postojanja dve kopije ispoljava svoj polno zavisni zaštitni efekat. Pomenuti primeri ukazuju na postojanje dodatnih genetičkih, epigenetičkih i sredinskih modifikatora fenotipa SMA.

Uočena učestalost *de novo* mutacija u genu *SMN1* od ~2% podudarna je sa ranijim podacima iz literature (Wirth et al. 1997; Ogino et al. 2002) i može da leži u osnovi velike učestalosti nosilaca mutacije u opštoj populaciji. U slučaju *de novo* mutacija, u paru dete-roditeelj najpre treba potvrditi biološko roditeljstvo naznačenog roditelja nad detetom. Dodatno, kod roditelja bolesnika sa naizgled *de novo* mutacijom treba uzeti u obzir i moguće postojanje germinativnog mozaicizma (Campbell et al. 1998).

Dijagnostika SMA otežana je postojanjem nosilaca koji poseduju dve kopije gena *SMN1*, od kojih se obe nalaze na istom hromozomu. Ovakav genotip, označen kao 2/0, prisutan je kod 2-9% zdravih osoba sa normalnim brojem kopija gena *SMN1* (Ben-Shachar et al. 2011). Usled toga, nijedna metoda za određivanje broja kopija gena *SMN1* nema mogućnost razlikovanja ovakvih nosilaca i osoba koje takođe poseduju dve kopije *SMN1*,

ali po jednu na svakom hromozomu. Identifikacija nosilaca sa genotipom 2/0 u ovoj tezi bila je moguća samo zahvaljujući segregacionoj analizi koja je omogućila razlikovanje tri nosioca 2/0 (2,46%) od roditelja bolesnika sa *de novo* mutacijom. U slučaju sumnje na genotip 2/0 savetuje se genetičko testiranje roditelja date osobe, gde se očekuje da jedan od roditelja poseduje jednu kopiju gena *SMNI* (genotip 1/0), a drugi roditelj najmanje tri kopije *SMNI* (genotip 2/1) (Ben-Shachar et al. 2011).

U okviru ove doktoske teze analiziran je deo ostrvceta CG2 koji obuhvata ukupno 8 dinukleotida CpG, od kojih je jedno na poziciji -296 i poklapa se sa prvim mestom početka transkripcije, gde je i uočena najveća statistički značajna razlika u stepenu metilacije između bolesnika sa SMA tipom I i SMA tipom III (Hauke et al. 2009), a drugo na poziciji -290, takođe značajno različito metilovano između ovih dveju grupa bolesnika. Pirosekvenciranje korišćeno u originalnom istraživanju omogućuje određivanje stepena metilacije svakog pojedinačnog dinukleotida CpG u ispitivanoj sekvenci DNK, ali bez mogućnosti karakterizacije različitih epialela koji mogu biti sadržani u uzorku. Osim toga, ovaj metod zahteva posedovanje specijalizovane i skupe opreme, usled čega je jedan od ciljeva ove teze bio testiranje metode HRM kao brzog, jeftinog i lakše dostupnog načina za analizu stepena metilacije celog ispitivanog fragmenta. Složenost krivih topljenja dobijenih metodom HRM i nepouzdanost tumačenja dobijenih rezultata ukazalo je na moguću heterogenu metilaciju analiziranih fragmenata i prisustvo većeg broja različitih epialela. Pojam heterogene metilacije može da znači da su u ispitivanom delu sekvence DNK neki od dinukleotida CpG metilovani, a drugi ne, ili, što je mnogo češće, da je jedan isti dinukleotid CpG u pojedinim kopijama te sekvence DNK metilovan, a u drugim kopijama iste sekvence nemetilovan. Što je veći broj CpG obuhvaćen parom prajmera, to će i verovatnoća heterogene metilacije, ali i broj mogućih epialela, biti veći. Ispostavilo se da je primena metode HRM u analizi stepena metilacije pogodna samo u slučajevima kada je reč o homogenoj metilaciji uzorka, ali ne i za heterogeno metilovane uzorke. Razlog za to je nastanak različitih kombinacija heterodupleksa koji se stvaraju između komplementarnih lanaca čije se sekvence razlikuju na jednom ili nekoliko dinukleotida CpG. Zbog velike razlike u obrascu i broju heterogeno metilovanih proizvoda i niže tačke topljenja

heterodupleksa, rezultat koji se na ovaj način dobije može se samo kvalitativno tumačiti. Međutim, iako heterogenu metilaciju na ovaj način nije moguće kvantifikovati, moguće ju je prepoznati po složenim krivama topljenja koje po svom izgledu odstupaju od krivih topljenja standarda i najčešće se odlikuju većim brojem domena topljenja. Metoda HRM je u ovakvim situacijama značajna za odabir onih proizvoda PCR-a koji zahtevaju dodatnu metodologiju u cilju određivanja stepena metilacije na svakoj pojedinačnoj poziciji.

Analiza stepena metilacije promotorskog regiona *SMN2* kod 10 bolesnika sa SMA tipom I i kod 7 bolesnika sa SMA tipom III metodom pirosekvenciranja (Hauke et al. 2009), i kod 35 SMA bolesnika iz kineske populacije svrstanih u sva tri dečija tipa i sa trima kopijama gena *SMN2* korišćenjem platforme MassARRAY (Cao et al. 2016) pokazala je da je ostrvce CG2 imalo srednji stepen metilacije, dok je ostrvce CG3 bilo hipometilovano. Dinukleotidi CpG ispitivani u ovoj tezi smešteni su vrlo blizu 3'-kraja ostrvceta CG2, a neposredno uzvodno od ostrvceta CG3, što može da objasni ne samo heterogenu metilaciju, već i odsustvo potpuno metilovanih epialela, naročito na nizvodnim dinukleotidima CpG koji su bliži hipometilovanom ostrvcetu CG3. Dodatno, odsustvo razlika u obrascu metilacije između dvaju analiziranih bolesnika zahteva proveru rezultata na većem uzorku, ali i proširivanje ispitivanog regiona na sva četiri ostrvceta CpG, budući da je u studiji Cao et al. 2016 razlika u stepenu metilacije između bolesnika sa SMA tipom III u odnosu na tipove I i II bila uočena na dinukleotidima CpG smeštenim u ostrvcima CG1 i CG4. Metoda izbora za ovu analizu bila bi ciljana analiza metilacije DNK metodom sekvenciranja nove generacije.

Analiza uzročno-posledičnog odnosa između stepena metilacije gena *SMN2* i funkcionalnosti prisutnih kopija kod SMA bolesnika moglo bi biti od značaja za unapređenje trenutnih terapijskih pristupa koji su usmereni prevažno na povećanje ekspresije gena *SMN2* ciljanjem utišivača splajsovanja nizvodno od egzona 7 i podsticanjem uključivanja ovog egzona u zreli iRNK. Kod bolesnika sa potencijalno metilovanim genom *SMN2* kombinatorna terapija, koja bi uključivala i demetilujuće terapeutike, mogla bi povećati kvalitet života obolelih. Kod SMA bolesnika tretiranih terapeutikama koji uspostavljaju ispravan obrazac splajsovanja gena *SMN2*, potencijalne

razlike u odgovoru na terapiju mogle bi biti posledica različite funkcionalnosti kopija *SMN2* uzrokovane njihovom metilacijom.

Od svih SALS bolesnika obuhvaćenih ovom doktorskom tezom, njih 12,42% posedovalo je ili mutaciju p.Leu145Phe u genu *SOD1* ili ekspanziju ponovljenog motiva GGGGCC u genu *C9orf72*. Međutim, učestalost mutacije p.Leu145Phe u *SOD1* (6,54%) bila je veća od učestalosti mutacije u genu *C9orf72* (5,88%), što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima u populaciji Srbije (Marjanović et al. 2017). Veća učestalost pomenute mutacije u odnosu na druge uzročne mutacije SALS prijavljena je i u drugim populacijama južne Evrope, i najverovatnije predstavlja posledicu osnivačke mutacije (Ferrera et al. 2003). Učestalost mutacije u genu *C9orf72* među bolesnicima sa SALS iz Srbije podudara se sa podacima iz literature (Majounie et al. 2012; Dekker et al. 2016). Sve je više studija koje pokazuju da u ALS porodicama bolest može biti uzrokovana varijantama u dvama ili više gena uzročnika, ukazujući na njenu oligogenu osnovu (Dekker et al. 2016). U ovakvim situacijama podložnost nastanku bolesti može zavisiti od jedne (primarne) genetičke varijante, dok sekundarni lokus može modifikovati vreme početka bolesti i težinu kliničke slike (Renton et al. 2013). U ovoj doktorskoj tezi ni kod jednog bolesnika sa SALS nisu detektovane mutacije u obama ispitivanim genskim lokusima, što je u saglasnosti sa nedavno objavljenim rezultatima prema kojima je oligogena osnova ALS uočena samo kod familijalnih slučajeva (Dekker et al. 2016). Međutim, familijalni slučajevi ALS mogu često biti naizgled sporadični usled nepotpune penetrabilnosti ili malog broja dostupnih članova porodice za analizu. Iako podela ALS na familijalne i sporadične slučajeve na osnovu porodične istorije bolesti i danas živi, smatra se da je takva klinička klasifikacija veštačka i neprecizna, što razliku između familijalne i sporadične ALS čini arbitrarnom (Andersen & Al-Chalabi 2011). U prilog ovome, kod čak 10% bolesnika sa naizgled sporadičnom ALS pronađene su mutacije u visoko rizičnim ALS genima (Turner et al. 2013; Chiò et al. 2014). Među SALS bolesnicima iz ove teze kod kojih je detektovana mutacija, bilo u genu *SOD1* ili u genu *C9orf72*, rizičan broj kopija gena *SMN1*, tačnije tri kopije ovog gena, uočen je kod dva bolesnika, i to sa mutacijom p.Leu145Phe. Istovremeno prisustvo visoko rizične varijante i dodatnih varijanti koje modulišu podložnost samoj

bolesti prijavljeno je kod malog procenta bolesnika iz velike kohorte ALS (Dekker et al. 2016). Dalje analize sa većim brojem klinički veoma dobro definisanih bolesnika koji imaju jednu visoko rizičnu varijantu i povećan broj kopija gena *SMN1* poterbne su kako bi se stekao uvid u doprinos gena *SMN1* fenotipskoj varijabilnosti kod ovakvih ALS bolesnika.

Nijedna od ranije sprovedenih studija koja je ispitivala asocijaciju broja kopija gena smeštenih u regionu 5q13.2 sa rizikom za pojavu SALS ili preživljavanjem nije uzimala u razmatranje broj kopija *SERFI* i *NAIP*. Kao što je već pomenuto, protein NAIP predstavlja negativni regulator apoptoze motoneurona, usled čega može biti uključen u patologiju karakterističnu za bolesti motornog neurona. Jednim od ranijih istraživanja bio je obuhvaćen i ovaj gen, ali usled metodoloških ograničenja data studija nije mogla da detektuje precizan broj kopija, već je jedino mogla da posvedoči njegovo prisustvo ili, pak, homozigotno odsustvo (Parboosingh et al. 1999). Zbog svoje biološke uloge u ćeliji kao opšteg regulatora proteinske agregacije i toksičnosti i gen *SERFI* zaslužuje pažnju kao mogući faktor rizika za nastanak i progresiju bolesti. Iako u ovoj doktorskoj tezi nije pokazana statistički značajna asocijacija između broja kopija *NAIP* i *SERFI* i rizika za pojavu SALS niti preživljavanja, studija iz 2018. godine (Kano et al. 2018) pokazala je da je količina proteina NAIP kod bolesnika sa SALS na početku bolesti skoro upola manja u poređenju sa zdravim kontrolama. Pomenuta studija pokazala je i da je veća količina proteina NAIP bila asocirana sa sporijim smanjenjem zbira ALSFRS-R tokom vremena, što ukazuje na to da bi postepeno povećanje količine NAIP moglo doprineti usporenju progresije bolesti. Ovi najnoviji rezultati, kao i uticaj broja kopija gena *SERFI* na fenotipsku varijabilnost SMA pokazan ovom doktorskom tezom, opravdavaju ispitivanje uticaja ovih dvaju gena na patologiju SALS. U tu svrhu neophodno je sprovođenje dodatnih studija na većem uzorku i u različitim populacijama.

Nepostojanje asocijacije između broja kopija gena *SMN1* i *SMN2* i rizika za pojavu SALS kod bolesnika iz Srbije u poređenju sa prethodnim različitim rezultatima može biti objašnjeno sa različitih gledišta. Razlike u prepoznavanju i definisanju fenotipa ALS između studija mogu da prouzrokuju nepodudarne korelacije između genotipa i fenotipa.

Odabir metodoloških pristupa i ograničenja korišćenih metoda za određivanje broja kopija gena od interesa mogu biti uzrok nekompletnih, neponovljivih i nepodudarnih rezultata. Dodatno, mala veličina uzorka ili, pak, specifičnosti genetičke arhitekture populacija koje su bile predmet istraživanja takođe mogu dovesti do pojave oprečnih rezultata (Corcia et al. 2012). Osim toga, studije genetičke asocijacije su specifične po rezultatima koji često nisu ponovljivi (Li & Meyre 2013). Meta-analize koje su pokazale da je broj kopija *SMNI* glavni faktor rizika za pojavu SALS pretežno su obuhvatile uzorke bolesnika iz zemalja Zapadne Evrope (Blauw et al. 2012; Wang et al. 2014). Varijabilan obrazac distribucije genskih varijanti uočen je kod mutacija u genima uzročnicima familijarnog oblika ALS: mutacija p.D91A u genu *SOD1* predominantna je u severnoj Švedskoj i Finskoj, a mutacija p.L145F u zemljama istočnog Mediterana (Andersen et al. 1996; Corcia et al. 2011). Mutacije u genu *SOD1* retke su u Holandiji i Danskoj (Andersen 2006; van Es MA et al. 2010). Sve ovo ukazuje na to da su genetički faktori rizika specifični za određene populacije i da se odnose samo na pojedine populacije. Ova doktorska teza pruža uvid u genetičku strukturu segmentalne duplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SALS sa prostora Balkana, o čemu ne postoje raniji podaci. U nedavno objavljenoj studiji gen *SMNI* ispitivan je kao ALS rizičan gen sa intermedijarnim efektom i njegova duplikacija bila je pokazana kod većeg broja sporadičnih slučajeva (6,6%) u poređenju sa kontrolama (3,4%) (Dekker et al. 2016). Značajno je istaći da je u našoj kontrolnoj grupi učestalost nosilaca delecije gena *SMNI* bila dva puta veća od one koja se očekuje prema podacima iz literature: 9/153 u našoj grupi u poređenju sa 1/35 iz literature (Cusin et al. 2003). Prema našem saznanju, ovo je prva studija u kojoj je zabeležena ovakva učestalost heterozigotne delecije *SMNI*, što može da objasni odsustvo asocijacije između jedne kopije *SMNI* i SALS u populaciji Srbije.

Statistički značajno duže vreme preživljavanja kod SALS bolesnika mlađih od 60 godina u skladu je sa prethodnim literaturnim podacima (Chiò et al. 2009). U osnovi ove pojave može da bude i smanjen broj motoneurona kod starijih bolesnika koji bi nadomestili progresivno opadanje motorne funkcije (Czaplinski et al. 2006a).

Procena funkcionalnog stanja bolesnika sa SALS pomoću skale ALSFRS-R obuhvata procenu bulbarnih funkcija, finih i grubih motornih funkcija i respiratorne funkcije. Zbog svoje sveobuhvatnosti, ova skala je najčešće korišćena u kliničkoj praksi i kliničkim studijama, uprkos tome što može da proceni funkcionalni pad kod bolesnika tek nakon što su oštećenja postala vidljiva i merljiva. Zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze predstavlja važan faktor za predviđanje vremena preživljavanja bolesnika i uočene su statistički značajne razlike u vremenu preživljavanja između bolesnika sa većim zbirom skale ALSFRS-R u odnosu na one sa manjim zbirom (Kimura et al. 2006; Kollwe et al. 2008; Chiò et al. 2009; Wolf et al. 2014). Ovakav rezultat dobijen je i u ovoj doktorskoj tezi gde se vreme preživljavanja statistički značajno razlikovalo između bolesnika kod kojih je zbir skale ALSFRS-R bio veći od medijane, tj. veći od 39, u odnosu na bolesnike kod kojih je ukupan zbir bio ≤ 39 .

Najčešći uzrok smrti bolesnika sa SALS je opadanje plućne funkcije usled slabljenja respiratornih mišića. Jedna od mera plućne funkcije je FVC koji, za razliku od skale ALSFRS-R, obuhvata isključivo procenu respiratorne funkcije, i to uzimajući u obzir samo snagu mišića aktivnih u toku udisaja. Tačnost merenja FVC veoma je zavisna od saradljivosti bolesnika. Međutim, FVC zajedno sa zbirom skale ALSFRS-R, predstavlja glavni prognostički faktor vremena preživljavanja bolesnika sa SALS. Najveći broj studija koji je ispitivao respiratorni status pokazao je da je niži FVC u trenutku dijagnoze asociran sa kraćim preživljavanjem (Czaplinski et al. 2006a; Czaplinski et al. 2006b; Chiò et al. 2009), što je pokazano i log-rank testom u ovoj tezi poređenjem bolesnika sa vrednošću $FVC \leq 90$ i >90 .

Rezultati log-rank testa pokazali su da statistički značajna razlika u vremenu preživljavanja postoji i između bolesnika kod kojih je zbir skale MMSE <24 i ≥ 24 . Zbir skale MMSE manji od 24 ukazuje na prisustvo kognitivnog oštećenja (Tombaugh 1992; Su et al. 2014). Iako je SALS bolest motoneurona, kognitivno oštećenje kod bolesnika je veoma često (Stojković et al. 2016), što ukazuje na to da i druge grupe neurona bivaju pogođene bolešću kod bolesnika bez demencije, naročito neuroni duž talamusno-frontalne

veze (Phukan et al. 2007). Veza između kognitivne disfunkcije i povećane stope smrtnosti je posredna i posledica je opšteg pada zdravstvenog stanja tokom prirodnog toka bolesti.

Tok bolesti kod ALS je nazaustavljivo progresivan sa dužinom prosečnog preživljavanja od oko 3 godine (Chiò et al. 2009). Čak i nakon jednog i po veka od kada je oboljenje prvi put opisano (Charcot & Joffroy 1869), iscrpna naučna saznanja nisu bila dovoljna da se definišu jasni dijagnostički i prognostički parametri ALS. U kliničkoj praksi i dalje ne postoje pouzdani algoritmi za predviđanje toka bolesti ili dužine preživljavanja obolelih. Dosadašnja prognoza toka bolesti zasnovana na vrednostima zbira skale ALSFRS-R i FVC nije se pokazala pouzdanom u kliničkoj praksi budući da do propadanja motornih neurona dolazi znatno pre ispoljavanja prvih simptoma bolesti. Pridruživanje objektivno merljivih i vremenski nepromenljivih genetičkih faktora kliničkim faktorima moglo bi da unapredi postojeće algoritme i njihovu primenu u kliničkoj praksi.

Koksova regresiona analiza razlikuje se od linearne regresije po tome što ima dva moguća ishoda, a od logističke regresije po tome što analizira vreme do odigravanja događaja od interesa i što može biti primenjena na vremenski zavisne promenljive i cenzurisane podatke. Osnovni problem pri pravljenju Koksovog regresionog modela predstavlja izbor promenljivih koje će ući u početni model. Odabir promenljivih može biti zasnovan na statističkoj značajnosti ili, pak, kliničkoj, kada u početni model mogu biti uključene sve klinički relevantne promenljive. Međutim, u mnogim radovima koristi se pristup prema kome u početni model bivaju uključene isključivo one promenljive koje su bile statistički značajne u univarijabilnoj Koksovoj regresionoj analizi, što je primenjeno i u ovoj doktorskoj tezi. Rezultati multivarijabilne Koksove regresione analize pokazali su da broj kopija gena *SMN1*, zajedno sa zbirom skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze, promenom zbira ALSFRS-R tokom vremena i dijagnostičkim kašnjenjem, može biti od značaja za predviđanje preživljavanja kod bolesnika sa SALS iz Srbije. Krive preživljavanja za broj kopija *SMN1* izvedene iz Koksovog modela ukazuju na to da tri kopije *SMN1* dovode do povećanja stope smrtnosti u odnosu na samo jednu kopiju ovog gena. Budući da 5%-15% varijacija u broju kopija rezultuje smanjenom genskom ekspresijom (Stranger et al. 2007; Semon & Wolfe 2007; Wang et al. 2012) jedno od

moćućih objašnjenja je da duplikacija gena *SMN1* dovodi do smanjenja ukupne krajnje kolićine proteina SMN. Međutim, ukoliko bi ova pretpostavka bila ispravna, oćekivalo bi se da procenat heterozigotnih delecija *SMN1* (jedna kopija) bude ili najćešće zastupljen genotip kod SALS, ili bar podjednako ućestala kao i tri kopije ovog gena. Drugo moguće objašnjenje je da duplikacija gena *SMN1* dovodi do suprotne pojave – do nastanka povećane kolićine proteina SMN koja deluje toksićno na motorne neurone, usled ćega dolazi do njihovog odumiranja. Eksperimentalni dokazi koji bi potkrepili ovu pretpostavku ne postoje. Prethodne studije su takode pokazale da broj kopija gena *SMN* moće uticati na vreme i verovatnoću preživljavanja. Na primer, u populacijama Holandije i Francuske manji broj kopija *SMN1* bio je asociran sa većom stopom smrtnosti (Veldink et al. 2005; Corcia et al. 2006). Dodatno, homozigotno odsustvo ili smanjen broj kopija gena *SMN2* (<2 kopije) pokazao se kao negativan prognostićki faktor za preživljavanje u holandskoj populaciji (Veldink et al. 2001; Veldink et al. 2005). Međutim, u švedskoj populaciji je homozigotno odsustvo *SMN2* identifikovano kao zaštitni faktor (Corcia et al. 2012). Ovako različiti rezultati mogu ukazati na genetićku specifićnost razlićitih populacija i istiću znaćajnost sprovođenja studija genetićke asocijacije na što većem broju razlićitih populacija. Sa druge strane oprećni rezultati mogu biti posledica relativno male velićine analiziranog uzorka po studiji. Iako taćan mehanizam uticaja povećanog broja kopija gena *SMN1* na skraćenje vremena preživljavanja kod bolesnika sa SALS nije poznat, interesantan je rezultat studije na zebrićama prema kome je protein SMN vremenski najpotrebniji u najranijim stadijumima razvića (Hao et al. 2013), dok je studija na miševima pokazala da je u adultnom centralnom nervnom sistemu potrebna umerena kolićina proteina SMN, za razliku od miševa u neonatalnoj fazi razvića (Sahashi et al. 2013).

Takode, prema dobijenom Koksovom modelu, niži zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze i brži pad zbira ALSFRS-R tokom vremena dovodi do povećanja stope smrtnosti, što oslikava veće funkcionalno oštećenje na poćetku bolesti ili tokom prirodnog toka bolesti. Dodatno, rezultati ove doktorske teze potvrđuju veći prognostićki znaćaj longitudinalnih podataka nego transverzalnih kada je u pitanju zbir ALSFRS-R i njegov uticaj na preživljavanje bolesnika sa SALS (Kimura et al. 2006).

Neobično je da iz krajnjeg Koksovog modela izostaje FVC, kao i njegova promena kroz vreme, imajući u vidu da je, zajedno sa zbirom ALSFRS-R i njegovom promenom kroz vreme, ovaj klinički parametar vrlo snažan pokazatelj oštećenja uzrokovanih bolešću, a samim tim i jedan od značajnih prognostičkih faktora. Rezultati univarijabilne Koksove regresione analize pokazali su da ovaj faktor ima jedan od većih koeficijenata determinacije, što je dodatan izazov za objašnjenje njegovog izostanka iz krajnjeg Koksovog modela. Međutim, ovakav rezultat pre svega može da se objasni već poznatim nedostacima univarijabilne Koksove regresione analize, gde efekat jednog faktora može biti izmenjen postojanjem i delovanjem drugih faktora koje univarijabilna analiza ne uzima u razmatranje. Sa kliničke tačke gledišta, poznato je da vrednosti FVC i zbira ALSFRS-R međusobno korelišu, s tim što skala ALSFRS-R obuhvata i ispituje širi spektar funkcija, od kojih je jedna i respiratorna. Moguće je da upravo zbog toga zbir skale ALSFRS-R ima veću prediktivnu moć i značaj. Uprkos ovome, ne treba zanemariti nezavisni uticaj FVC kao prognostičkog faktora za preživljavanje kod SALS, naročito ne njegove promene kroz vreme, već, naprotiv, treba uzeti u razmatranje veći broj faktora rizika baš zbog toga što prisustvo dodatnih faktora menja uticaj ostalih promenljivih.

Ograničenje dela teze koji se odnosi na SALS je relativno mala veličina uzorka. Međutim, ovo ograničenje je vrlo često u studijama na retkim bolestima, kakva je ALS, gde je povećanje veličine uzorka značajno otežano malom veličinom ukupne populacije Srbije, malom prevalencijom bolesti i njenim brzim smrtnim ishodom. U skladu sa navedenim, izvođenje replikativne studije na većem broju bolesnika iz Srbije je poželjno kako bi se proverila verodostojnost dobijenih rezultata.

Složenost SALS ogleda se u izuzetno velikom broju do sada objavljenih studija i dostupnih literaturnih podataka, kao i rastućem broju različitih i često oprečnih rezultata i kampanja za sakupljanje novca za obolele i ogromnih svetskih napora da se dešifruju njena genetička osnova i patologija. Uprkos svemu ovome, i dalje ne postoje jasni dijagnostički ni prognostički biomarkeri, kao ni efikasni terapijski pristupi u lečenju bolesti. Rezultati ove doktorske teze ukazuju na značaj dobro klinički definisanog uzorka bolesnika, opisanog sa što više kliničkih, ali i genetičkih podataka, što predstavlja temelj alternativnog

pristupa u istraživanjima o SALS u kom će veći broj rizičnih faktora biti analiziran udruženo umesto pojedinačno. Ovakav pristup mogao bi da omogući konstruisanje pouzdanih algoritama za postavljanje ranije i preciznije dijagnoze bolesti, predviđanje toka bolesti i efikasnije kliničke studije.

U eri novih, genetički dizajniranih terapija, koje su već odobrene za SMA, i velikog broja neuspešnih kliničkih studija i lekova ograničenog terapeutskog potencijala kod ALS, poznavanje uzročnih, rizičnih i modifikujućih genetičkih faktora u ovim bolestima od presudnog je značaja za razvoj i unapređenje ciljanih i blagovremenih terapija. Rezultati i zaključci ove teze već su doprineli unapređenju dijagnostičkih procedura i genetičkih testova u Srbiji, a kao deo svetskog naučnog nasleđa imaju za cilj da upotpune, učvrste i ugrade se u dosadašnje nalaze o ovim bolestima i tako doprinesu što boljoj i bržoj primeni u kliničkoj praksi.

6. Zaključci

1. Identifikacija dvadeset alela među 442 hromozoma različitih prema zahvaćenosti gena *SERF1A* i *NAIP* i broju njihovih kopija, kao i prema tipu hromozomskog rearanžmana (delecija ili genska konverzija), ukazali su na izuzetnu nestabilnost telomernog dela regiona 5q13.2.
2. Fizički veći strukturni rearanžmani telomernog dela regiona 5q13.2 i homozigotna delecija gena *SMN1*, *SERF1A* i *NAIP* prisutni su kod bolesnika sa SMA tipom I, dok bolesnici sa SMA tipovima II i III imaju fizički manje strukturne rearanžmane, najmanje jednu kopiju gena *SERF1A* i *NAIP* i gensku konverziju *SMN1* u *SMN2*.
3. Broj kopija gena *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* je statistički značajno obrnuto srazmeran tipu dečije spinalne mišićne atrofije.
4. Minimalni generalizovani linearni model ukazao je na to da broj kopija gena *SMN2* i *SERF1*, kao i njihov udruženi efekat, najbolje objašnjavaju fenotipsku varijabilnost dečije spinalne mišićne atrofije.
5. Kod pojedinačnih bolesnika sa SMA tipom I, II i III ostrvce CG2 promotorskog regiona gena *SMN2* odlikuje se metilacijom izuzetno visoke heterogenosti.
6. Metoda analize krivih topljenja visoke rezolucije nije pogodna metoda za analizu metilacije ostrvceta CG2 promotorskog regiona gena *SMN2* usled uočene heterogene metilacije.
7. U analiziranoj grupi SALS bolesnika iz populacije Srbije nije pokazana statistički značajna asocijacija između broja kopija gena *SMN1*, *SMN2*, *SERF1* i *NAIP* i rizika za pojavu bolesti.
8. Niži zbir skale ALSFRS-R u trenutku dijagnoze bolesti, brži pad funkcionalnosti (Δ ALSFRS) tokom trajanja bolesti, kraće dijagnostičko kašnjenje i veći broj kopija gena *SMN1* asocirani su sa kraćim preživljavanjem bolesnika sa SALS iz Srbije.
9. Broj kopija gena *SMN1* može biti od koristi za unapređenje algoritama za predviđanje toka SALS budući da je objektivno merljiv i vremenski nepromenljiv faktor koji utiče na preživljavanje.

7. Literatura

1. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, et al. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002; 297(5583):1003-7.
2. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 2007; 39:S43–47.
3. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011; 43:838-846.
4. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* 2011; 13:777-784.
5. Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, et al. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet* 2014; 46:1063-1071.
6. Dennis MY, Harshman L, Nelson BJ, et al. The evolution and population diversity of human-specific segmental duplications. *Nat Ecol Evol* 2017; 1(3):69.
7. Pearn J. Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1978; 15(6):409–413.
8. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002; 70(2):358-68.
9. Cusin V, Clermont O, Gerard B, Chantereau D, Elion J. Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J Med Genet* 2003; 40(4):e39.
10. Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 1999; 9(4):272-8.
11. Simić G. Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol* 2008; 116:223–234.

12. Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 1992; 2(5-6):423-8.
13. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 1995; 52(5):518-23.
14. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 1990; 344(6266):540-1.
15. Melki J, Abdelhak S, Sheth P, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990a; 344(6268):767-8.
16. Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990; 345(6278):823-5.
17. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 1990b; 336(8710):271-3.
18. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80(1):155-65.
19. Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, et al. Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 1998; 48(1):121-7.
20. Wirth B, Herz M, Wetter A, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1999; 64(5):1340-56.
21. Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(18):9920-5.
22. van der Steege G, Grootsholten PM, Cobben JM, et al. Apparent gene conversions involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 1996; 59(4):834-8.

23. Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Raschke H, Zerres K, Wirth B. Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet* 1997; 6(5):821-5.
24. Lim SR, Hertel KJ. Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J Biol Chem* 2001; 276(48):45476-83.
25. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(11):6307-11.
26. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 2003; 34(4):460-3.
27. Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, et al. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 2006; 78:63-77.
28. Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet* 2007; 16(24):3149-59.
29. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8):1205-14.
30. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 1997; 16(3):265-9.
31. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 1998; 19(1):63-6.
32. Le TT, Pham LT, Butchbach ME, et al. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 2005; 14(6):845-57.
33. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996; 15(14):3555-65.
34. Young PJ, Le TT, thi Man N, et al. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 2000; 256(2):365-74.

35. Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 2007; 8(4):340-5.
36. Rossoll W, Kröning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 2002; 11(1):93-105.
37. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, et al. Smn, the spinal muscular atrophy–determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 2003; 163(4):801-12.
38. Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation. *Brain Res* 2012; 1462:81-92.
39. Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 2003; 23(16):6627-37.
40. Wirth B, Brichta L, Schrank B, et al. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 2006; 119(4):422-8.
41. Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet* 1997; 61(1):9–15.
42. van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, et al. Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell* 2010; 142(4):601-12.
43. Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379(6563):349-53.
44. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80(1):167-78.
45. Burlet P, Bürglen L, Clermont O, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996; 33(4): 281–283.
46. Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernández-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families

- and correlation between number of copies of CBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 1996; 5(2):257-63.
47. Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, et al. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* 1998; 20(1):83-6.
 48. Arkblad E, Tulinius M, Kroksmark AK, Henricsson M, Darin N. A populationbased study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr* 2009; 98(5):865-72.
 49. Amara A, Adala L, Ben Charfeddine I, et al. Correlation of SMN2, NAIP, p44, H4F5 and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2012; 16(2):167-74.
 50. He J, Zhang QJ, Lin QF, et al. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. *Gene* 2013; 518(2):325-9.
 51. Boda B, Mas C, Giudicelli C, et al. Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(9):729-37.
 52. Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J. The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 1999; 64(5):1365-70.
 53. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishing the SMA gene and SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 1999; 8(7):1177-83.
 54. DiDonato CJ, Morgan K, Carpten JD, et al. Association between Ag1-CA alleles and severity of autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994; 55(6):1218-29.
 55. Wirth B, Hahnen E, Morgan K, et al. Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum Mol Genet* 1995; 4(8):1273-84.

56. Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR. The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 2001; 279(2):109-17.
57. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(5):1412-7.
58. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6):465-76.
59. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321(6067):209-13.
60. Craig JM, Bickmore WA. The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet* 1994; 7(3):376-82. Erratum in: *Nat Genet* 1994; 7(4):551.
61. Hauke J, Riessland M, Lunke S, et al. Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition. *Hum Mol Genet* 2009; 18(2):304-17.
62. Stević Z, Kostić-Dedić S, Perić S, et al. Prognostic factors and survival of ALS patients from Belgrade, Serbia. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2016; 17(7-8):508-14.
63. Marin B, Boumédiene F, Logroscino G, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2016; 46(1):57-74.
64. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 2013; 41(2):118-30.
65. Gordon PH, Mehal JM, Holman RC, Rowland LP, Rowland AS, Cheek JE. Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis Among American Indians and Alaska Natives. *JAMA Neurol* 2013; 70(4):476-80.
66. Kurland LT, Hirano A, Malamud N, Lessell S. Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. Clinical, pathological, genetic and epidemiological features. *Trans Am Neurol Assoc* 1961; 86:115-20

67. Preux P, Couratier P, Boutros-Toni F, et al. Survival prediction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Age and clinical form at onset are independent risk factors. *Neuroepidemiology* 1996; 15:153–60.
68. Traynor BJ, Codd MB, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria. *Arch Neurol* 2000; 57:1171–6.
69. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011; 7:639–49.
70. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 2007; 68:326–337.
71. Mehta P, Antao V, Kaye W, et al. Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis - United States, 2010-2011. *MMWR Suppl* 2014; 63(7):1-14.
72. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000; 1(5):293-9.
73. Robberecht W, Eykens C. The genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis: recent breakthroughs. *Advances in Genomics and Genetics* 2015; 2015(5):327-45.
74. Turner MR, Hardiman O, Benatar M, et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2013; 12(3): 310-22.
75. Chiò A, Battistini S, Calvo A, et al. Genetic counselling in ALS: facts, uncertainties and clinical suggestions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85(5): 478-85.
76. Dunckley T, Huentelman MJ, Craig DW, et al. Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2007; 357(8):775-88.
77. Van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2016; 48(9):1043-8.
78. Blauw HM, Al-Chalabi A, Andersen PM, et al. A large genome scan for rare CNVs in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2010; 19(20):4091-9.

79. Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, et al. Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2002; 51(2):243-6.
80. Veldink JH, Kalmijn S, Van der Hout AH, et al. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology* 2005; 65(6):820-5.
81. Corcia P, Camu W, Halimi JM, et al. SMN1 gene, but not SMN2, is a risk factor for sporadic ALS. *Neurology* 2006; 67(7):1147-50.
82. Corcia P, Ingre C, Blasco H, et al. Homozygous SMN2 deletion is a protective factor in the Swedish ALS population. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(5):588-91.
83. Blauw HM, Barnes CP, van Vught PW, et al. SMN1 gene duplications are associated with sporadic ALS. *Neurology* 2012; 78(11):776-80.
84. Wang XB, Cui NH, Gao JJ, Qiu XP, Zheng F. SMN1 duplications contribute to sporadic amyotrophic lateral sclerosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *J Neurol Sci* 2014; 340(1-2):63-8.
85. Gordon PH, Corcia P, Lacomblez L, et al. Defining survival as an outcome measure in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66(6):758-61.
86. Paganoni S, Cudkowicz M, Berry JD. Outcome measures in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Clin Investig (Lond)* 2014; 4(7):605-618.
87. Munsat TL. International SMA collaboration. *Neuromuscul Disord* 1991; 1:81.
88. Marjanović IV, Selak-Djokić B, Perić S, et al. Comparison of the clinical and cognitive features of genetically positive ALS patients from the largest tertiary center in Serbia. *J Neurol* 2017; 264(6):1091-1098.
89. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Chapter 6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.
90. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12):e57.

91. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18(11):1427-31.
92. Kristensen LS, Hansen LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem* 2009; 55(8):1471-83.
93. Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa JP. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques* 2007; 42(1):48, 50, 52 passim.
94. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(21):4422-6.
95. Wojdacz TK, Hansen LL. Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *Biotechniques* 2006; 41(3):274, 276, 278.
96. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucl Acids Res* 2007; 35(6):e41.
97. Uzelac G, Miljkovic M, Lozo J, Radulovic Z, Tosic N, Kojic M. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. *Microbiol Res* 2015; 179:45-53.
98. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Version 3.3.3 [software]. R Foundation for Statistical Computing. 2017 Mar 06 [cited 2017 Aug 06; downloaded 2018 Jan 15]. Available from: <https://www.R-project.org/>.
99. Therneau T (2015). A Package for Survival Analysis in S. version 2.38. <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.
100. Kassambara A, Kosinski M (2017). Survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
101. Tombaugh TN, McIntyre NJ. The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40(9):922-35.
102. Craig J. Complex diseases: Research and applications. *Nature Education* 2008; 1(1):184.

103. Cao YY, Qu YJ, He SX, et al. Association between SMN2 methylation and disease severity in Chinese children with spinal muscular atrophy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17(1):76-82.
104. Brahe, C. Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: The more, the better. *Neuromuscul Disord* 2000; 10:274–275.
105. Burlet P, Bürglen L, Clermont O, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996; 33:281–283.
106. Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1995; 57(4):805-8.
107. Hahnen E, Forkert R, Marke C, et al. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995; 4(10):1927-33.
108. Wang CH, Xu J, Carter TA, et al. Characterization of survival motor neuron (SMN2) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1996; 5(3):359-65.
109. Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, et al. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 2008; 320(5875):524-7.
110. Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, et al. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1102–1111.
111. Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 2002; 111:477–500.
112. Campbell L, Daniels RJ, Dubowitz V, Davies KE. Maternal mosaicism for a second mutational event in a type I spinal muscular atrophy family. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 37–44.

113. Ben-Shachar S, Orr-Urtreger A, Bardugo E, Shomrat R, Yaron Y. Large-scale population screening for spinal muscular atrophy: clinical implications. *Genet Med* 2011; 13:110–114.
114. Ferrera L, Caponnetto C, Marini V, et al. An Italian dominant FALS Leu144Phe SOD1 mutation: genotype-phenotype correlation. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2003; 4(3): 167-70.
115. Majounie E, Renton AE, Mok K, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; 11(4): 323-30.
116. Dekker AM, Seelen M, van Doormaal PT, et al. Large-scale screening in sporadic amyotrophic lateral sclerosis identifies genetic modifiers in C9orf72 repeat carriers. *Neurobiol Aging* 2016; 39: 220 e9-15.
117. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014; 17(1):17-23.
118. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011; 7(11): 603-15.
119. Parboosingh JS, Meininger V, McKenna-Yasek D, Brown RH Jr, Rouleau GA. Deletions causing spinal muscular atrophy do not predispose to amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1999; 56(6):710-2.
120. Kano O, Tanaka K, Kanno T, Iwasaki Y, Ikeda JE. Neuronal apoptosis inhibitory protein is implicated in amyotrophic lateral sclerosis symptoms. *Sci Rep* 2018; 8(1):6.
121. Li A, Meyre D. Challenges in reproducibility of genetic association studies: lessons learned from the obesity field. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37(4):559-67.
122. Andersen PM, Forsgren L, Binzer M, et al. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 1996; 119 (Part 4):1153–1172.
123. Corcia P, Petiot P, Stevic Z, et al. Respiratory onset in an ALS family with L144F SOD1 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:747–749.

124. Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; 6:37–46.
125. van Es MA, Dahlberg C, Birve A, Veldink JH, van den Berg LH, Andersen PM. Large-scale SOD1 mutation screening provides evidence for genetic heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81:562–566.
126. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10(5-6):310-23.
127. Czaplinski A, Yen AA, Appel SH. Amyotrophic lateral sclerosis: early predictors of prolonged survival. *J Neurol* 2006a; 253(11):1428-36.
128. Kimura F, Fujimura C, Ishida S, et al. Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology* 2006; 66(2):265-7.
129. Kollwe K, Mauss U, Krampfl K, Petri S, Dengler R, Mohammadi B. ALSFRS-R score and its ratio: a useful predictor for ALS-progression. *J Neurol Sci* 2008; 275(1-2):69-73.
130. Wolf J, Safer A, Wöhrle JC, et al. Factors predicting one-year mortality in amyotrophic lateral sclerosis patients—data from a population-based registry. *BMC Neurol* 2014; 14:197.
131. Czaplinski A, Yen AA, Appel SH. Forced vital capacity (FVC) as an indicator of survival and disease progression in an ALS clinic population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006b; 77(3):390-2.
132. Su YP, Chang CK, Hayes RD, et al. Mini-mental state examination as a predictor of mortality among older people referred to secondary mental healthcare. *PLoS One* 2014; 9(9):e105312.
133. Stojkovic T, Stefanova E, Pekmezovic T, Peric S, Stevic Z. Executive dysfunction and survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Preliminary report from a Serbian centre for motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2016 Oct - Nov;17(7-8):543-547.
134. Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2007; 6(11):994-1003. Review.

135. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lesions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Norm Pathol* 1869; 2744–60.
136. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007; 315(5813):848-53.
137. Semon M, Wolfe KH. Consequences of genome duplication. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17(6):505–12.
138. Wang Y, Wang X, Paterson AH. Genome and gene duplications and gene expression divergence: a view from plants. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1256:1–14.
139. Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, et al. Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS. *Neurology* 2001; 56(6):749-52.
140. Hao le T, Duy PQ, Jontes JD, Wolman M, Granato M, Beattie CE. Temporal requirement for SMN in motoneuron development. *Hum Mol Genet* 2013; 22(13): 2612-25.
141. Sahashi K, Ling KK, Hua Y, et al. Pathological impact of SMN2 mis-splicing in adult SMA mice. *EMBO Mol Me* 2013; 5(10):1586-601.

8. Prilozi

8.1. Prilog 1 – Dozvola Etičkog odbora Klinike za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu

КЛИНИКА ЗА НЕУРОЛОГИЈУ И ПСИХИЈАТРИЈУ
ЗА ДЕЦУ И ОМЛАДИНУ, Београд, др Суботића 6а
Број: 1-9/2
Датум: 28.03.2016.

На основу Закона о здравственој заштити („Сл. гласник РС“ бр. 107/05, 72/09, 88/10 и 99/10), Закона о изменама и допунама Закона о здравственој заштити („Сл. гласник РС“ број 57/11), члана 37. Статута Клинике и члана 17. Пословника о раду Етичког одбора Клинике, а у складу са начелима Добре клиничке праксе у клиничком испитивању (ICH GCP/ ДКП) („Сл. гласник РС“, бр. 28/08), Етички одбор Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, у саставу: проф. др сци мед. Анета Лакић, проф. др сци мед. Ведрана Милић-Рашић, проф. др сци мед. Јасна Јанчић, др Јелена Младеновић и др Ана Пепић, на **60. редовној седници** одржаној дана **07.03.2016. године**, већином гласова од укупног броја чланова је дао

С А Г Л А С Н О С Т

Бркушанин Милошу, дипл. биологу, за израду докторске тезе под називом: "Генетичка структура сегменталне дупликације 5q13.2 и метилација промотора гена за преживљавање мотоневрона 2 (SMN2) као модификатори фенотипа спиналне мишићне атрофије дечијег доба", чији ће експериментални део бити изведен у Центру за хуману молекуларну генетику Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Главни истраживач је Милош Бркушанин, а остали чланови истраживачког тима су: проф. др Ведрана Милић-Рашић, проф. др Слободанка Тодоровић, др Ана Косаћ, Јован Пешовић, проф. др Д.Савић Павићевић и др Владимир Јовановић.

Ово истраживање је искључиво научног карактера и нема никакве негативне здравствене последице по испитанике.

Учесници ове студије потписују Сагласност за генетичко тестирање и Информисани пристанак за испитанике, чиме својеволно дају пристанак да се узорак њихове периферне крви користи у овој научној студији. Из историје болести пацијента биће узети основни демографски и клинички подаци о пацијенту. Током истраживања биће предузете све мере сигурности и заштите права и личних података испитаника који учествују у истраживању, а прикупљени подаци и добијени резултати користиће се искључиво у истраживачке сврхе.

Истраживање ће бити спроведено под менторством проф. др Д.Савић Павићевић, ванр.професора Биолошког факултета Универзитета у Београду. Обухватиће ~100 пацијената оболелих од спиналне мишићне атрофије, дијагностикованих у периоду од 1998. године до данас, од којих је њих ~ 80 лечено у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. У зависности од типа болести, неки од пацијената су имали способност самосталног ходања (пацијенти са типом 2), док остали нису (пацијенти са типом 1).

Клиника за неурологију и психијатрију за децу и омладину неће имати никакве материјалне трошкове током спровођења истраживања.

Планирана дужина истраживања је 3 године.

Након разматрања молбе Бркушанин Милоша и приложене документације, Етички одбор је већином гласова од укупног броја чланова дао сагласност за извођење истраживања, под називом: "Генетичка структура сегменталне дупликације 5q13.2 и метилација промотора гена за преживљавање мотонеурона 2 (SMN2) као модификатори фенотипа спиналне мишићне атрофије дечијег доба".

Проф. др Ведрана Милић-Рашић, члан тима није гласала.

Доставити:
-именованом;
-Етичком одбору;



ПРЕДСЕДНИК ЕО

Проф. др Анета Лакић

8.2. Prilog 2 – Dozvola Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije

KLINIČKI CENTAR SRBIJE
ETIČKI ODBOR
Broj: 339/4
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 Zorice Stević, na svojoj 21. sednici održanoj dana 15.06.2017. godine, doneo je sledeću

ODLUKU

Odobrava se sprovođenje akademskog kliničkog ispitivanja (studije) pod nazivom: "Genetička struktura segmentalne duplikacije 5q13.2 kao modifikator fenotipa bolesti motoneurona".
Glavni istraživač je Prof. dr Zorica Stević.

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 Miloš Brkušanin.

Članovi istraživačkog tima su: Dr Stojan Perić i Dr Irena Jeftović Velkova.

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

Rezultati ovog ispitivanja biće korišćeni za izradu doktorske disertacije Miloša Brkušanina.








Prilikom donošenja odluke Etički odbor je razmatrao sledeću dokumentaciju:

- Saglasnost Direktora Klinike za neurologiju od 18.04.2017. godine,
- Protokol istraživanja,
- Izjava Dekana Biološkog fakulteta,
- Informacija za pacijenta i Obrazac informisanog pristanka
- Biografija glavnog istraživača.


PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA
Prof. dr Branislav Stefanović

8.3. Prilog 3 – Strukture segmentalne duplikacije 5q13.2

Legenda za tumačenje rekonstrukcija regiona 5q13.2 kod SMA bolesnika porodičnom segregacionom analizom:

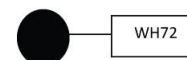
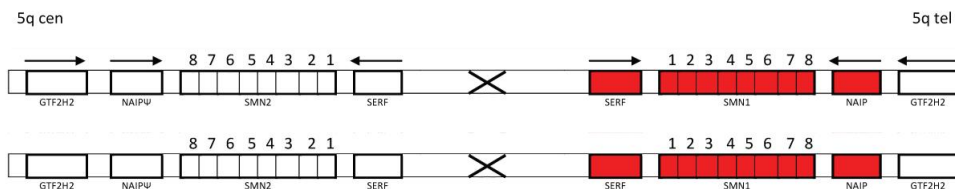
	- zdrava osoba muškog pola		- delecija naznačenog gena ili dela gena
	- osobe muškog i ženskog pola sa kliničkim simptomima		- genska konverzija gena <i>SMN1</i> ili njegovog naznačenog dela u gen <i>SMN2</i>
	- osobe muškog i ženskog pola koje nose mutaciju u genu <i>SMN1</i>		- genska konverzija gena <i>SMN2</i> ili njegovog naznačenog dela u gen <i>SMN1</i>
			- duplikacija naznačenog gena ili dela gena sa brojem uočenih kopija

5q cen - centromerni deo segmentalne duplikacije 5q13.2

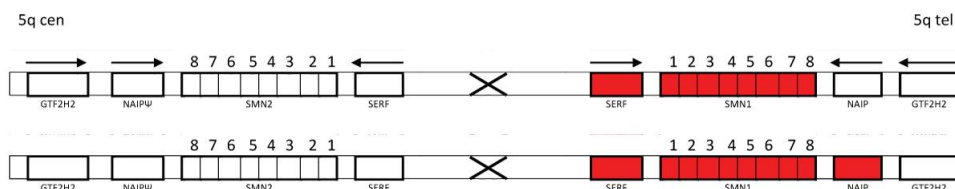
5q tel - telomerni deo segmentalne duplikacije 5q13.2

8.3.1. Strukture segmentalne suplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom I

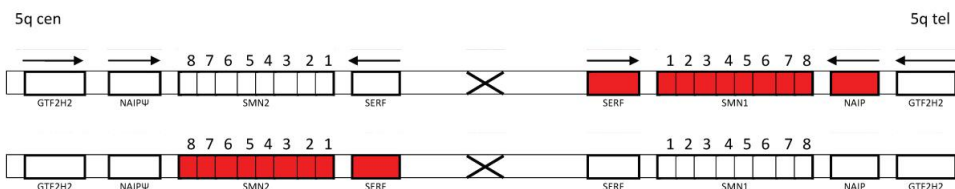
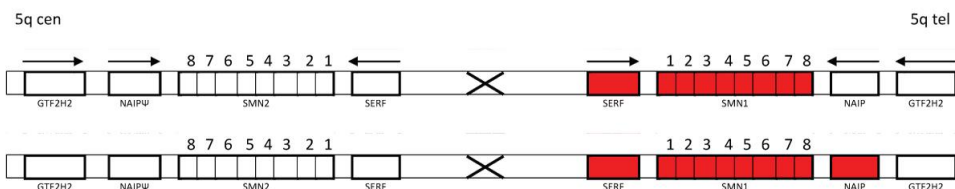
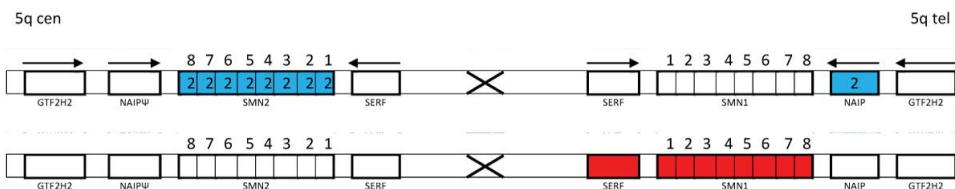
Bolesnik WH72



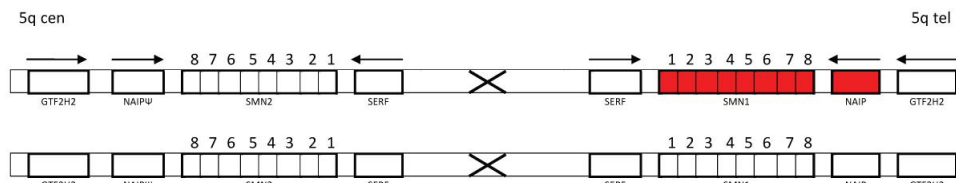
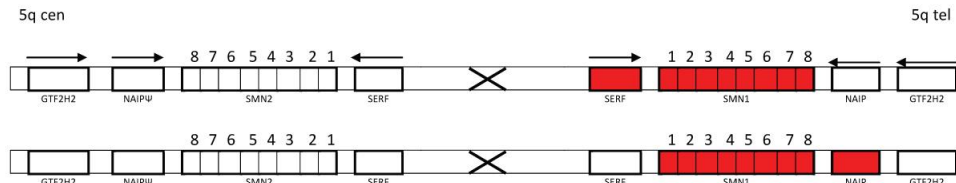
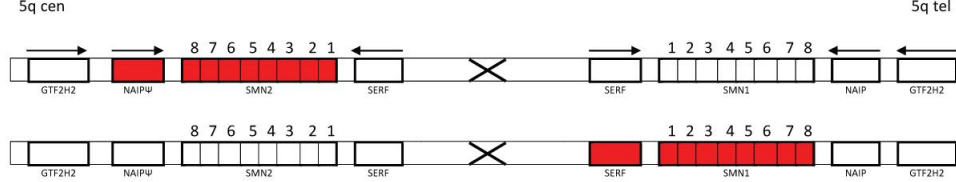
Bolesnik WH140



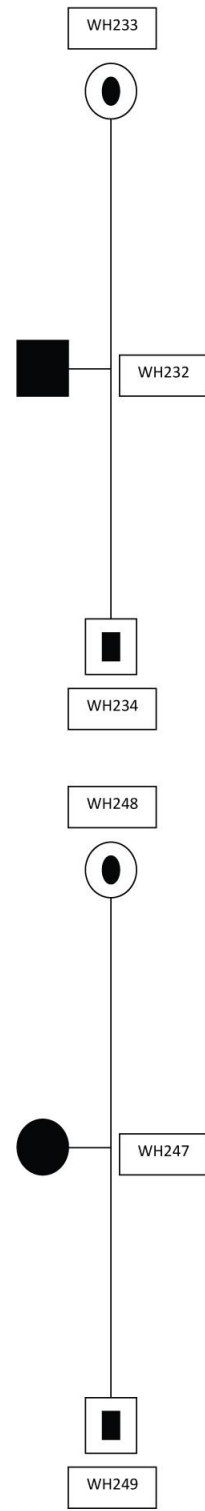
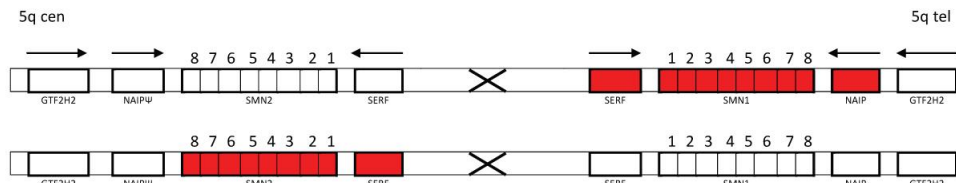
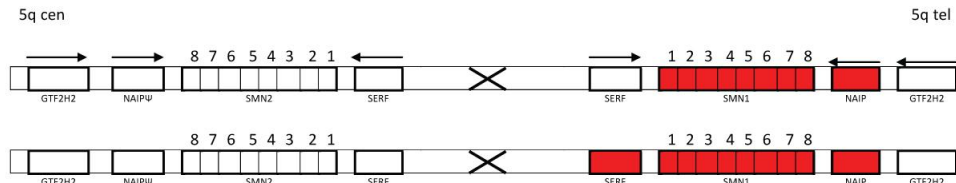
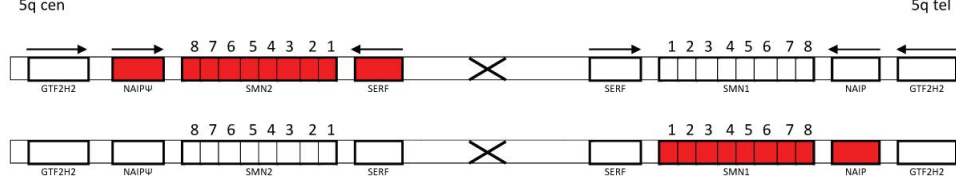
Bolesnik WH191



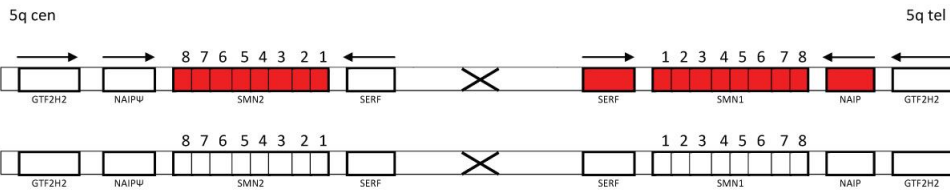
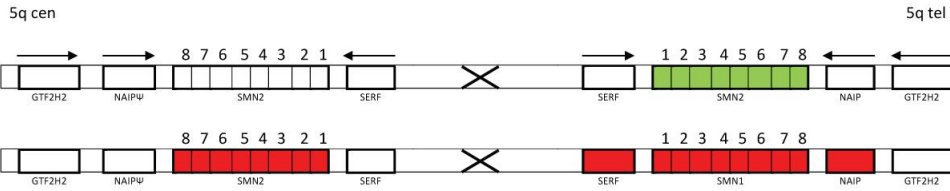
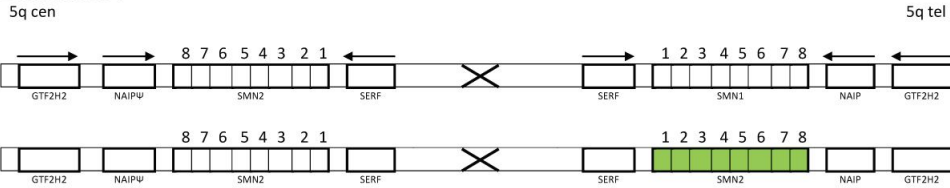
Bolesnik WH232



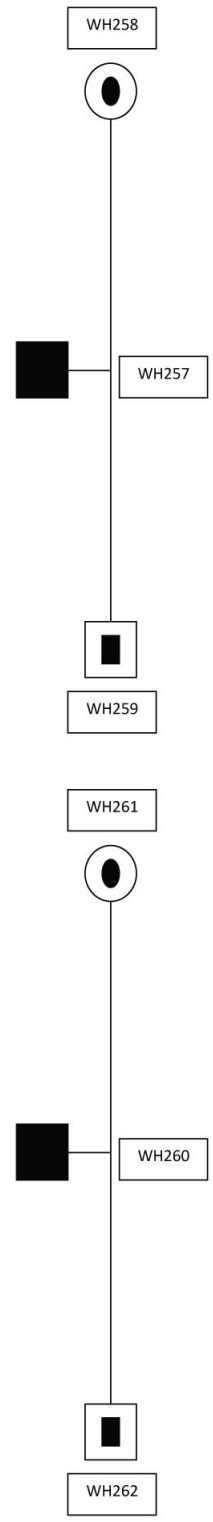
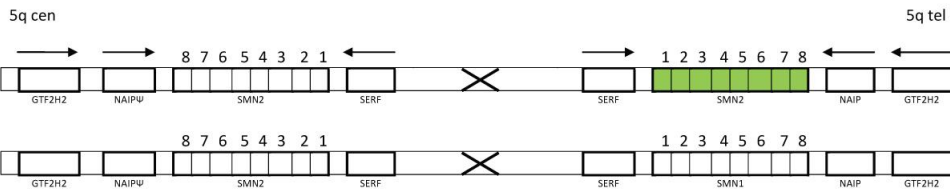
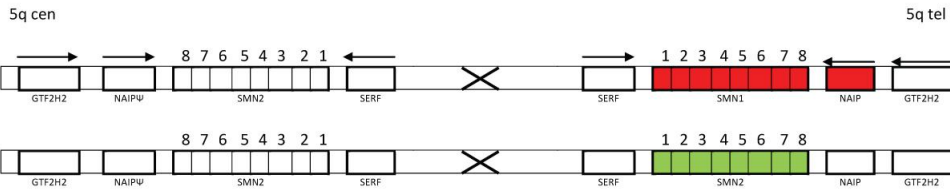
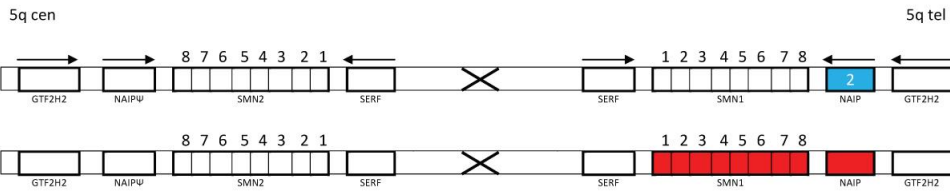
Bolesnik WH247



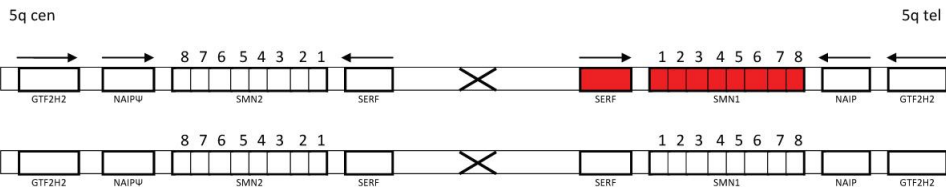
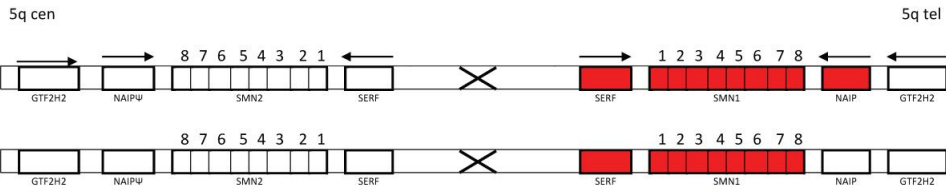
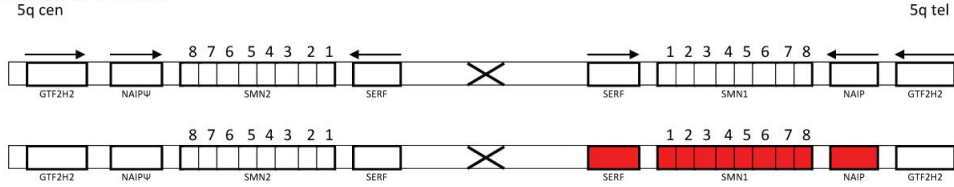
Bolesnik 257



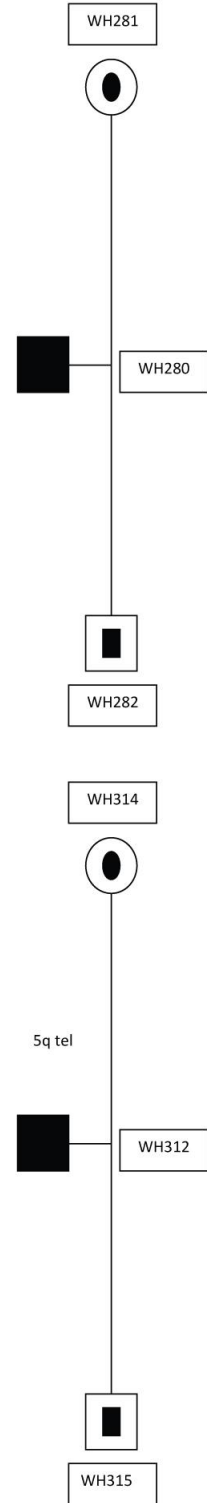
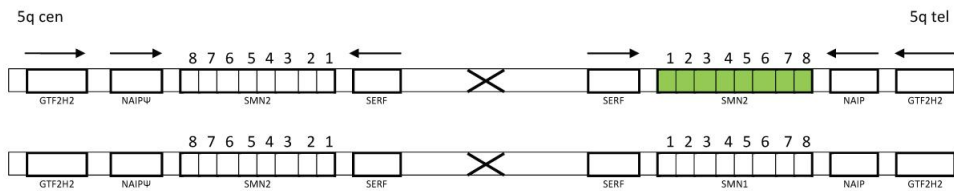
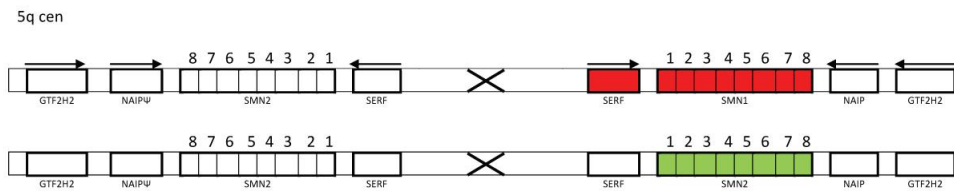
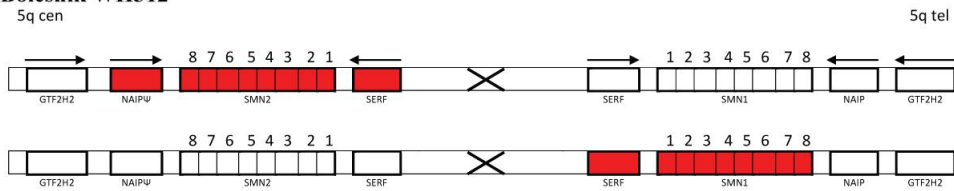
Bolesnik 260



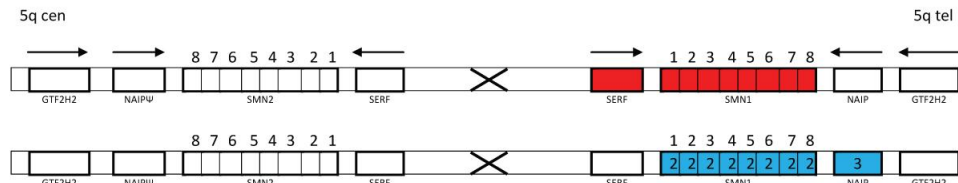
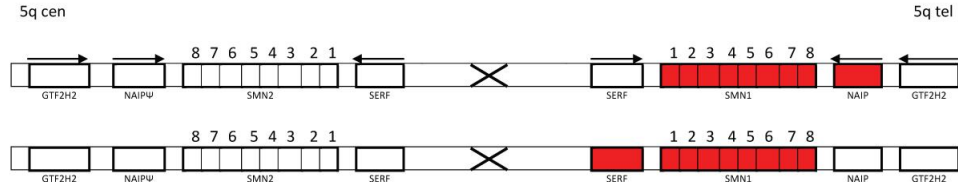
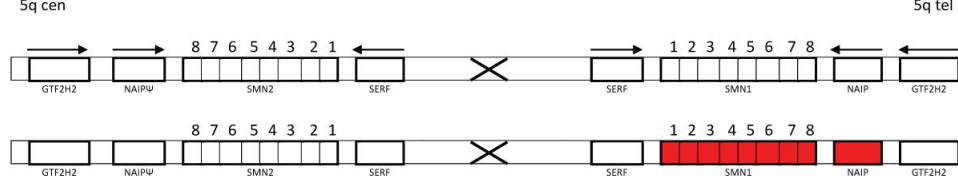
Bolesnik WH280
5q cen



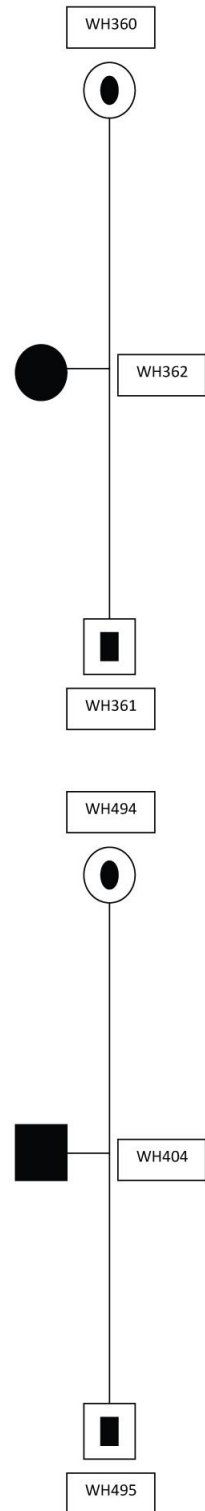
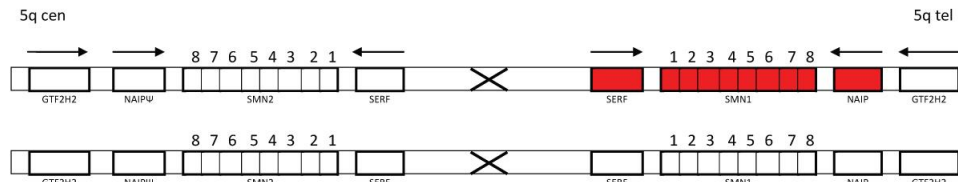
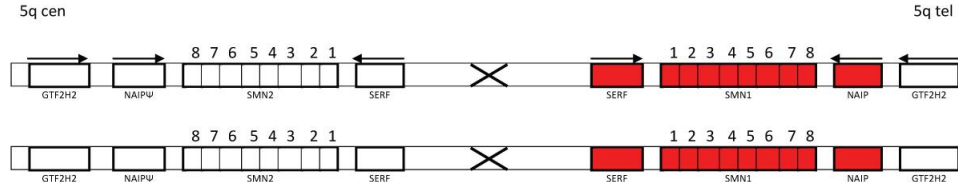
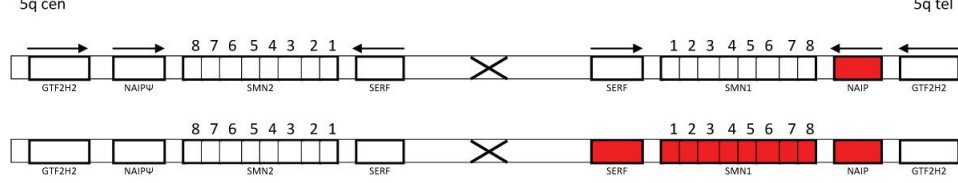
Bolesnik WH312
5q cen



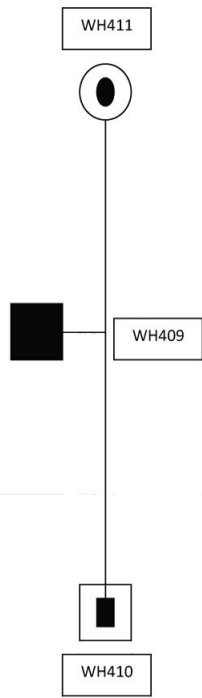
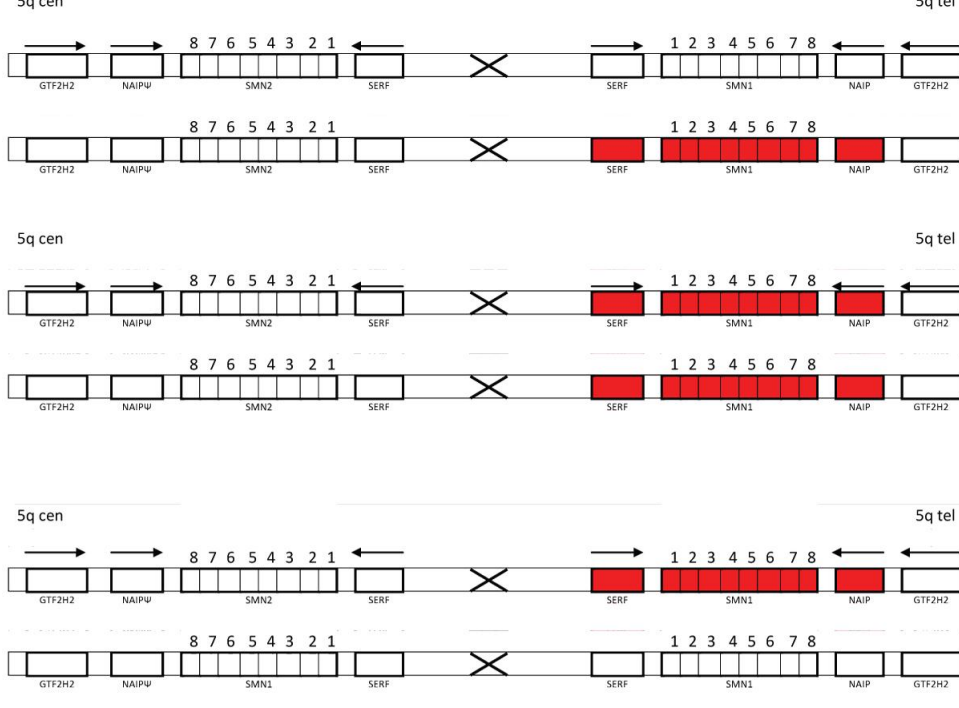
Bolesnik WH362



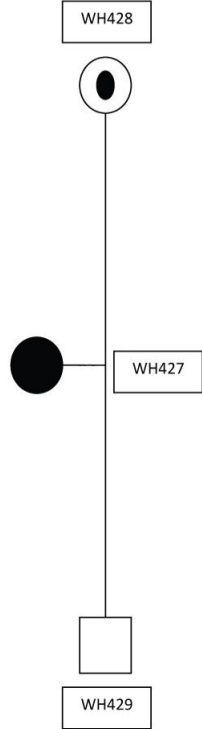
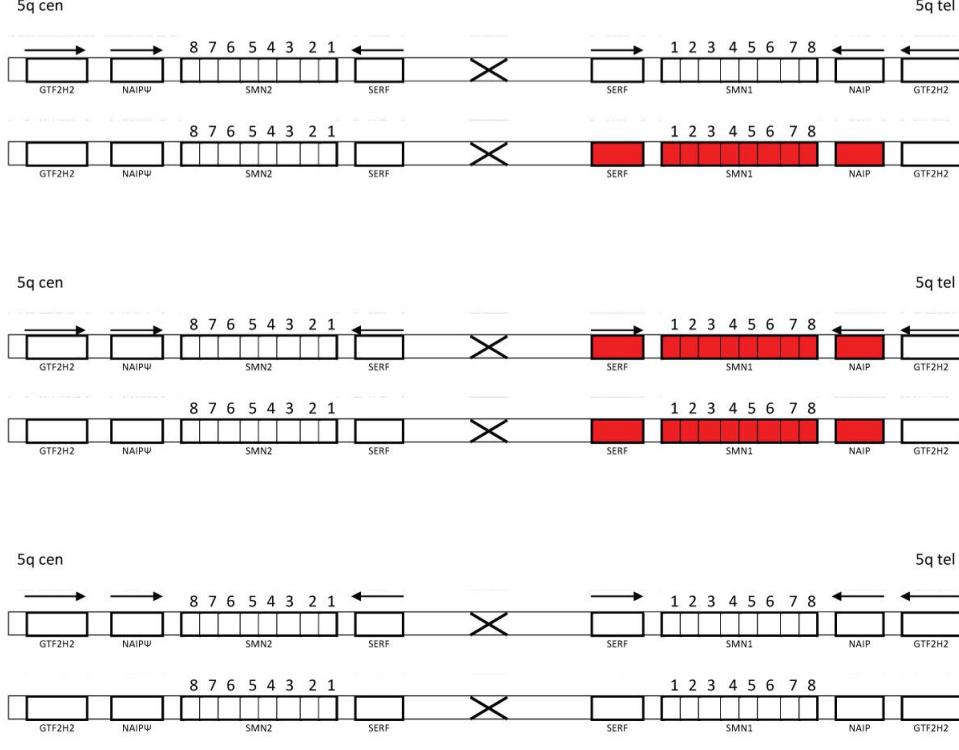
Bolesnik WH404



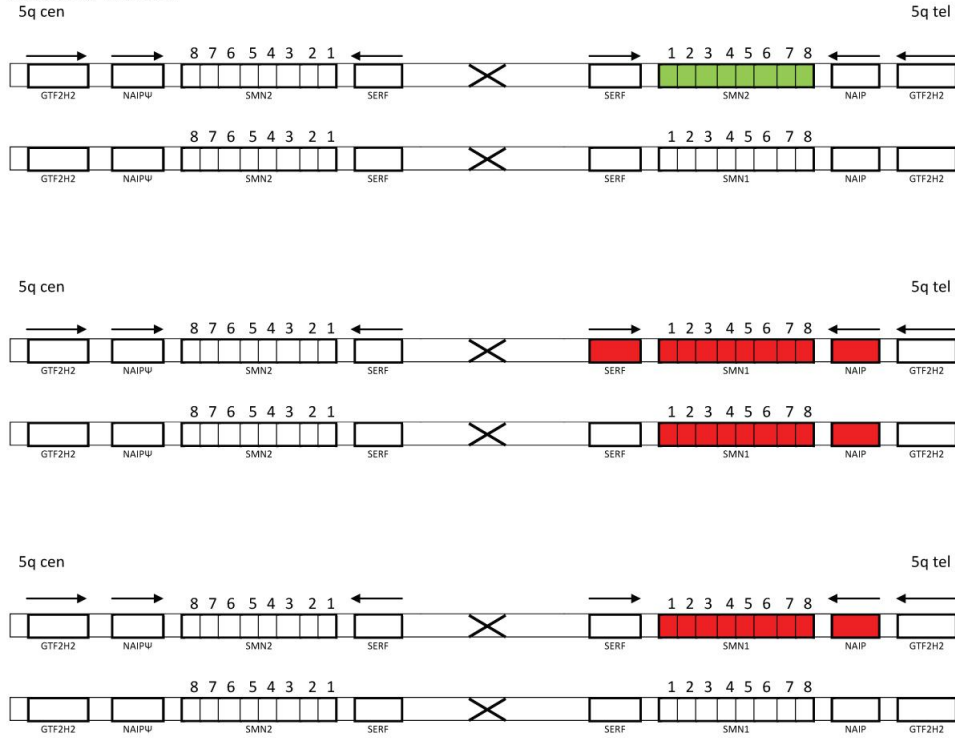
Bolesnik WH409



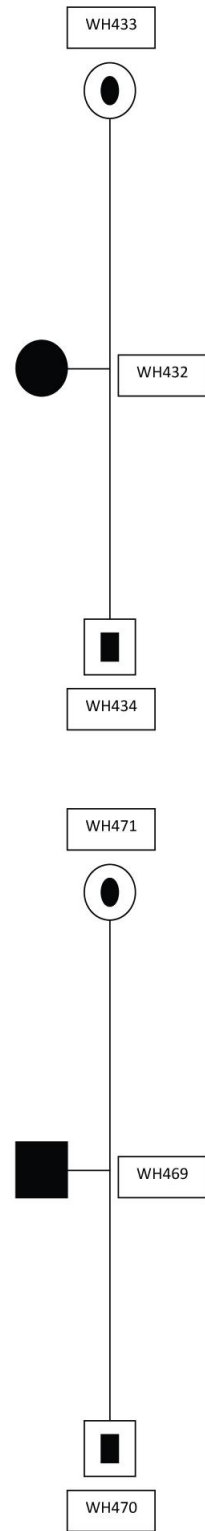
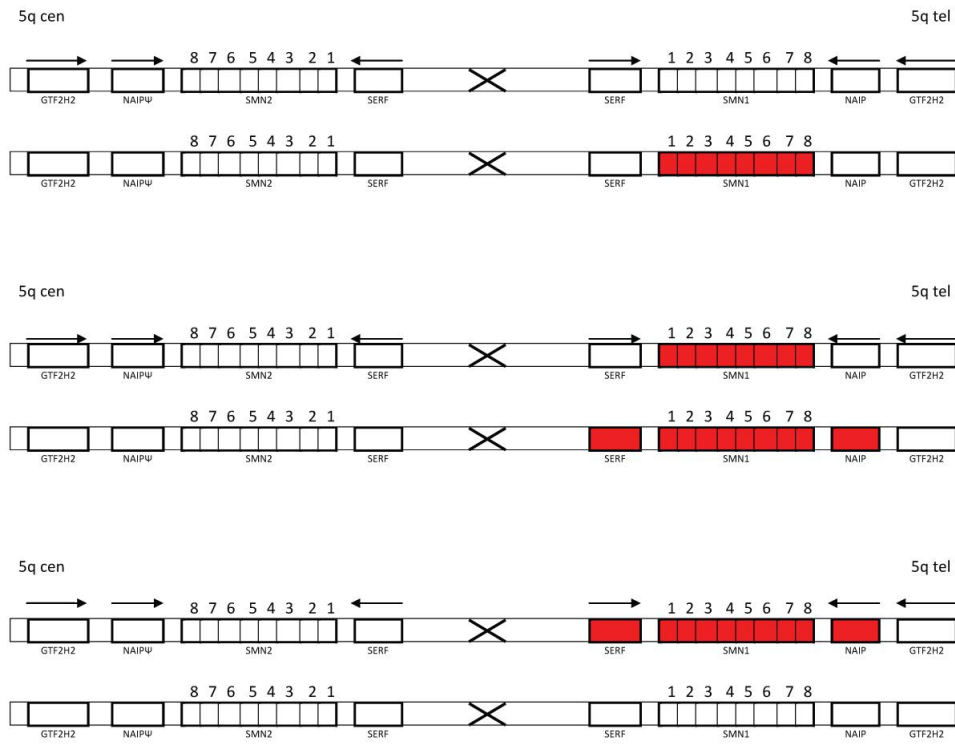
Bolesnik WH427



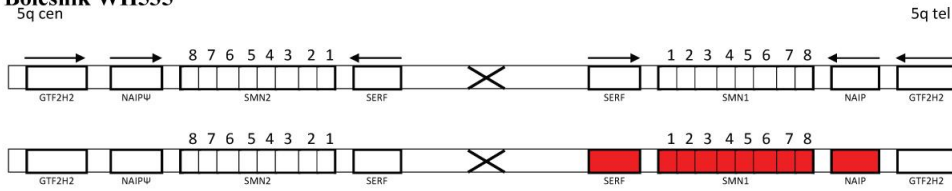
Bolesnik WH432



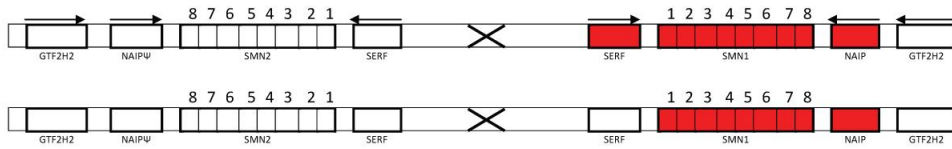
Bolesnik WH469



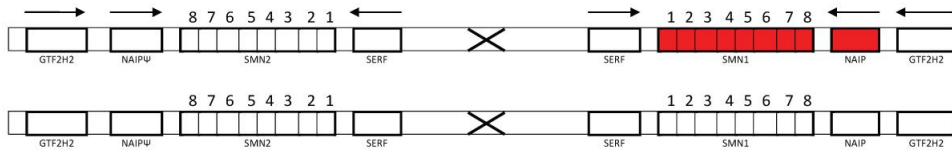
Bolesnik WH535
5q cen



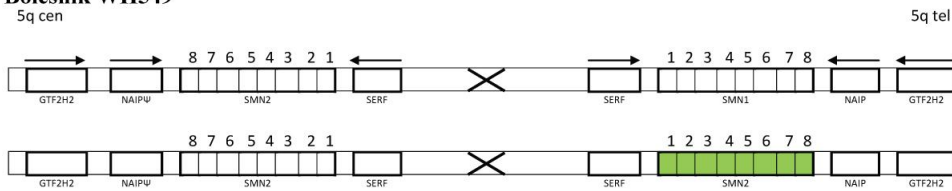
5q cen



5q cen

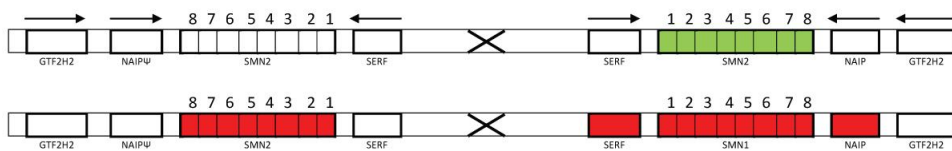


Bolesnik WH549
5q cen

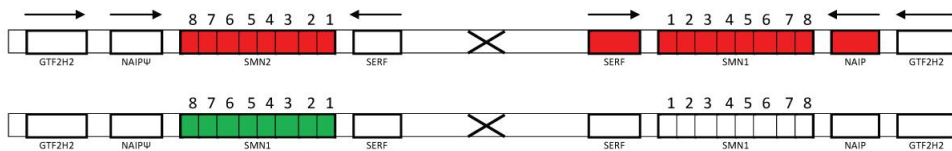


Konverzija SMN1 u SMN2

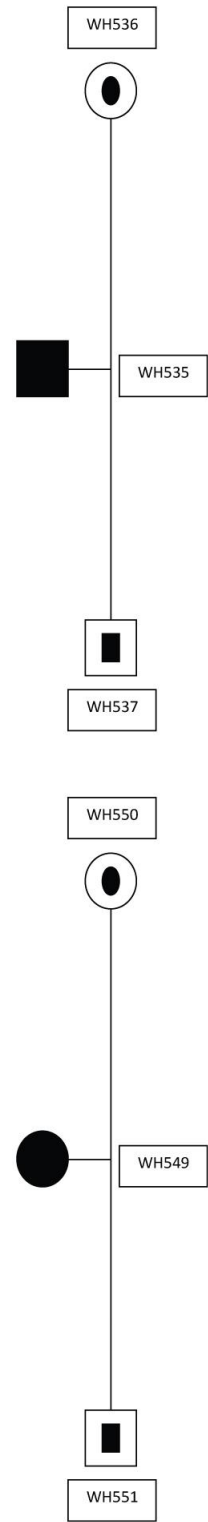
5q cen



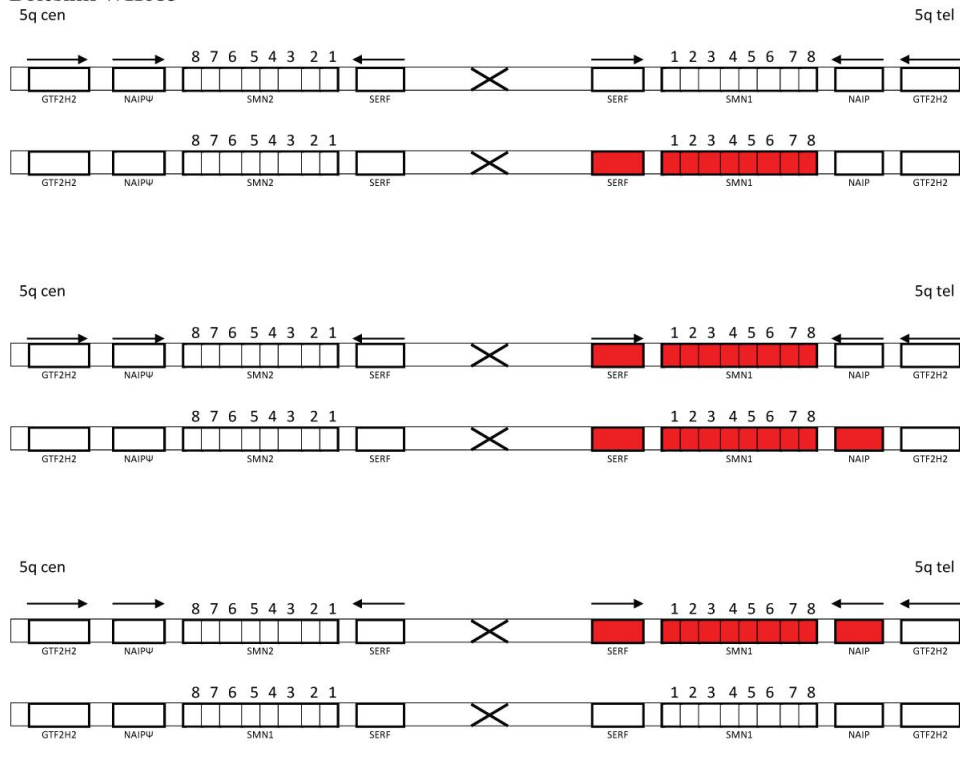
5q cen



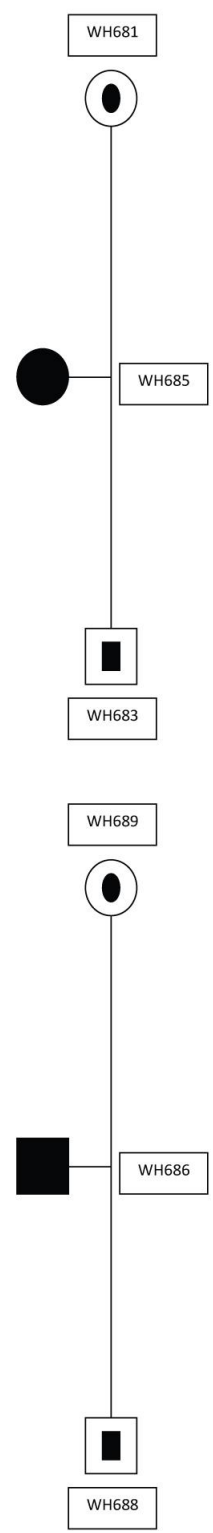
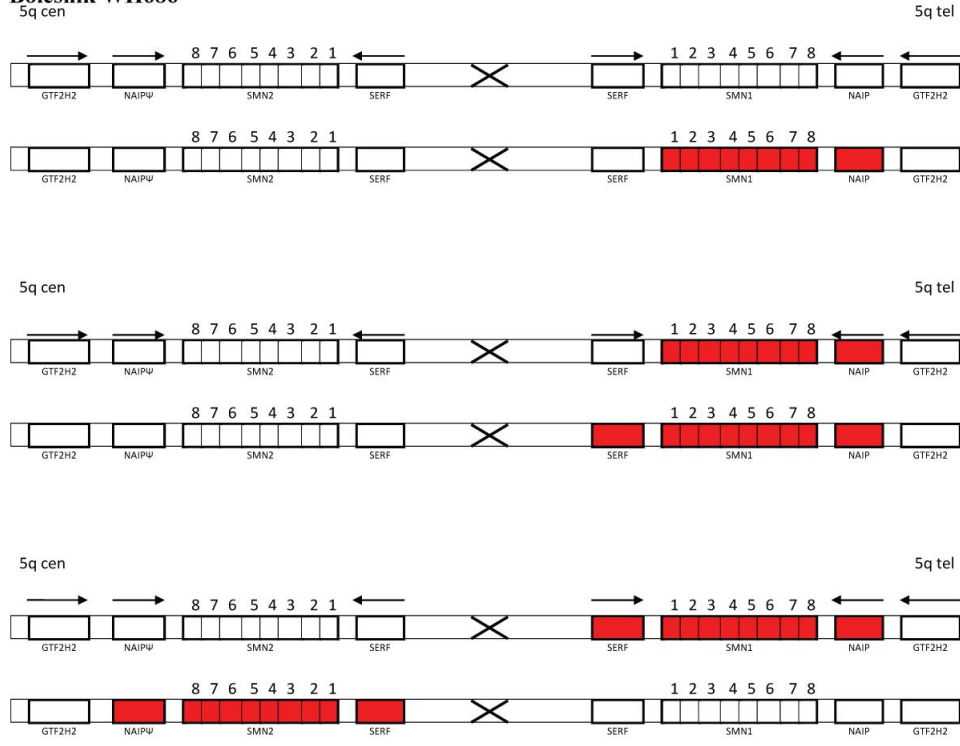
konverzija SMN2 u SMN1



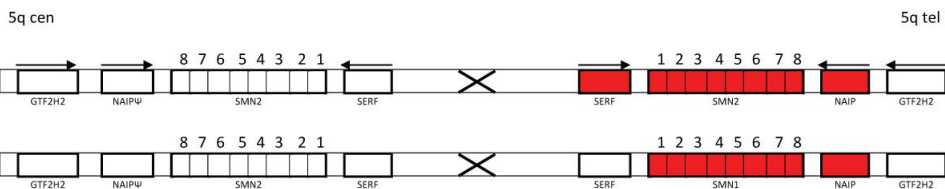
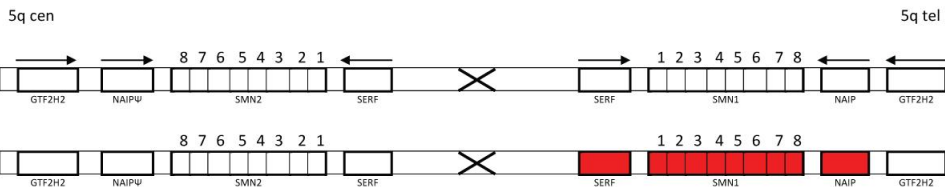
Bolesnik WH685



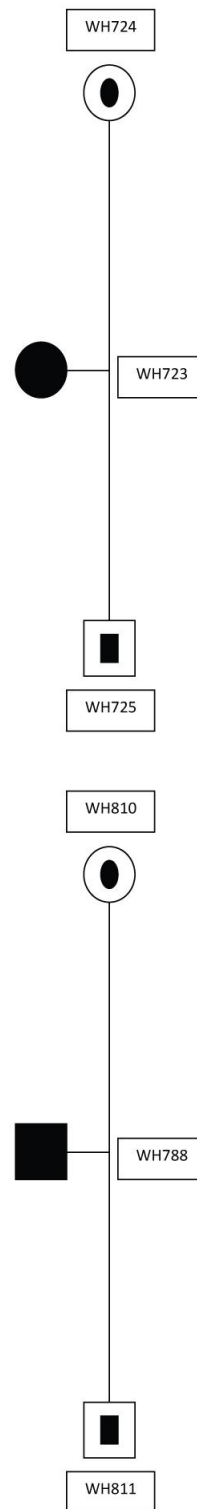
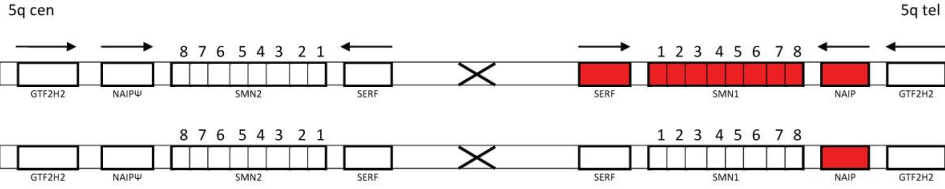
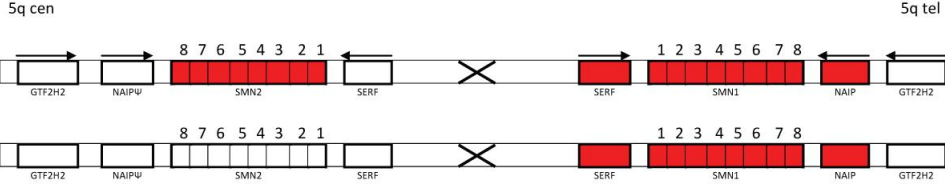
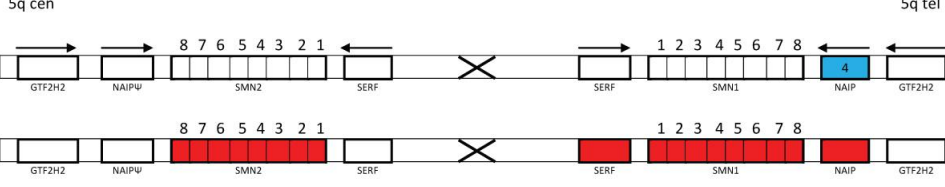
Bolesnik WH686



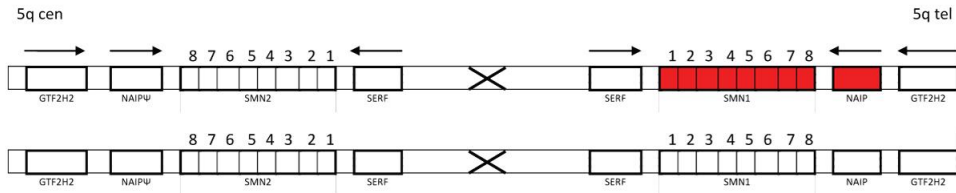
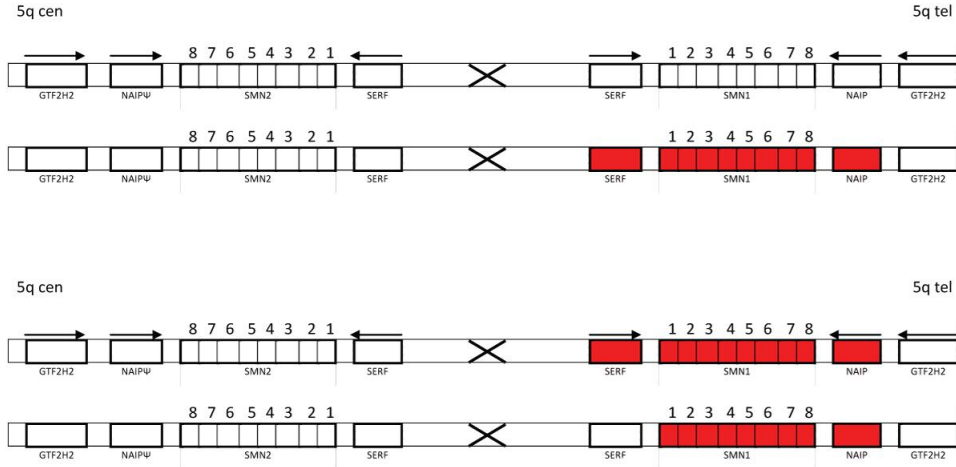
Bolesnik WH723



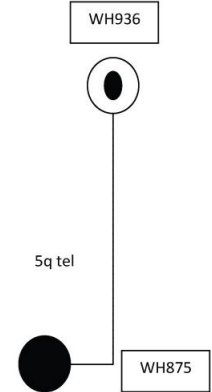
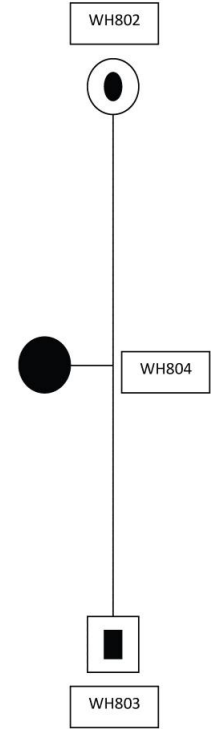
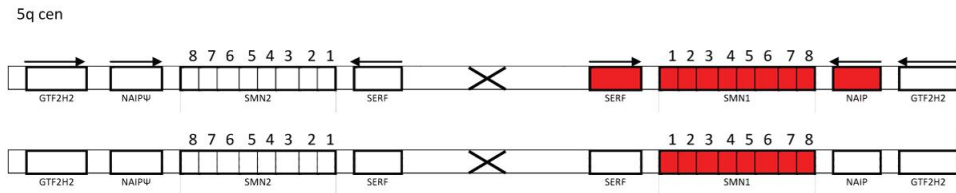
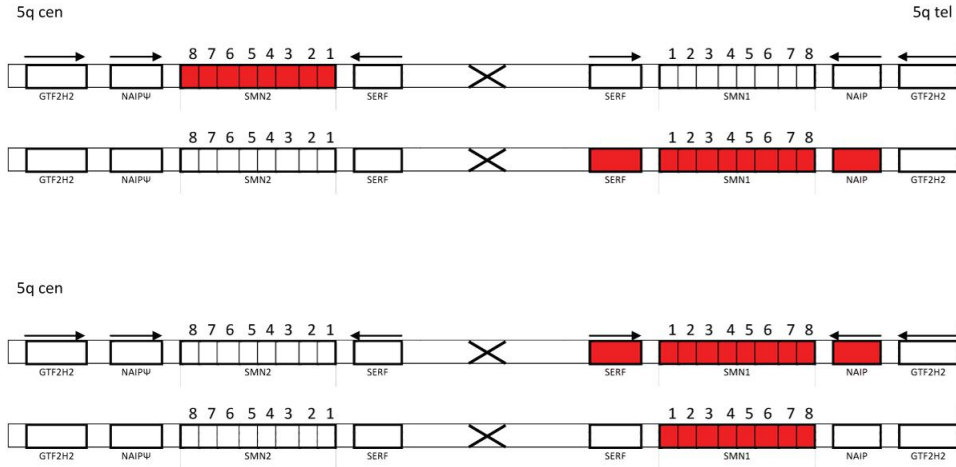
Bolesnik WH788



Bolesnik WH804

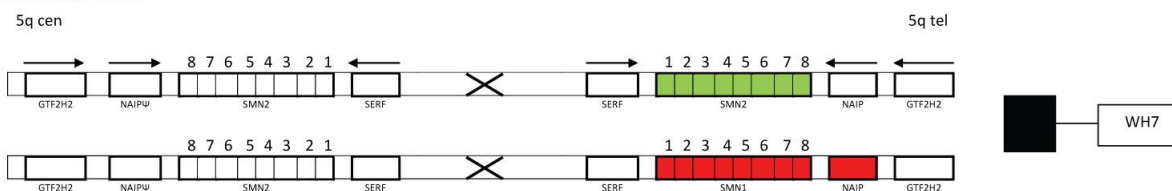


Bolesnik WH875

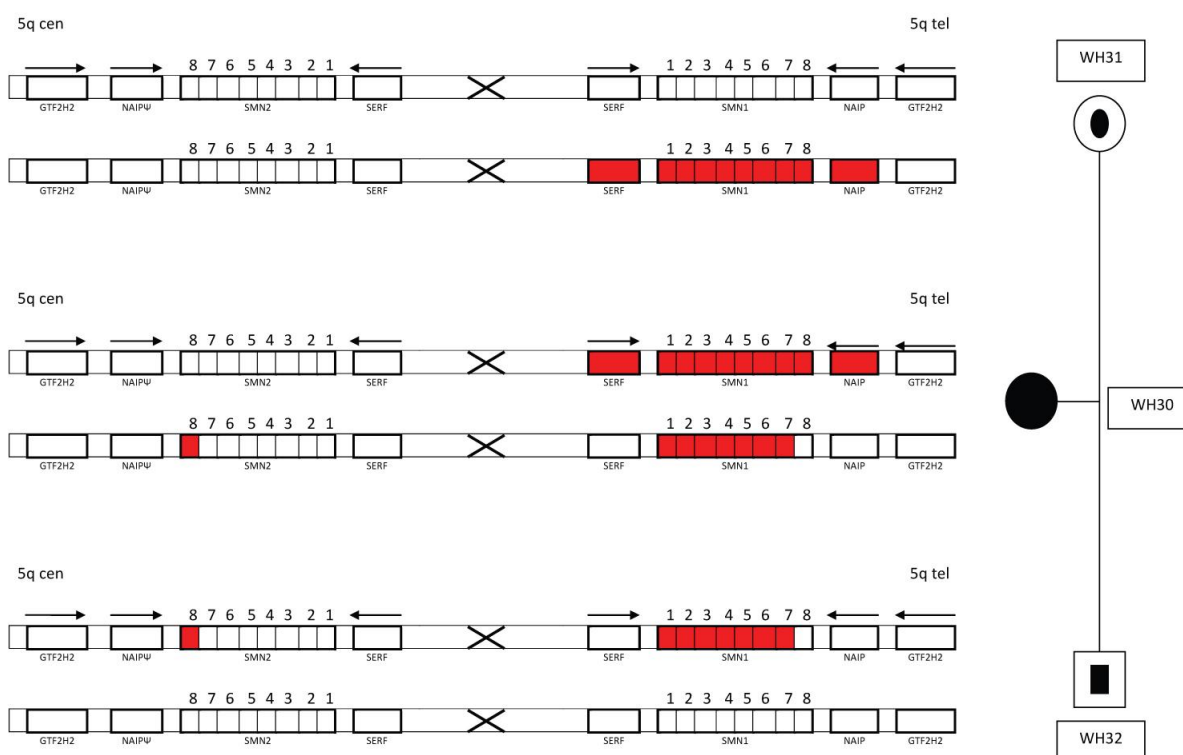


8.3.2. Strukture segmentalne suplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom II

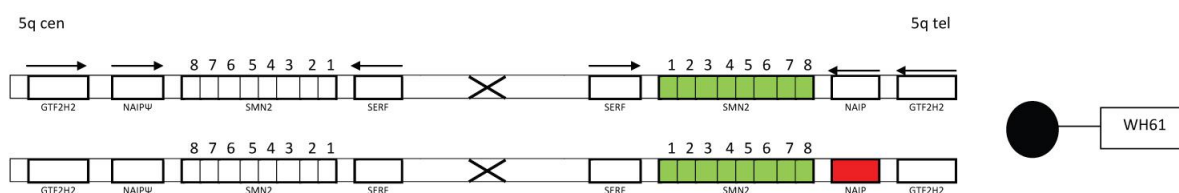
Bolesnik WH7



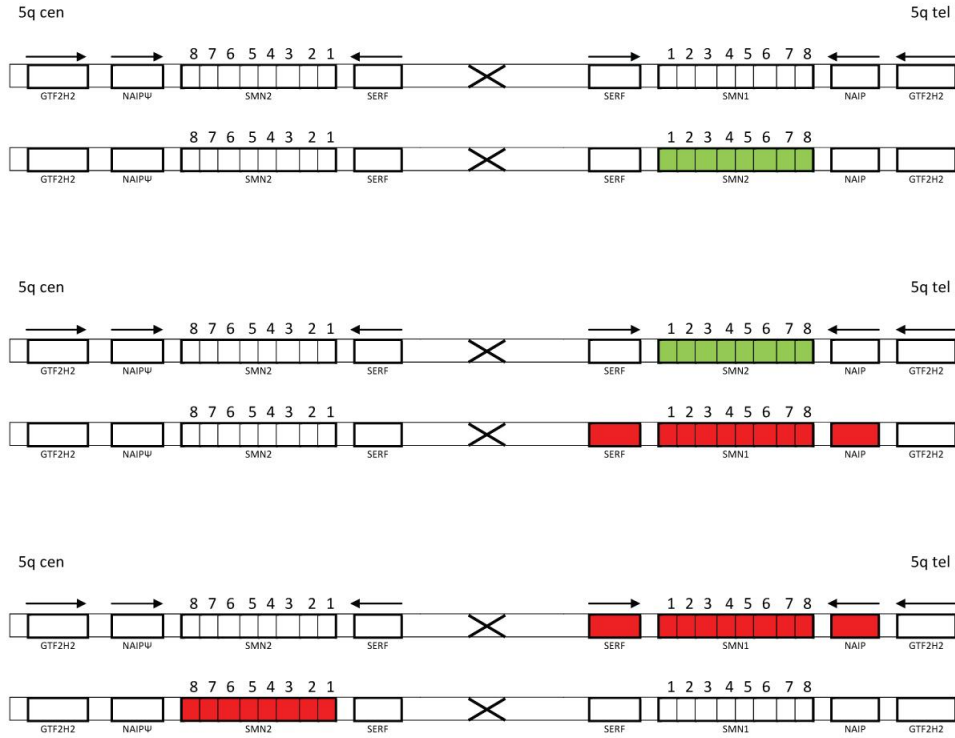
Bolesnik WH30



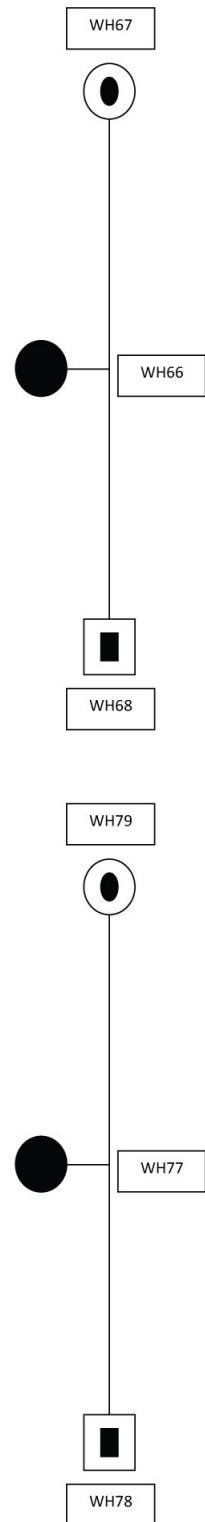
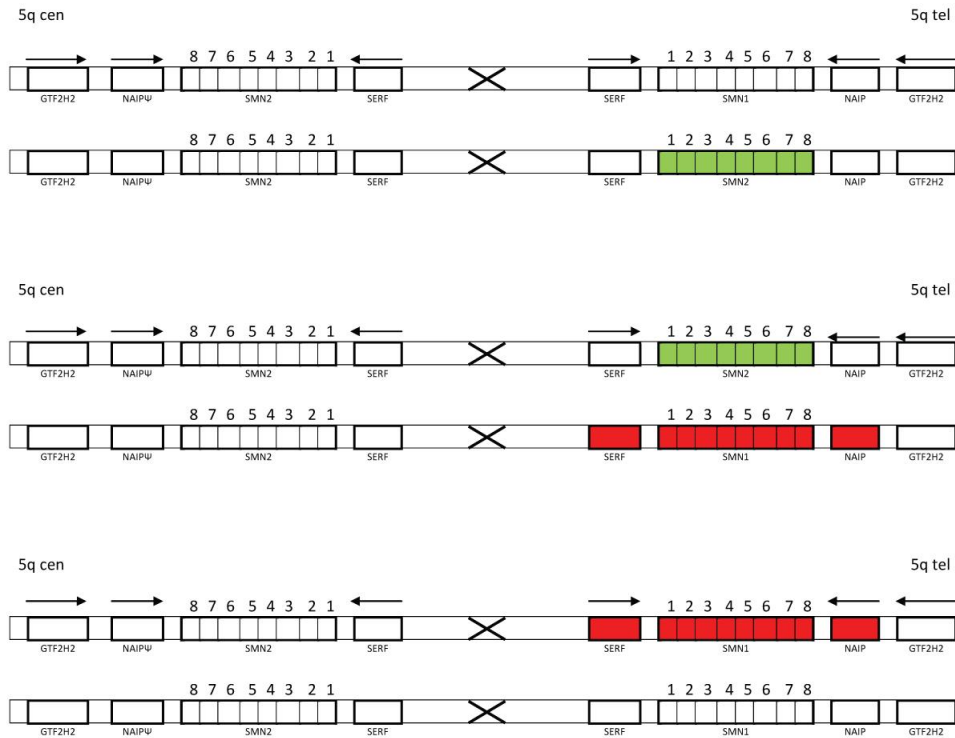
Bolesnik WH61



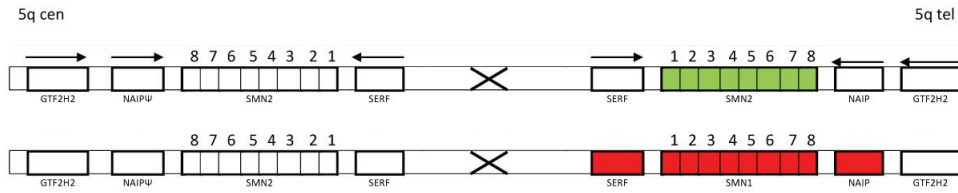
Bolesnik WH66



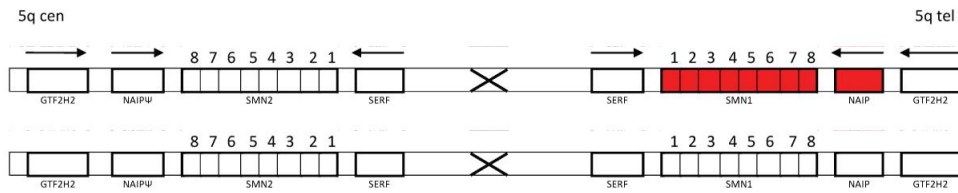
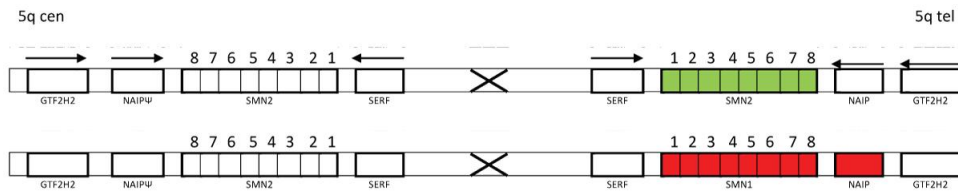
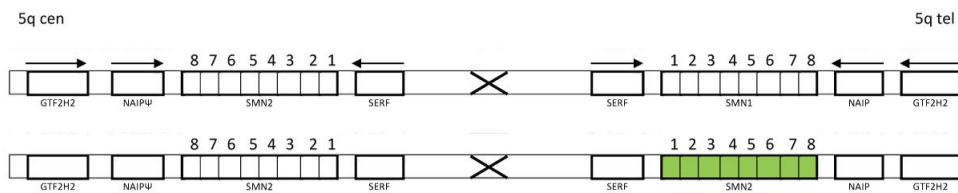
Bolesnik WH77



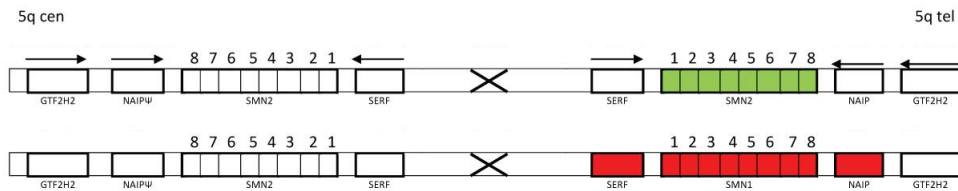
Bolesnik WH113



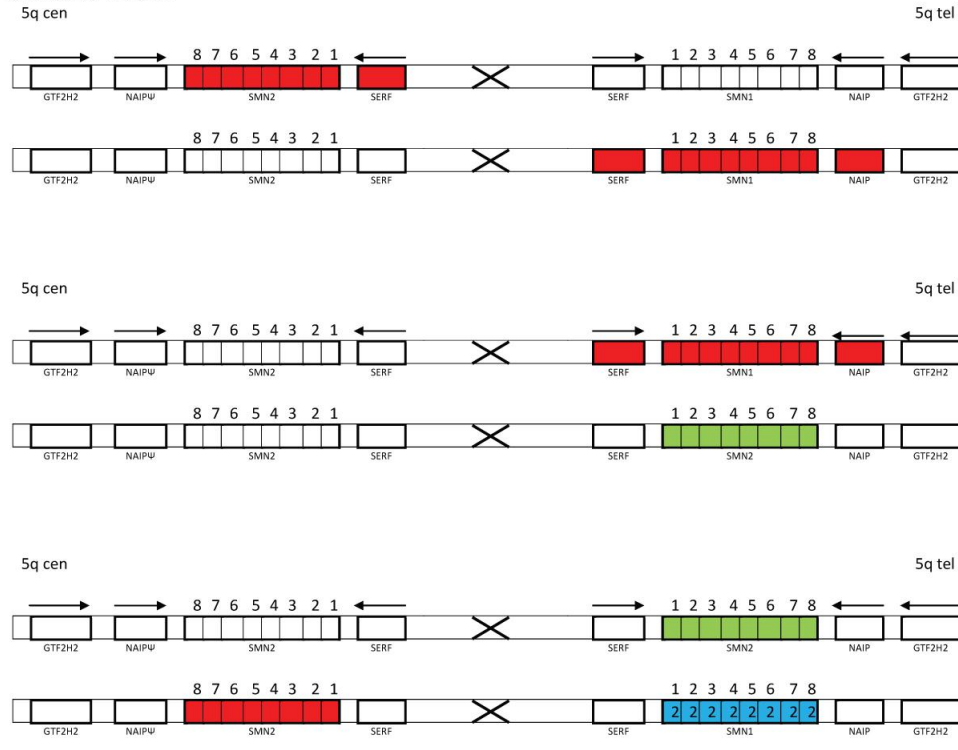
Bolesnik WH121



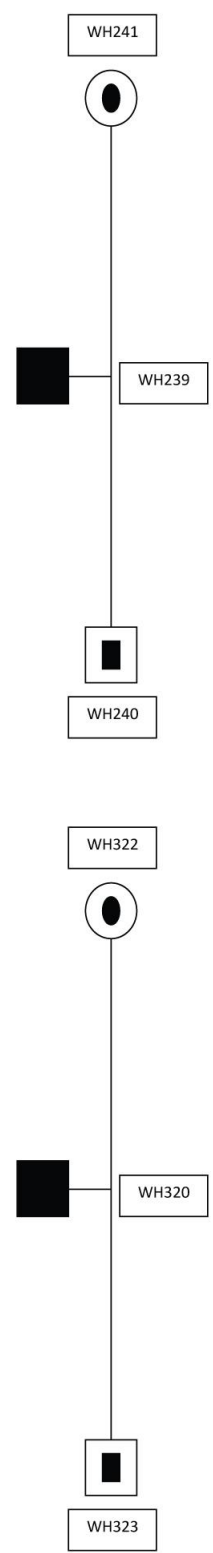
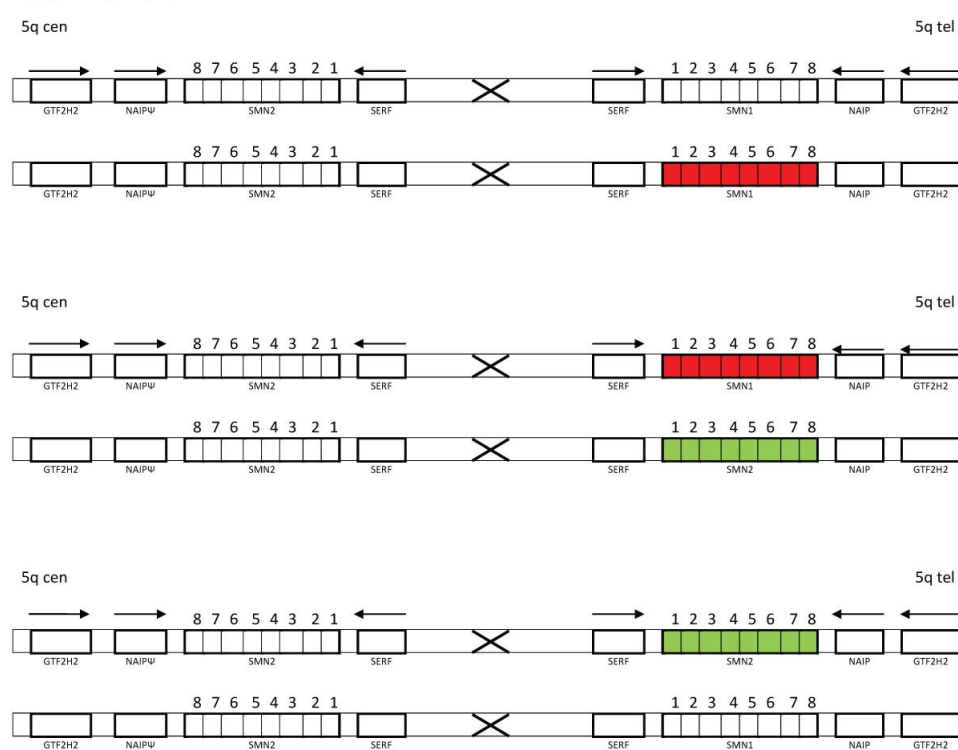
Bolesnik WH235



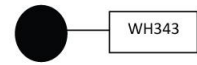
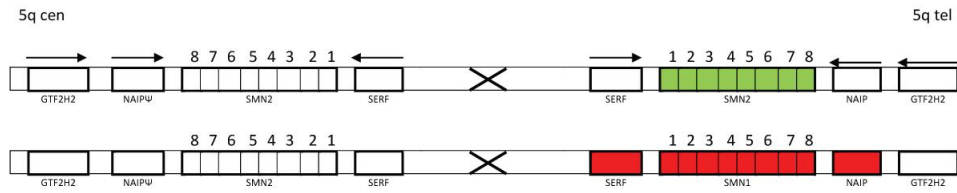
Bolesnik WH239



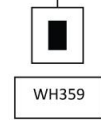
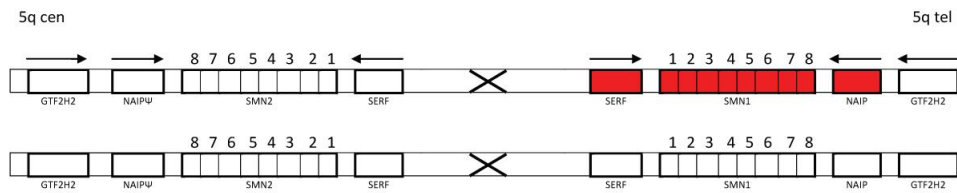
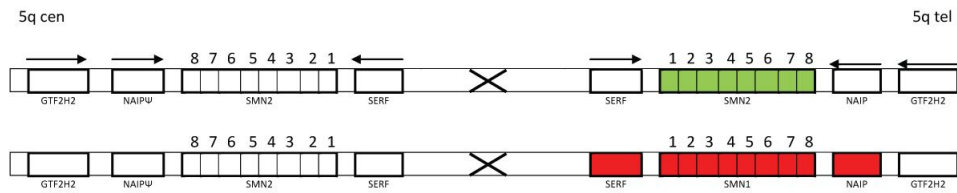
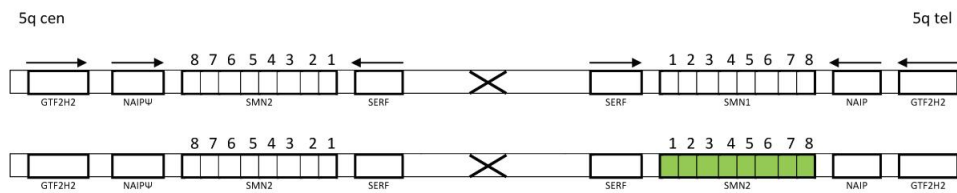
Bolesnik WH320



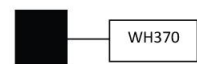
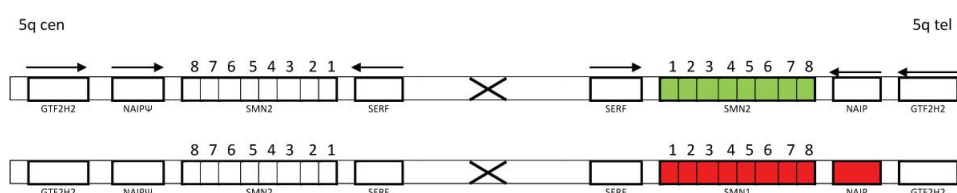
Bolesnik WH343



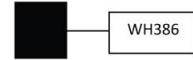
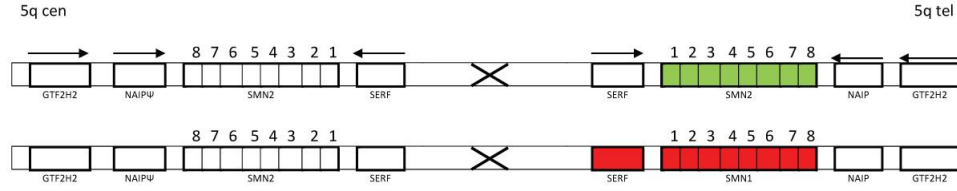
Bolesnik WH356



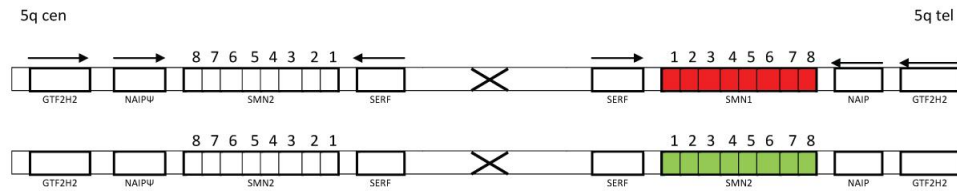
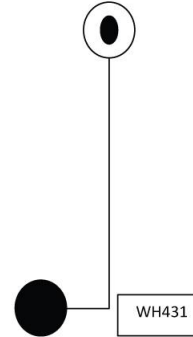
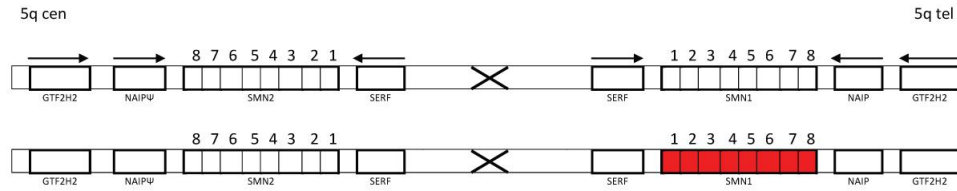
Bolesnik WH370



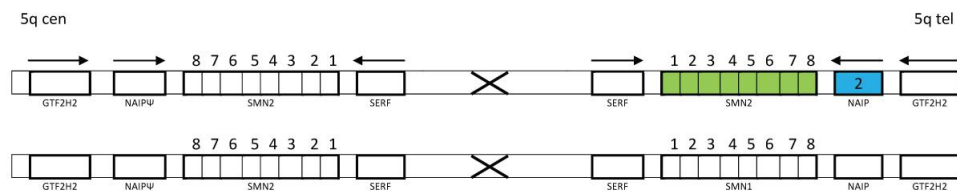
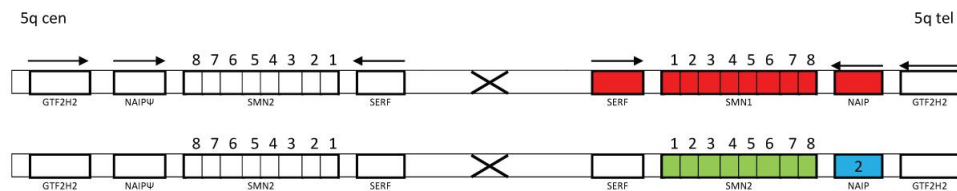
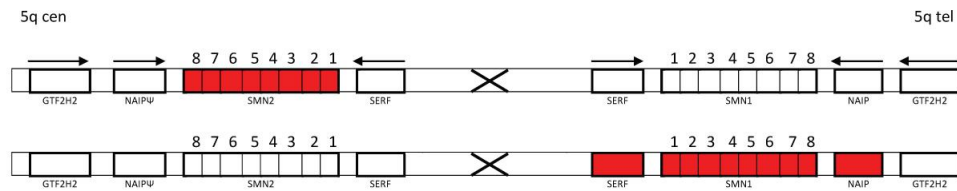
Bolesnik WH386



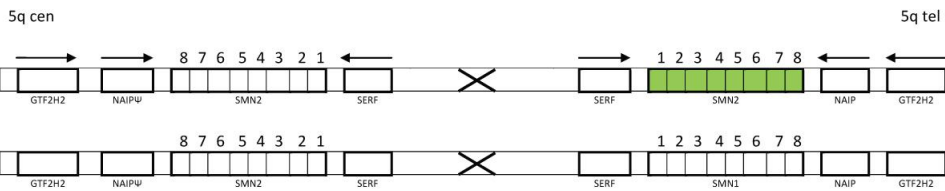
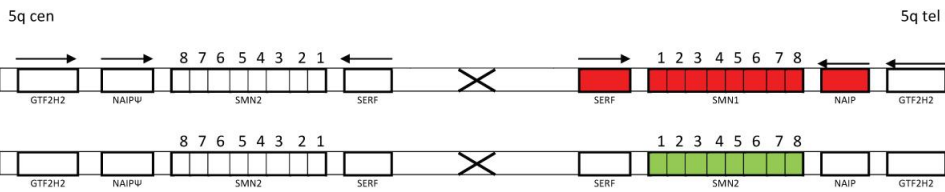
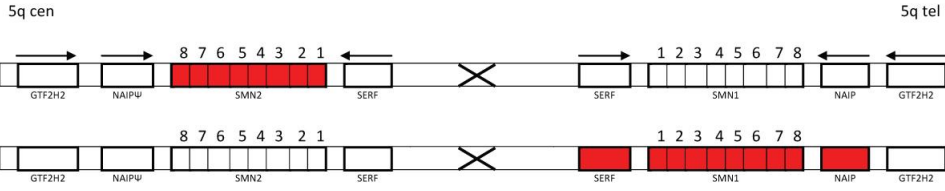
Bolesnik WH431



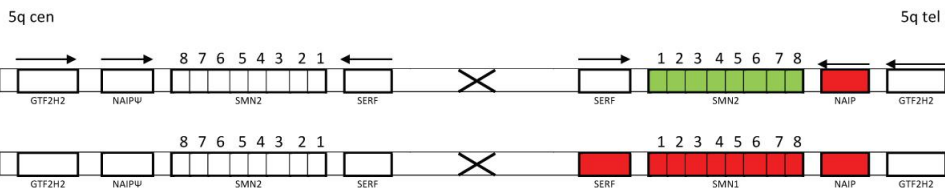
Bolesnik WH452



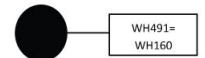
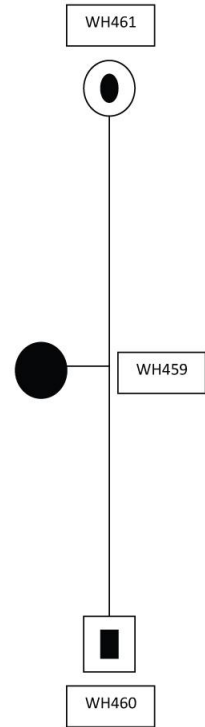
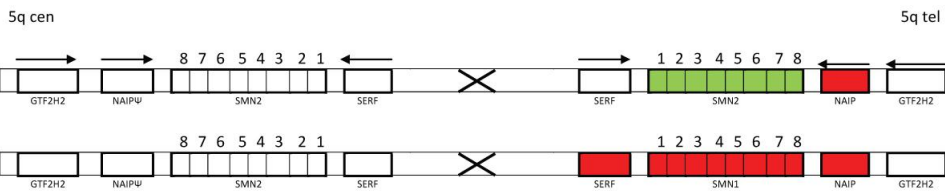
Bolesnik WH459



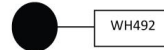
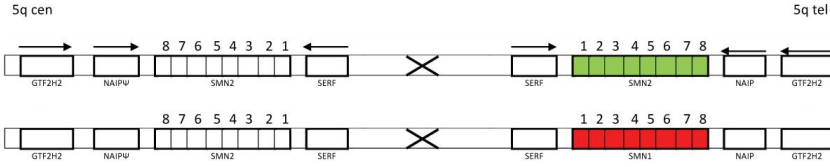
Bolesnik WH490



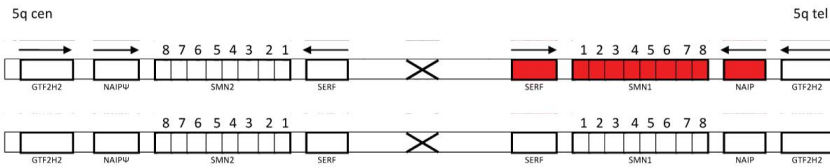
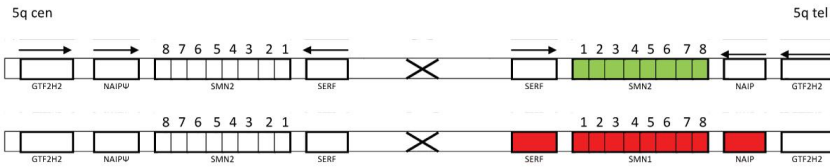
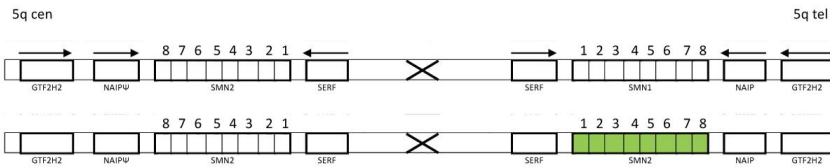
Bolesnik WH491



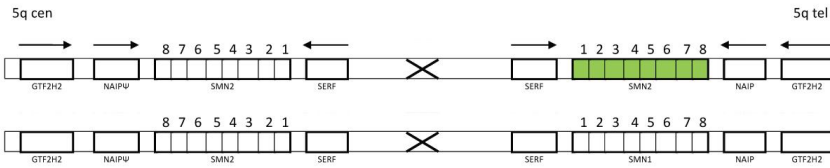
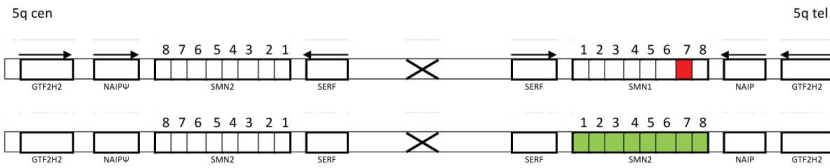
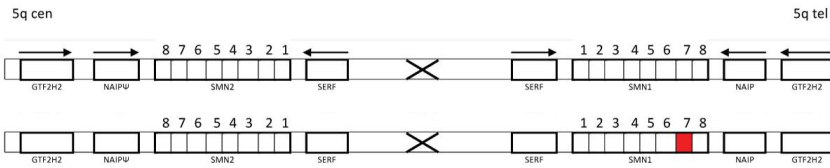
Bolesnik WH492



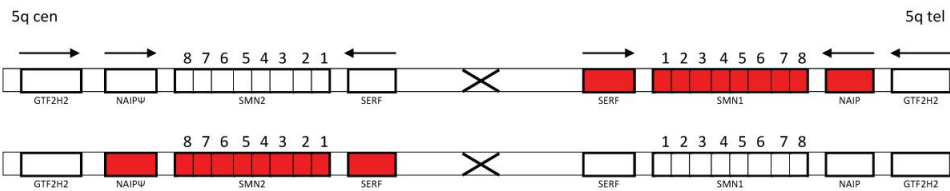
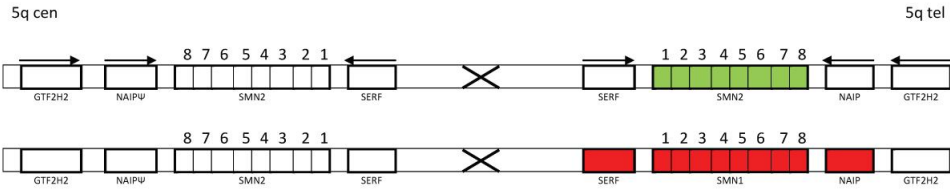
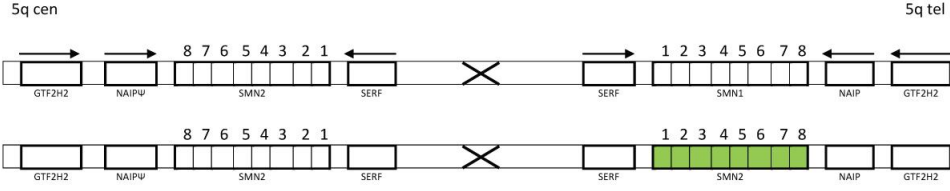
Bolesnik WH568



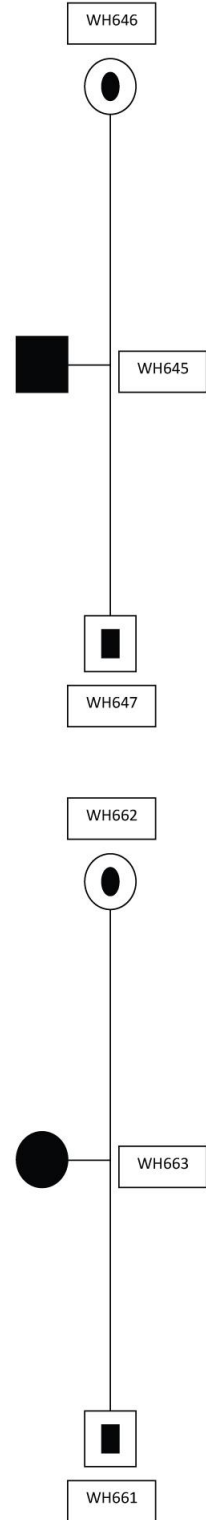
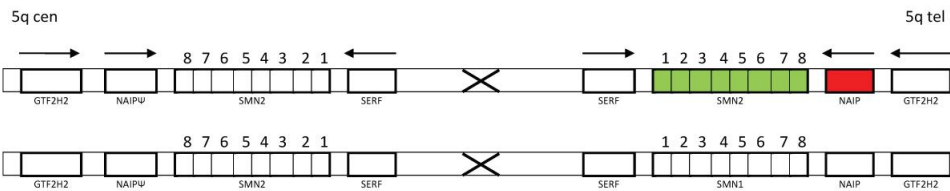
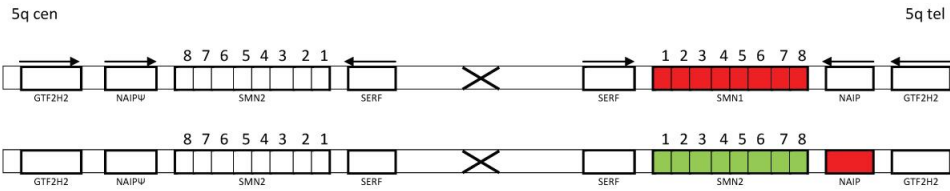
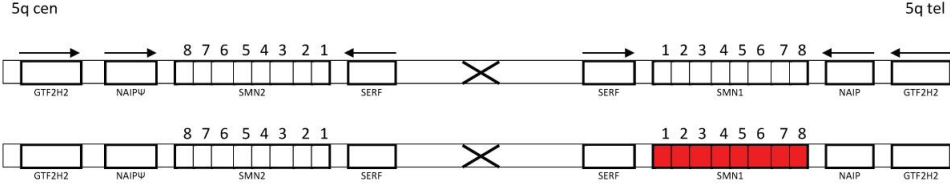
Bolesnik WH606



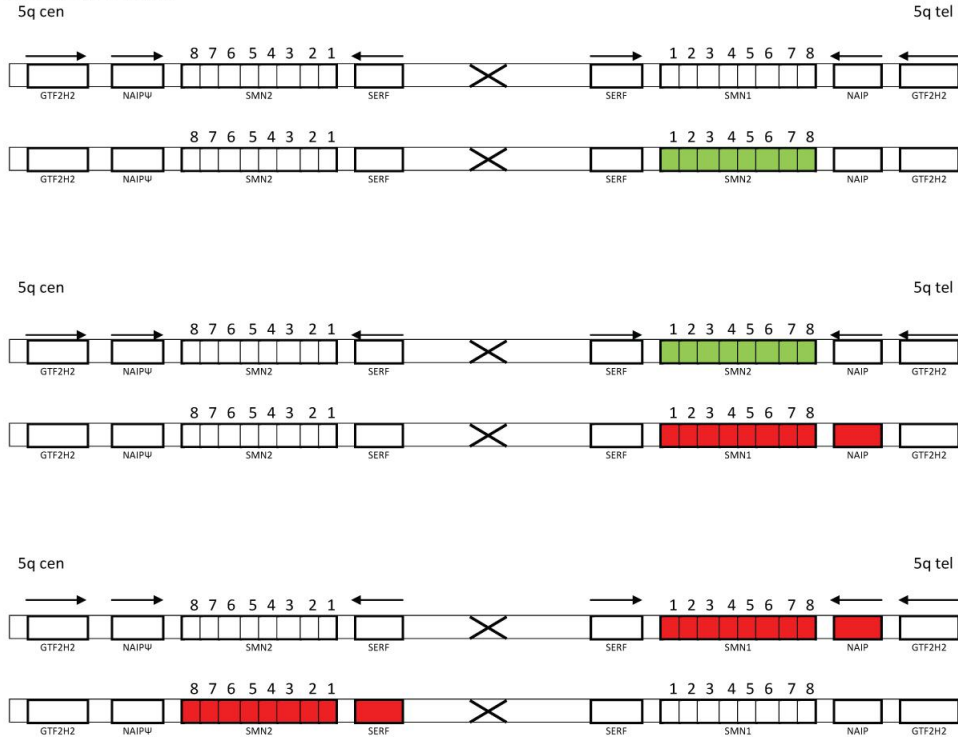
Bolesnik WH645



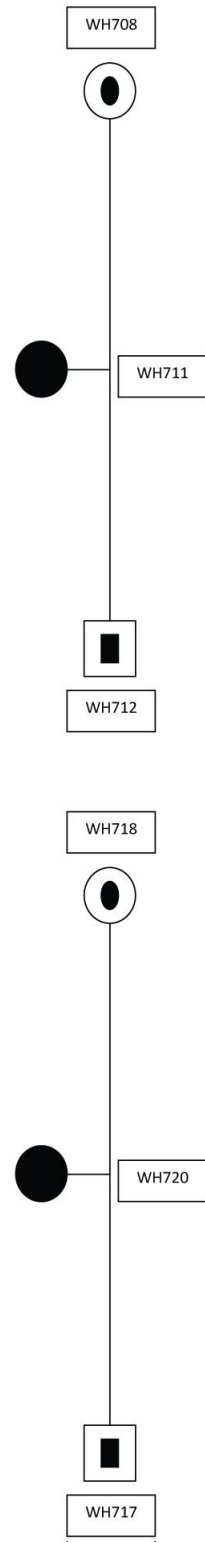
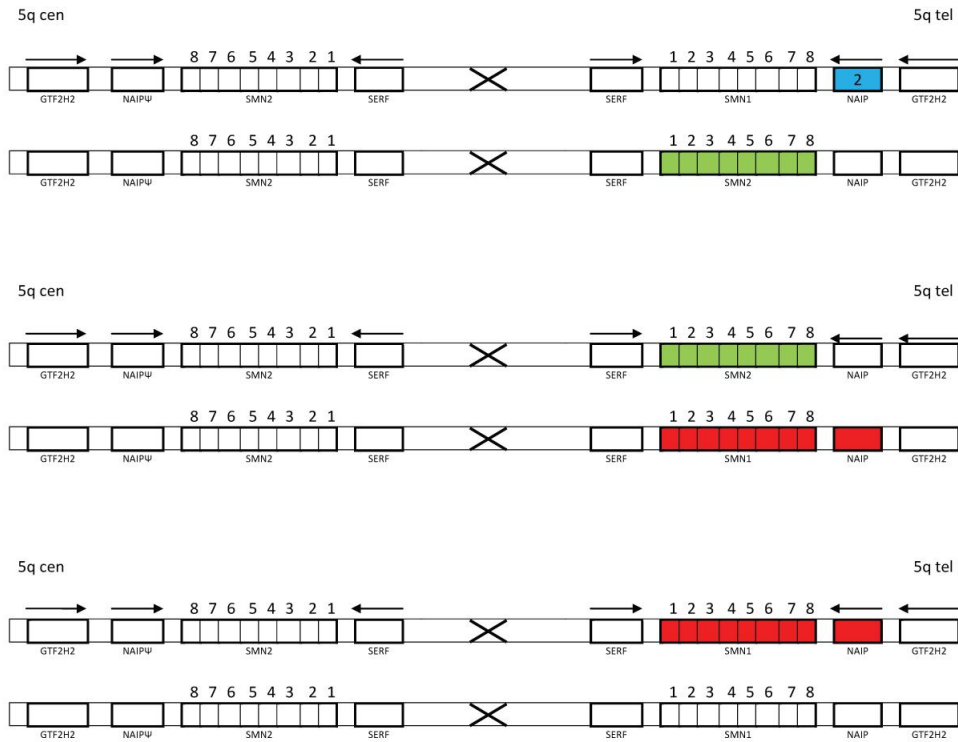
Bolesnik WH663



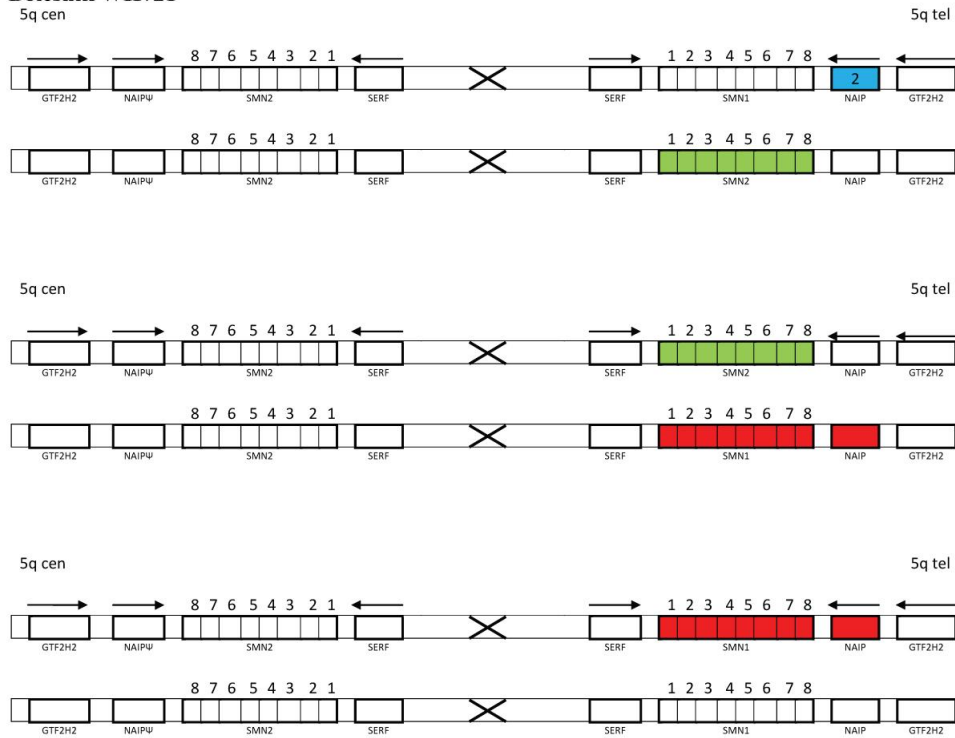
Bolesnik WH711



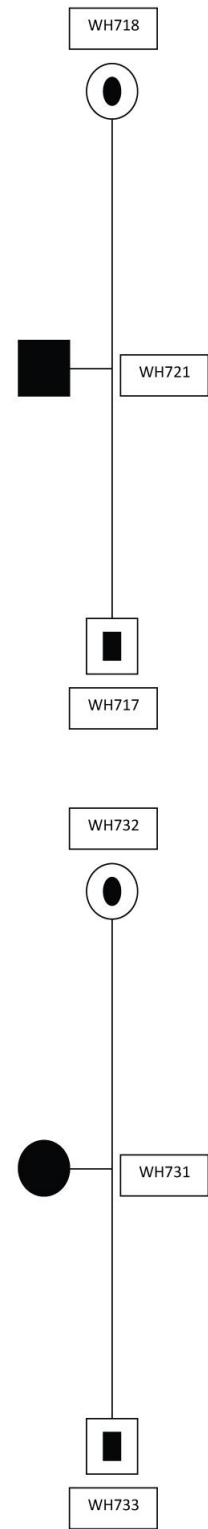
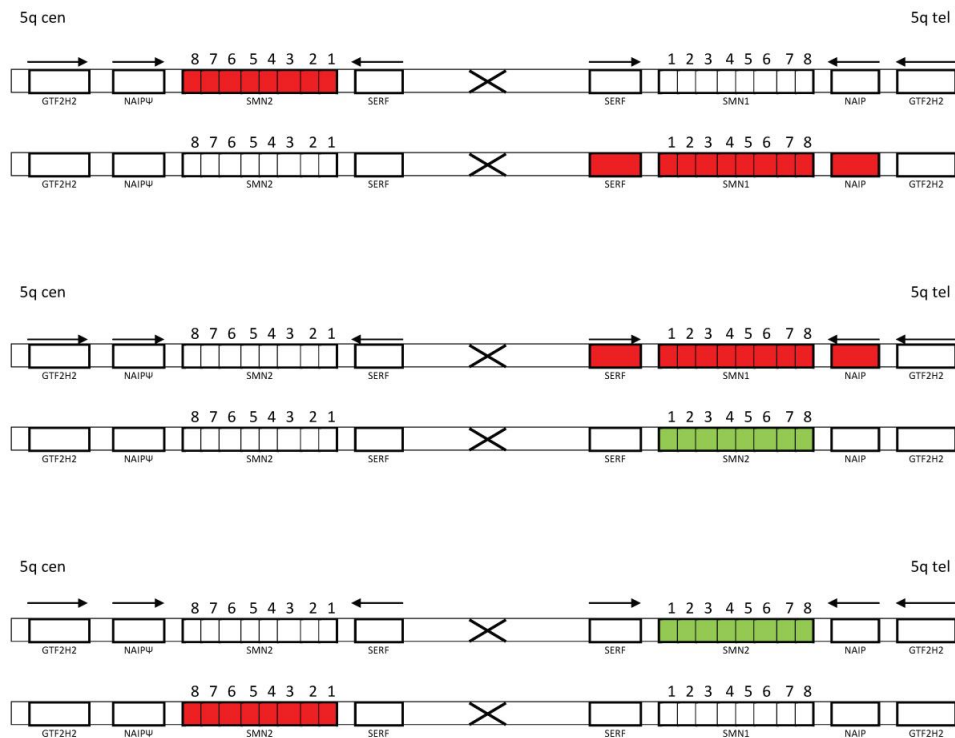
Bolesnik WH720



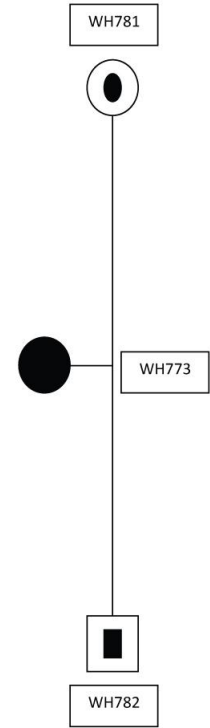
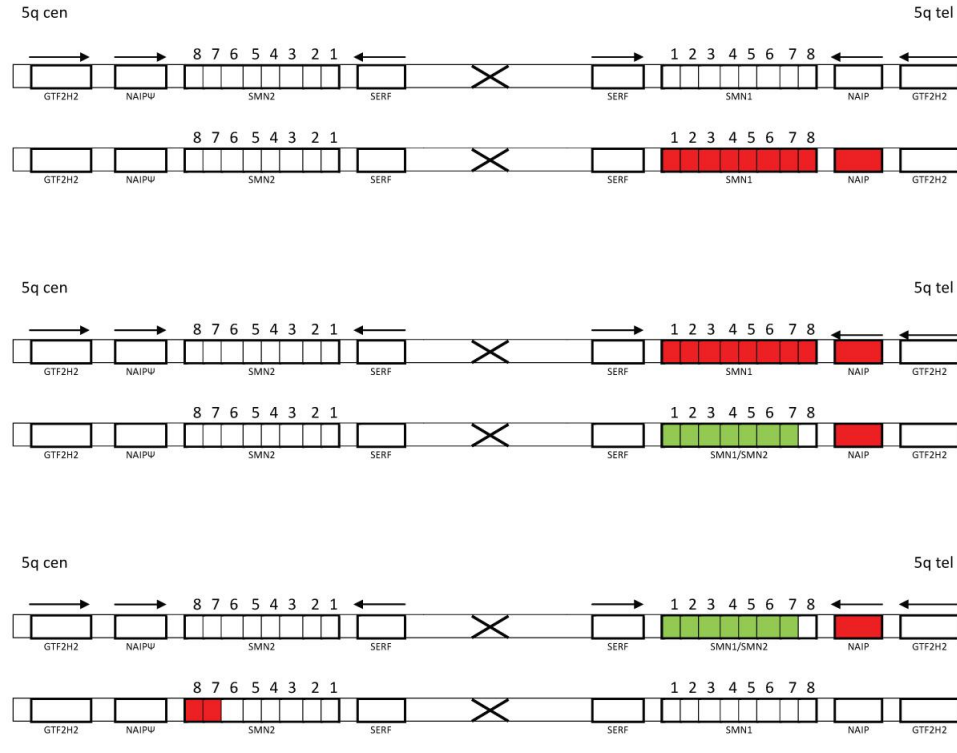
Bolesnik WH721



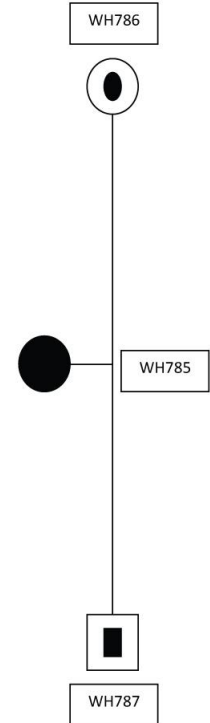
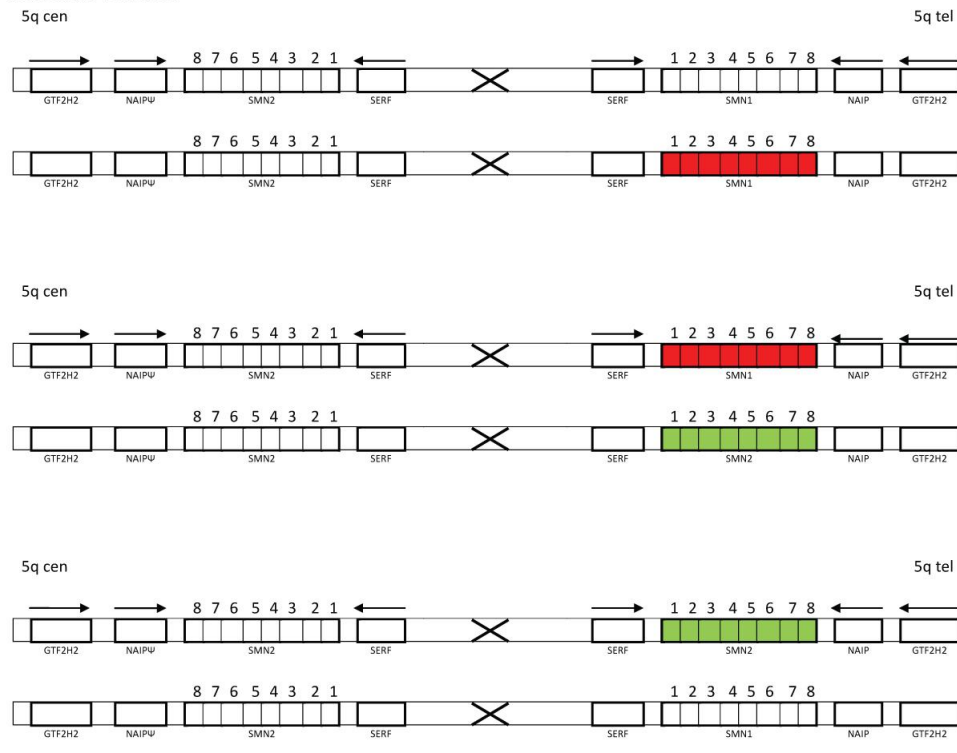
Bolesnik WH731



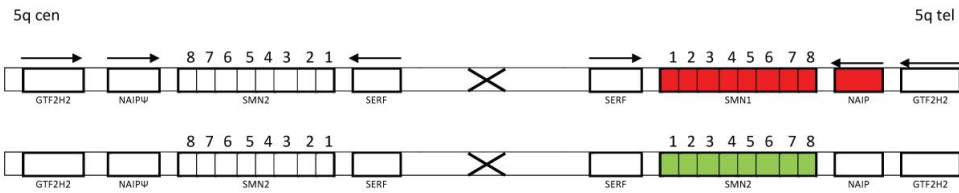
Bolesnik WH773



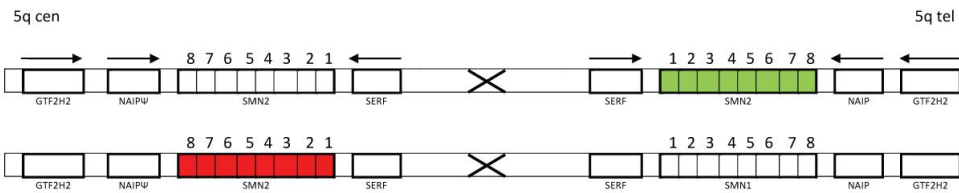
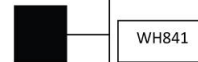
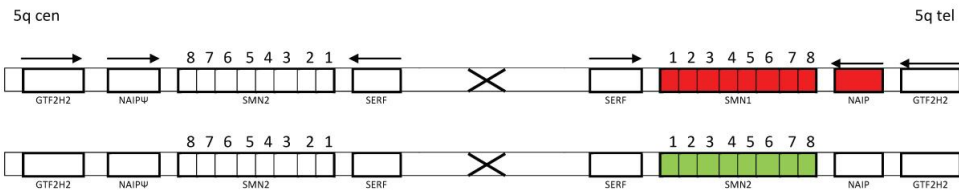
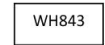
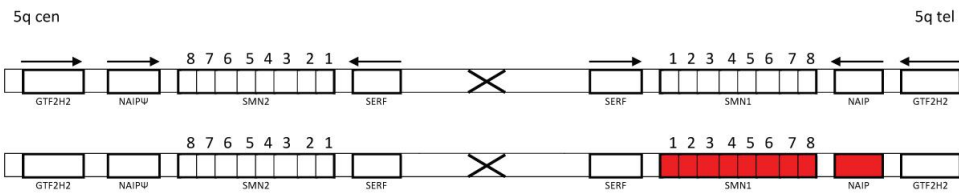
Bolesnik WH785



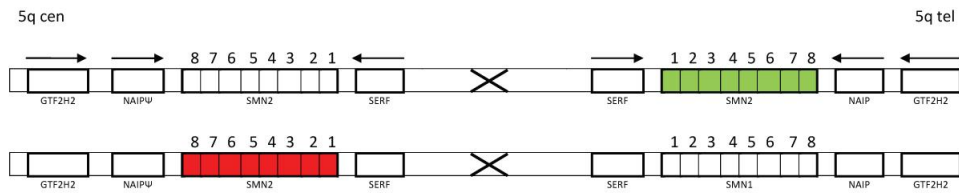
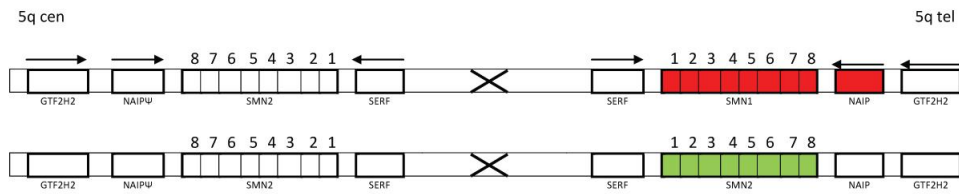
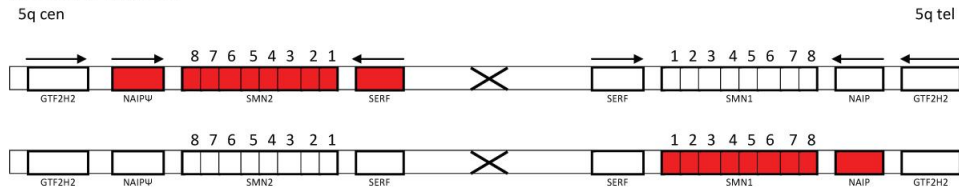
Bolesnik WH799



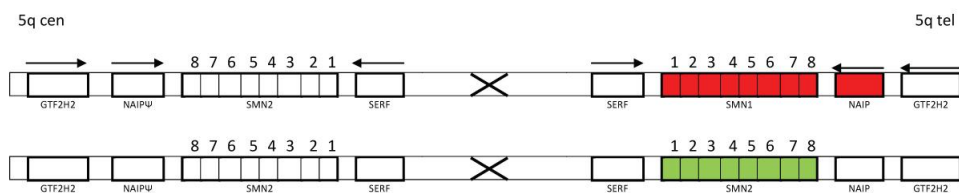
Bolesnik WH841



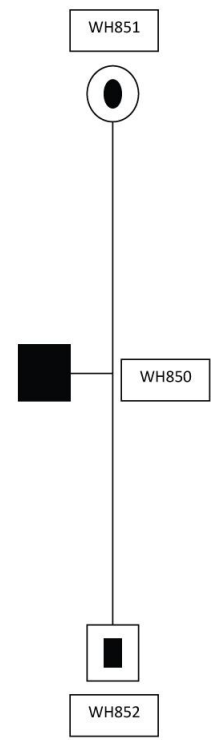
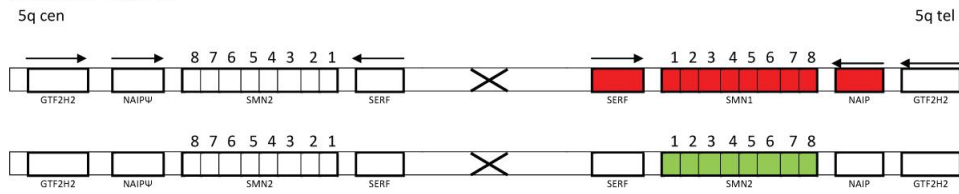
Bolesnik WH850



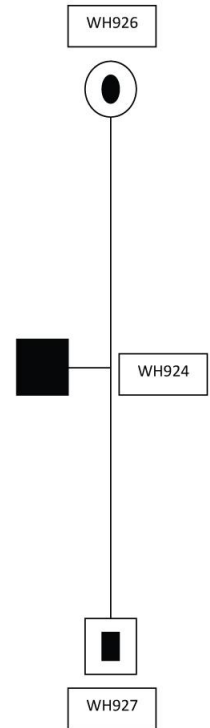
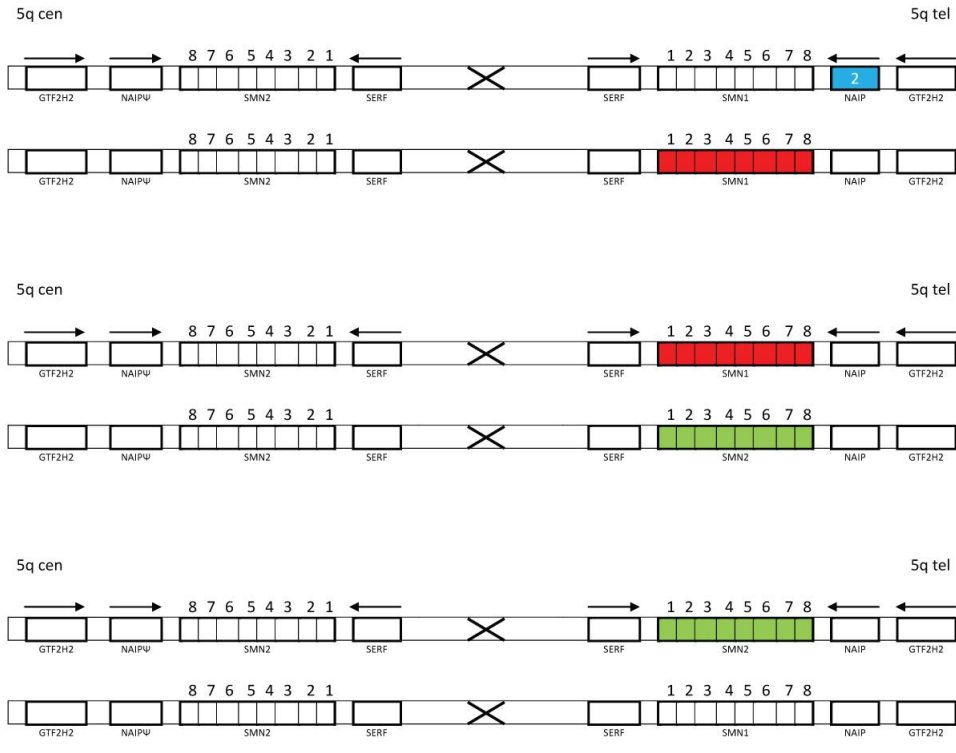
Bolesnik WH857



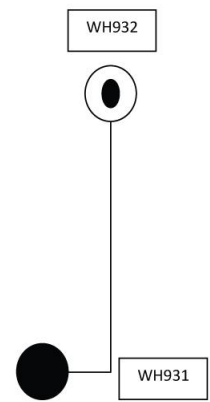
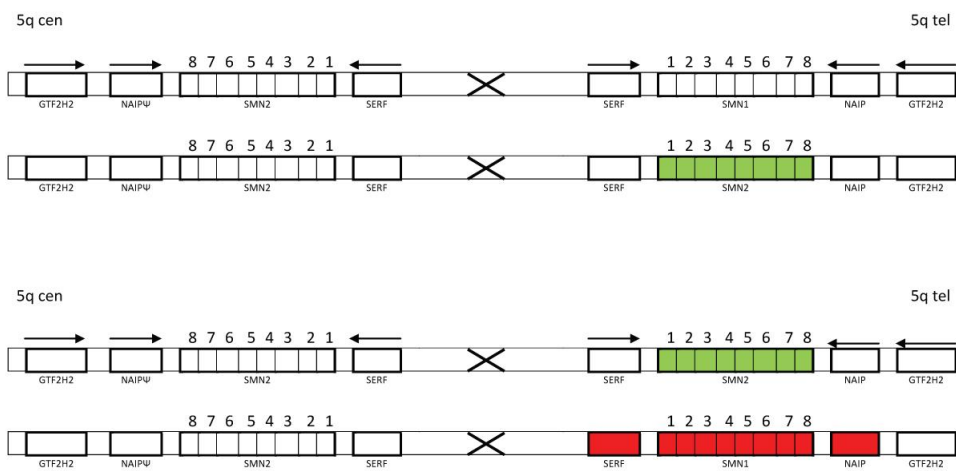
Bolesnik WH909



Bolesnik WH924



Bolesnik WH931

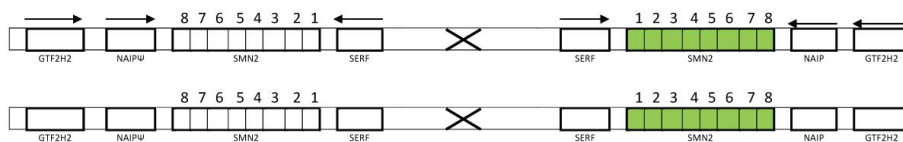


8.3.3. Strukture segmentalne suplikacije 5q13.2 kod bolesnika sa SMA tipom III

Bolesnik WH13

5q cen

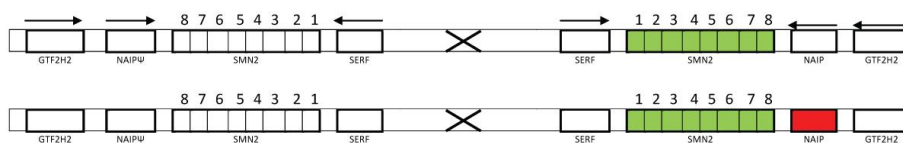
5q tel



Bolesnik WH37

5q cen

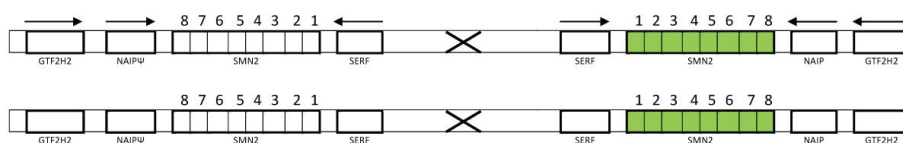
5q tel



Bolesnik WH54

5q cen

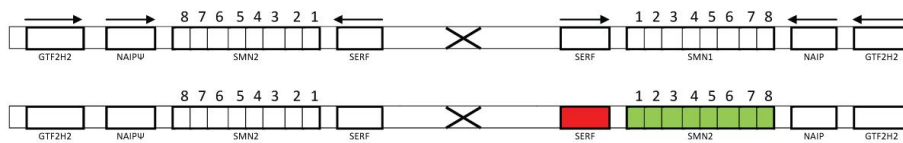
5q tel



Bolesnik WH82

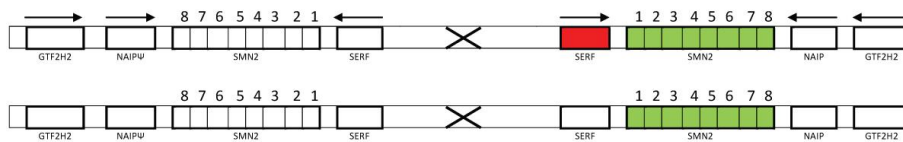
5q cen

5q tel



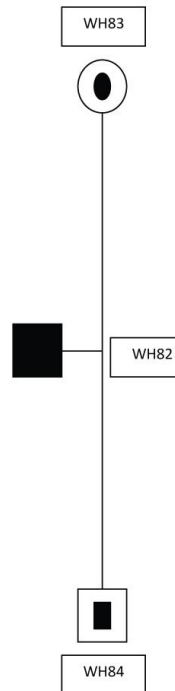
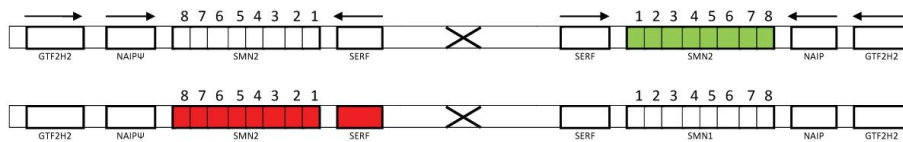
5q cen

5q tel

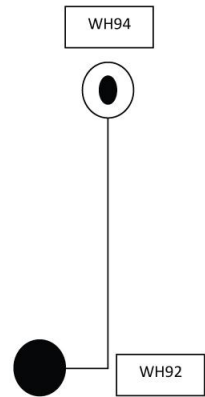
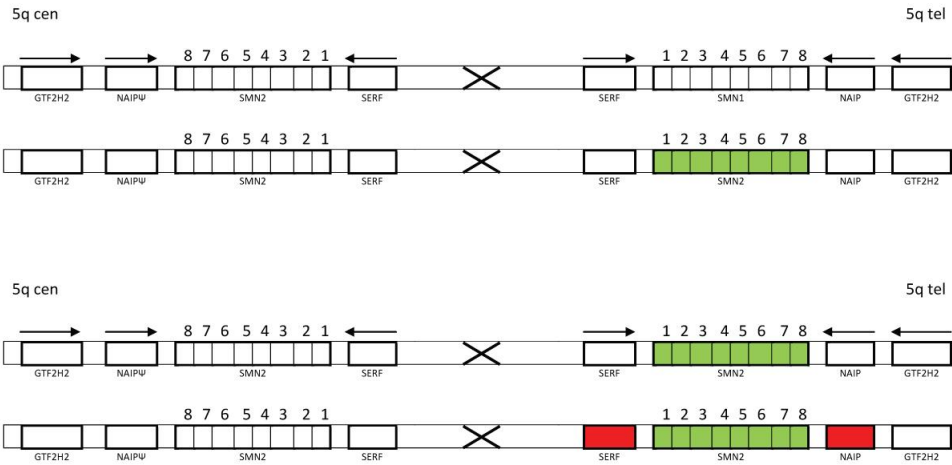


5q cen

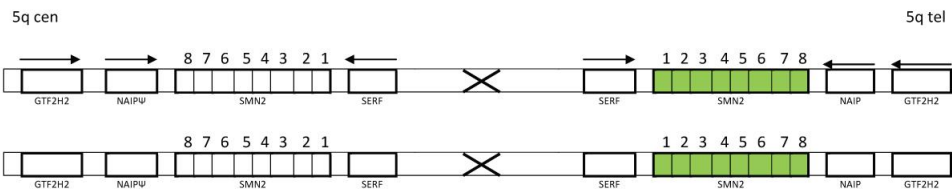
5q tel



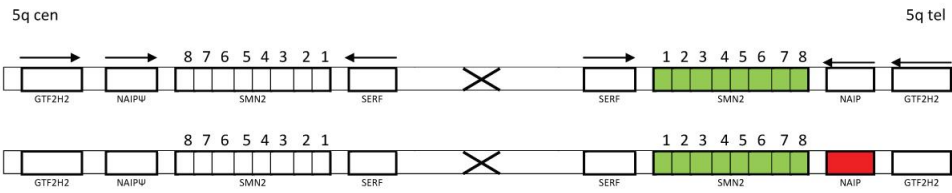
Bolesnik WH92



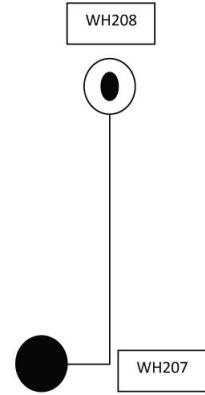
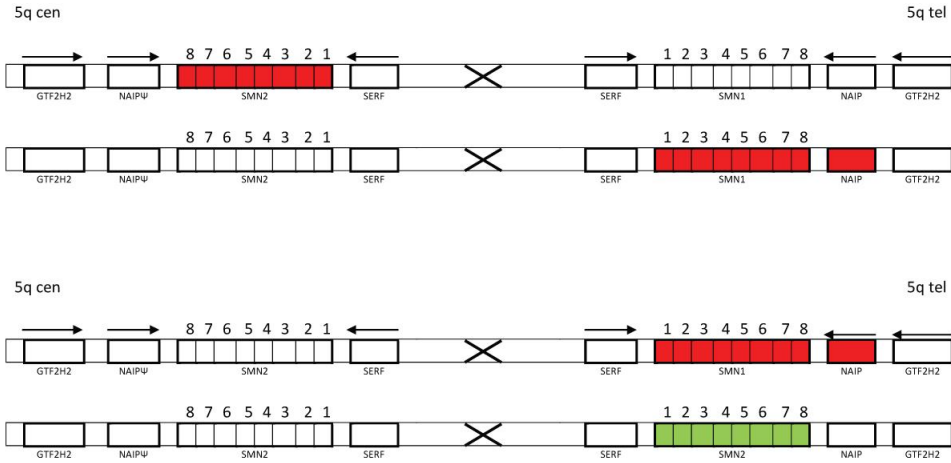
Bolesnik WH108



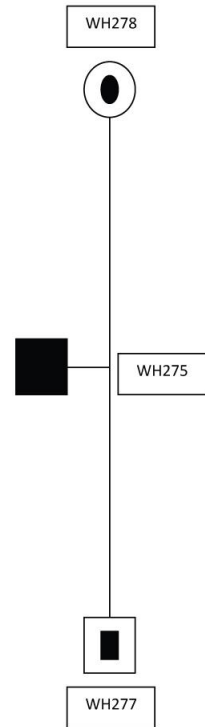
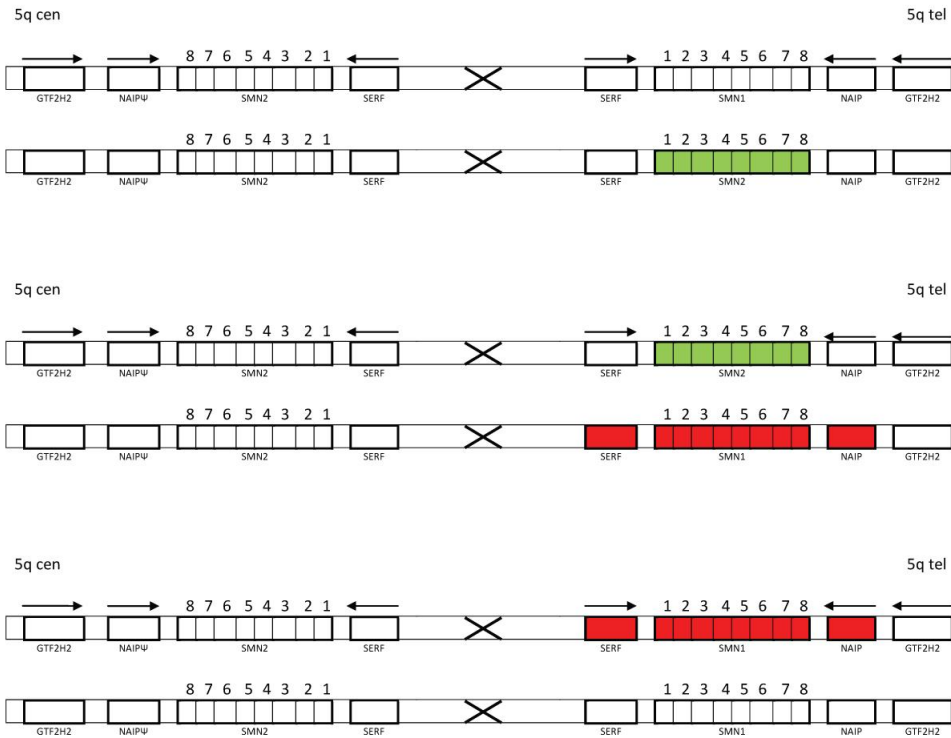
Bolesnik WH114



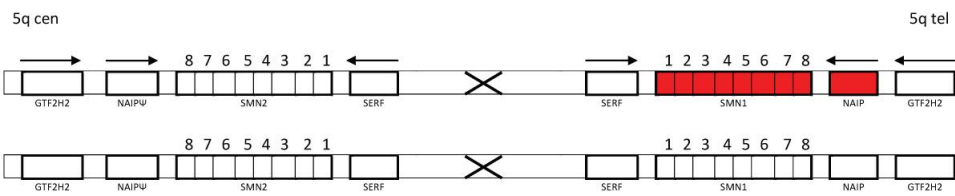
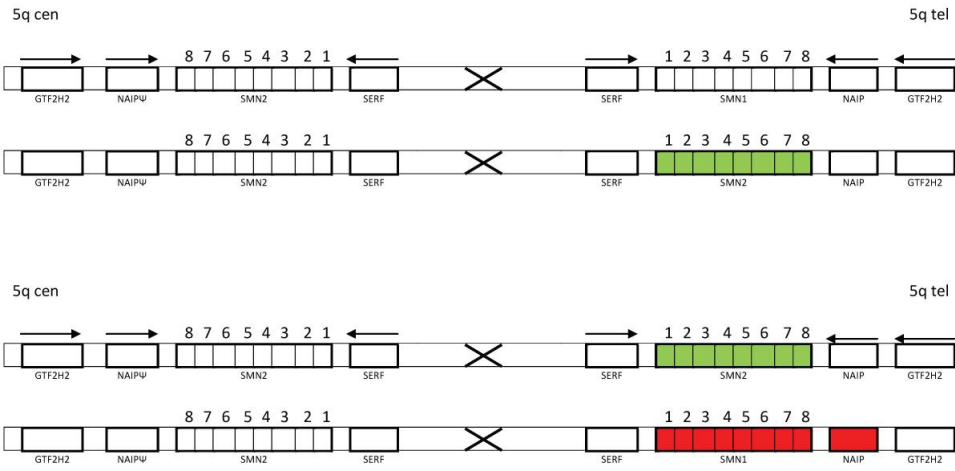
Bolesnik WH207



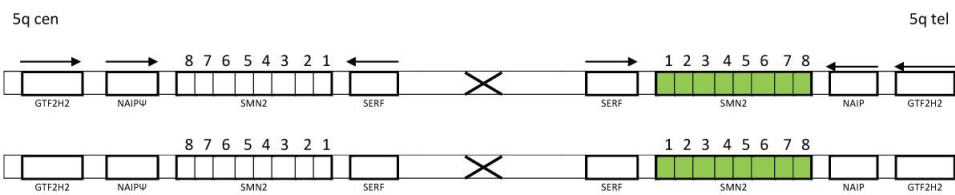
Bolesnik WH275



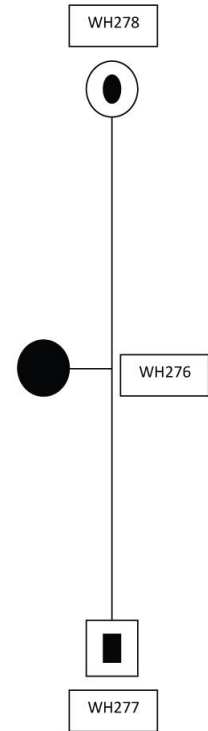
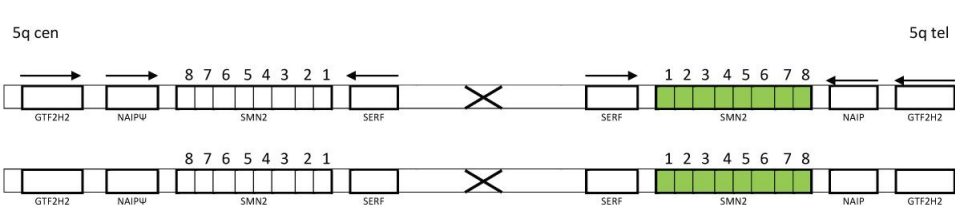
Bolesnik WH276



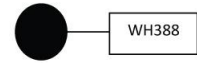
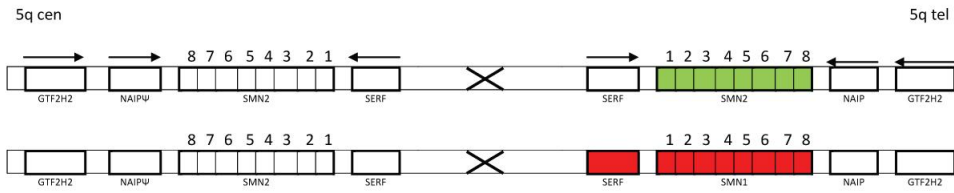
Bolesnik WH311



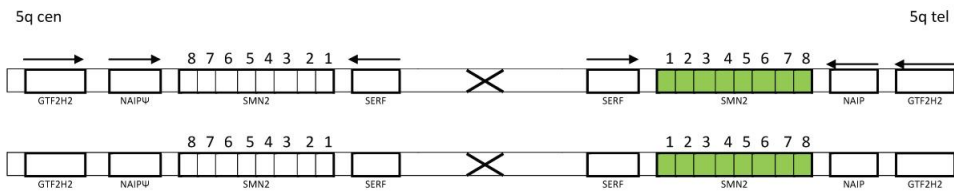
Bolesnik WH355



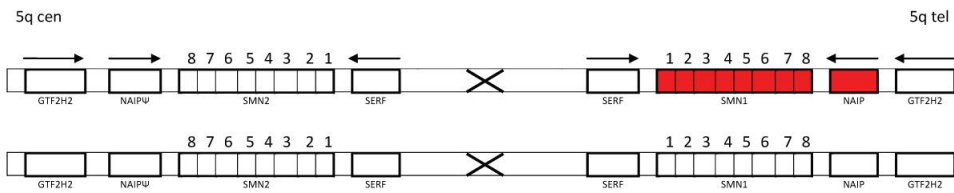
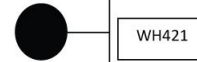
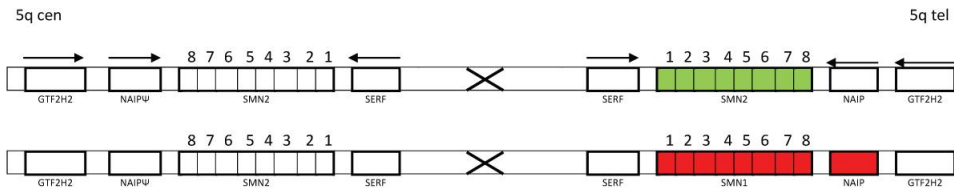
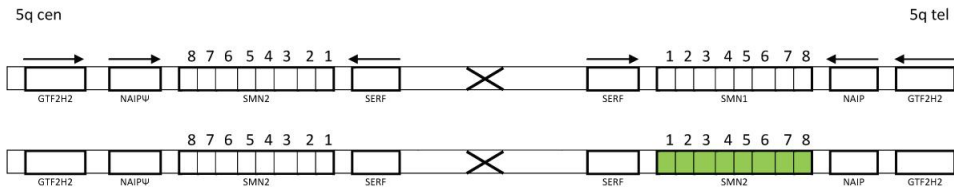
Bolesnik WH388



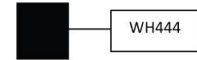
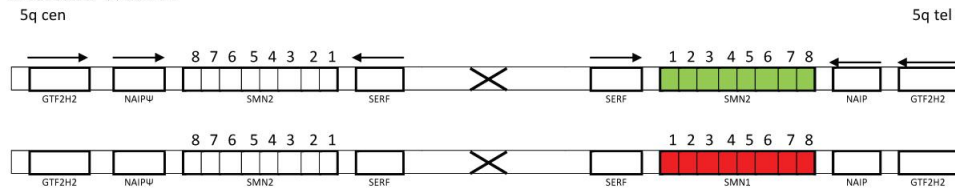
Bolesnik WH389



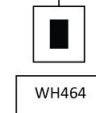
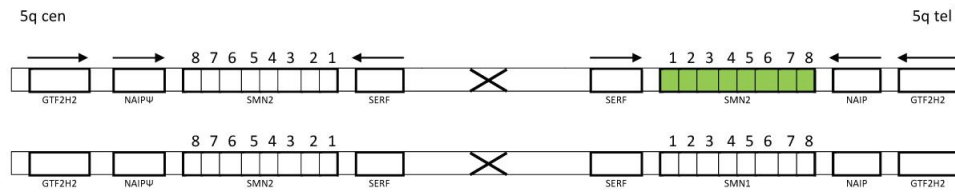
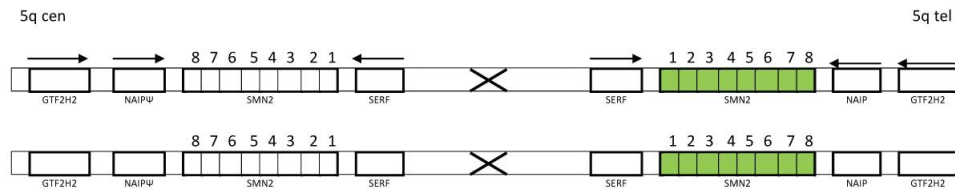
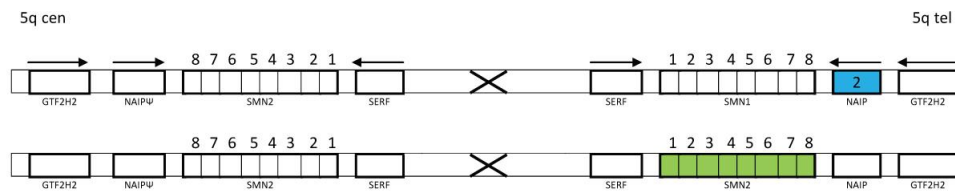
Bolesnik WH421



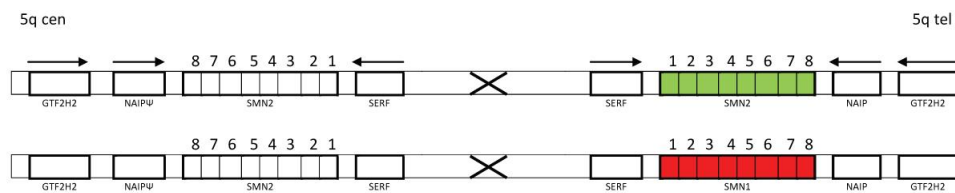
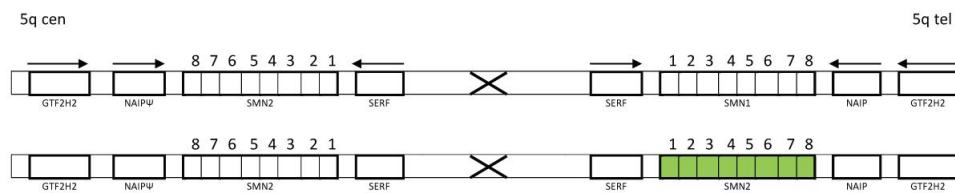
Bolesnik WH444



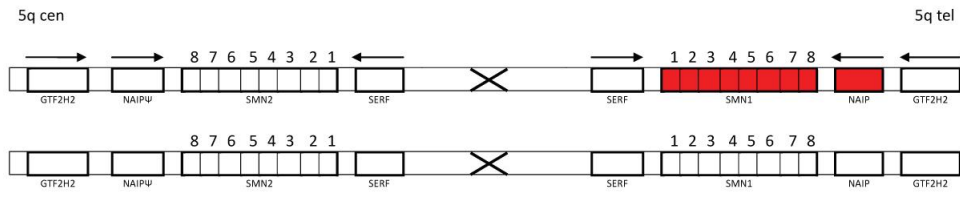
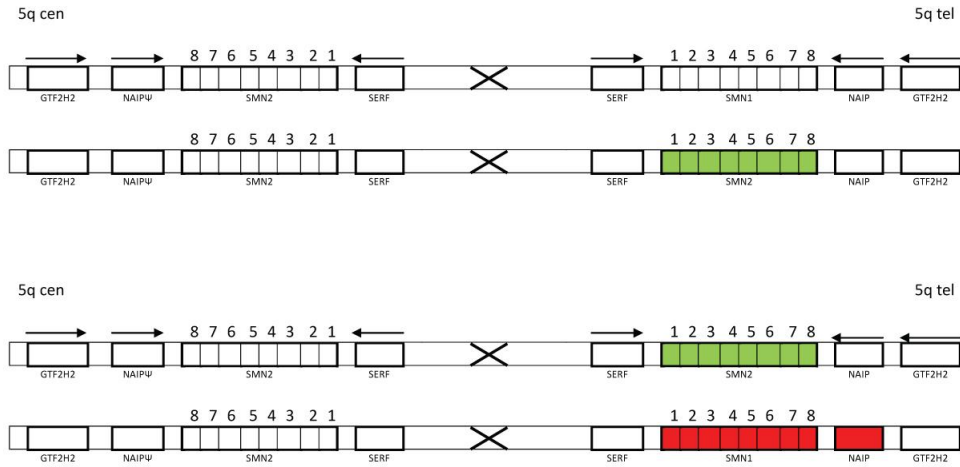
Bolesnik WH462



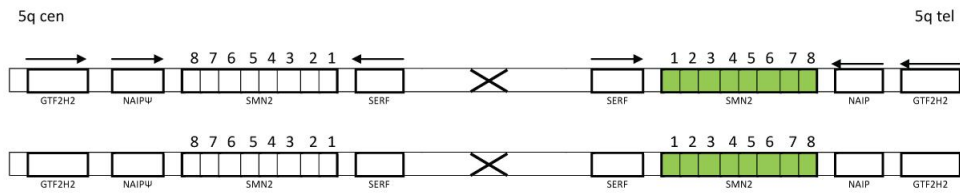
Bolesnik WH486



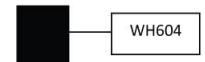
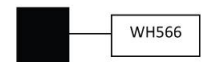
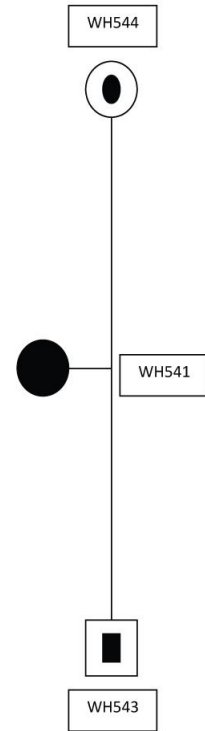
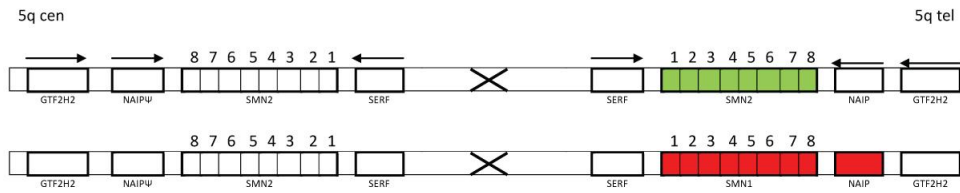
Bolesnik WH541



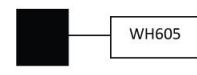
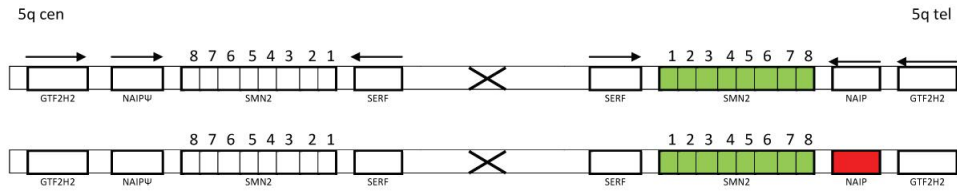
Bolesnik WH566



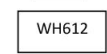
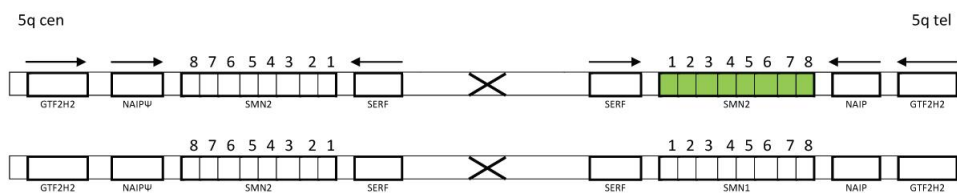
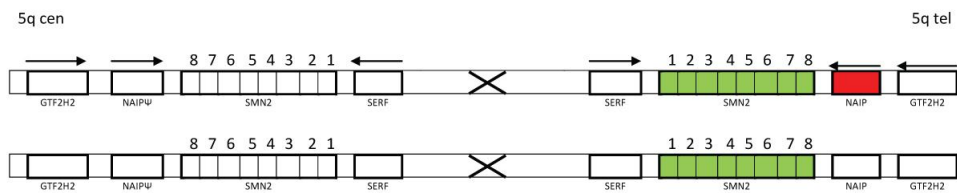
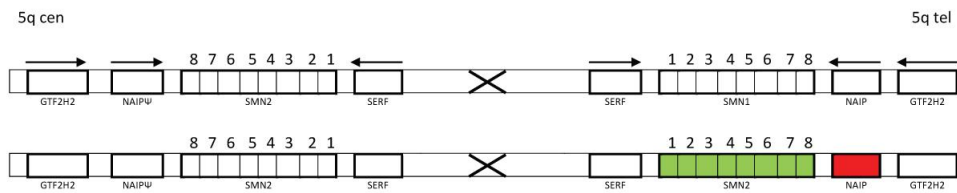
Bolesnik WH604



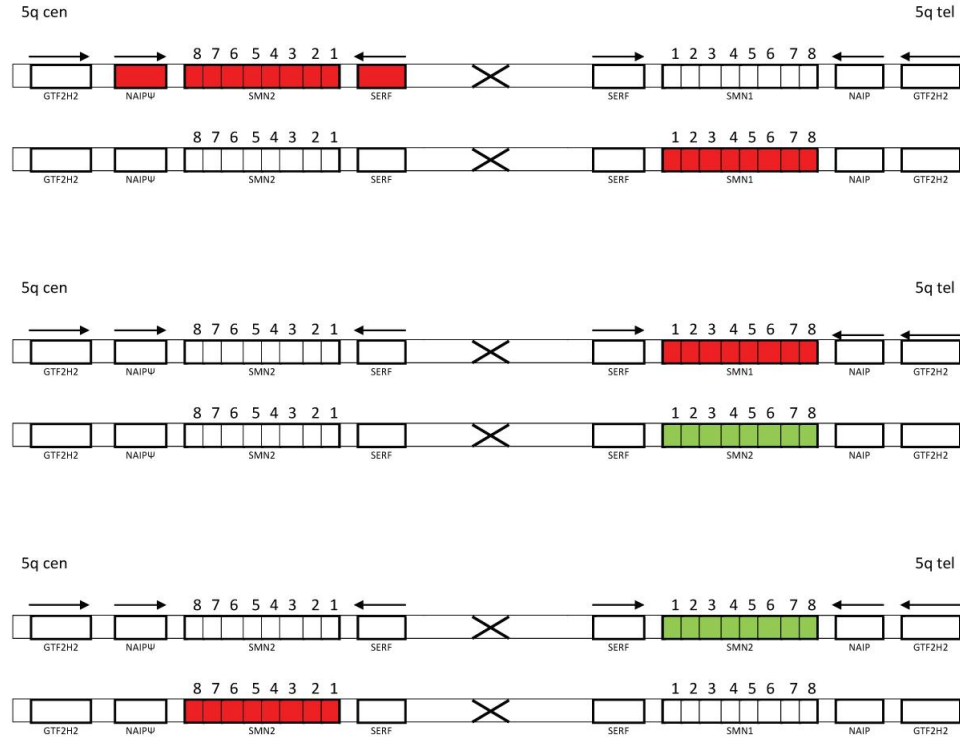
Bolesnik WH605



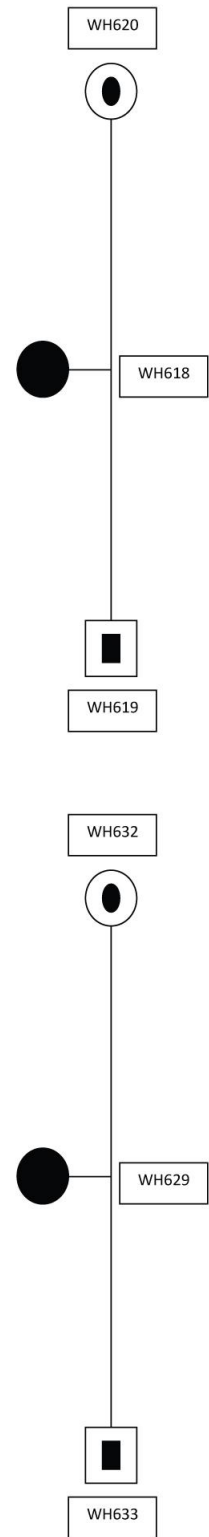
Bolesnik WH609



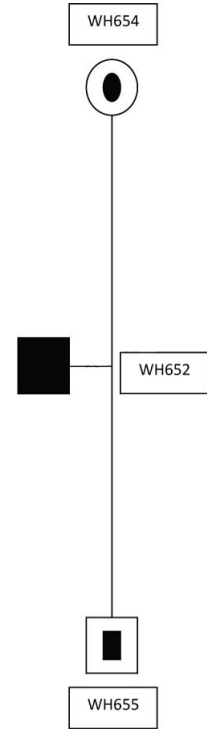
Bolesnik WH618



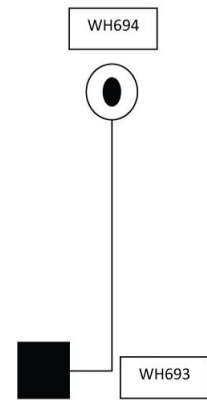
Bolesnik WH629



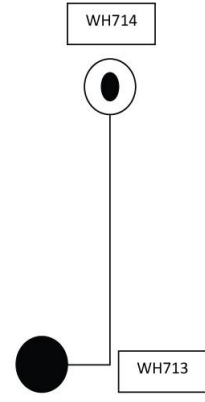
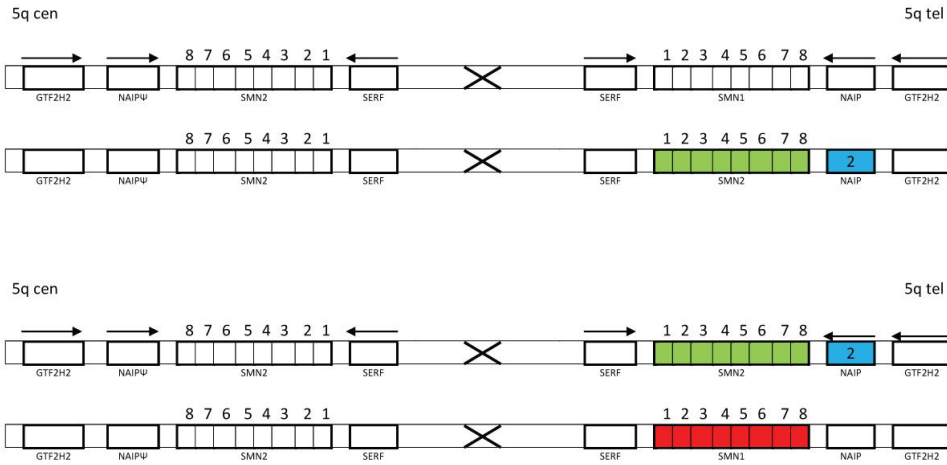
Bolesnik WH652



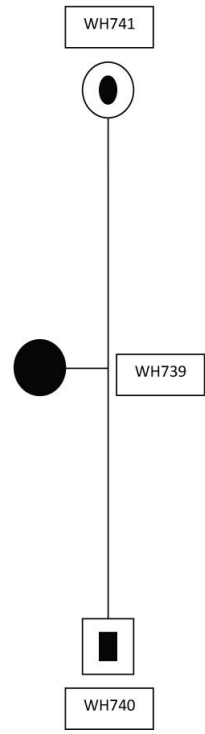
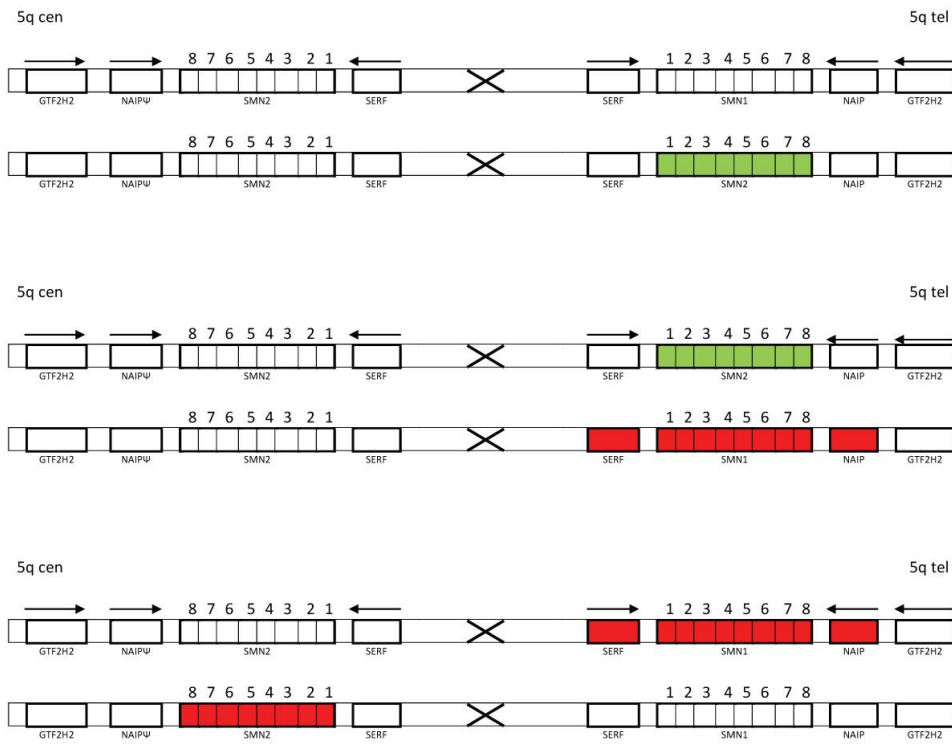
Bolesnik WH693



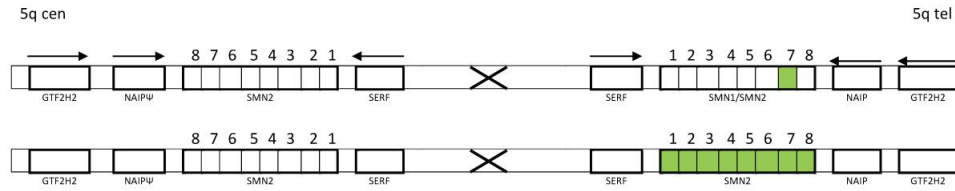
Bolesnik WH713



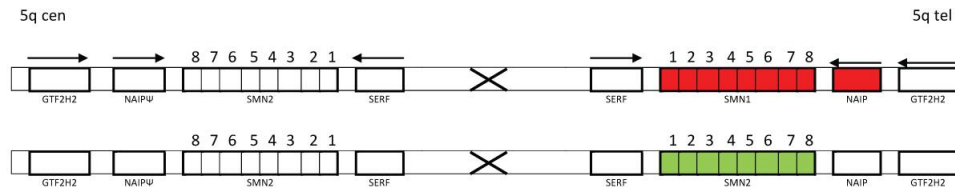
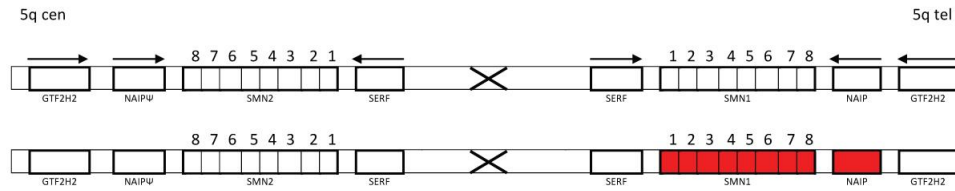
Bolesnik WH739



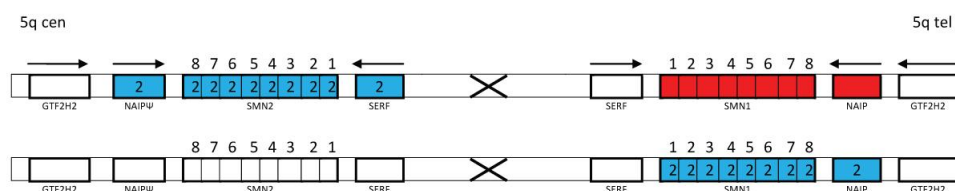
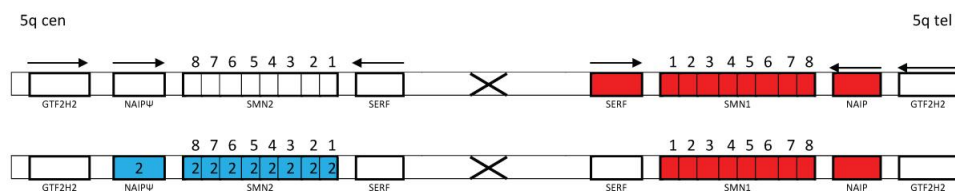
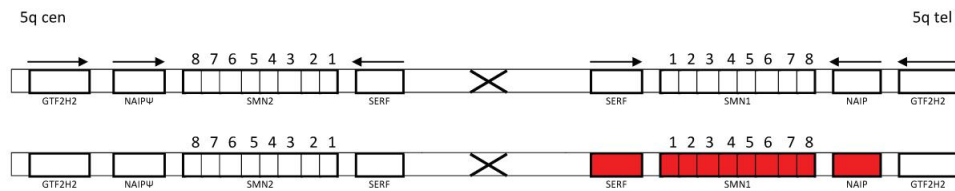
Bolesnik WH742



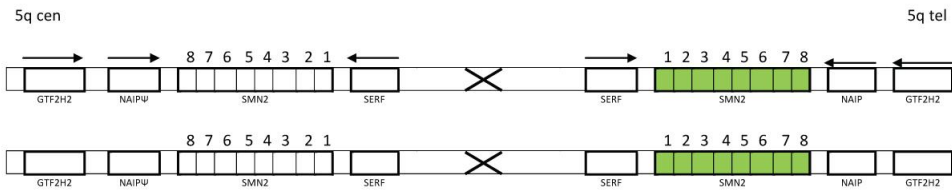
Bolesnik WH747



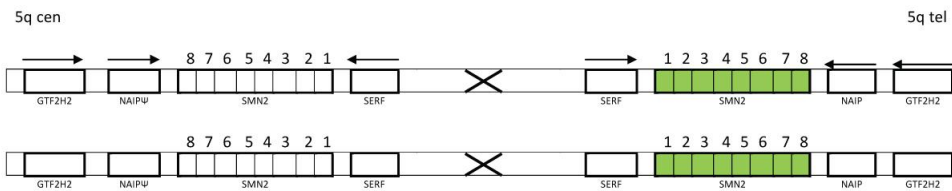
Bolesnik WH774



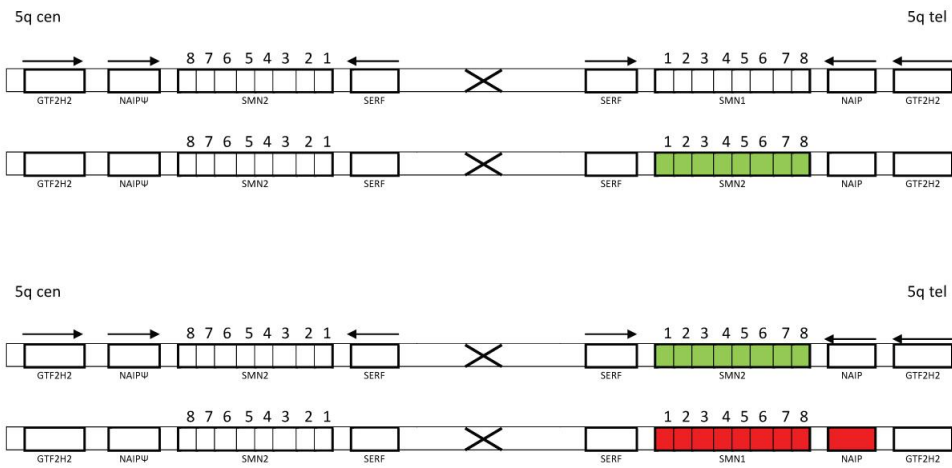
Bolesnik WH789



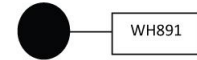
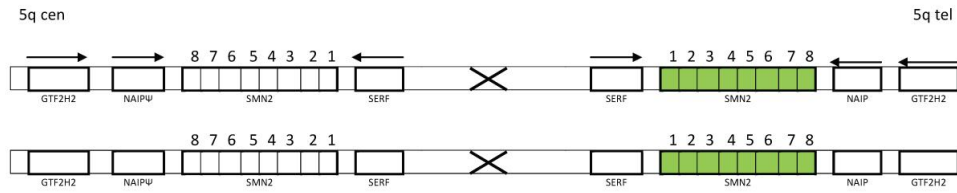
Bolesnik WH837



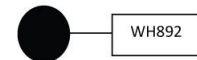
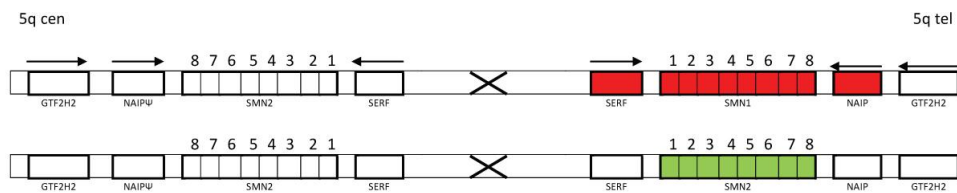
Bolesnik WH870



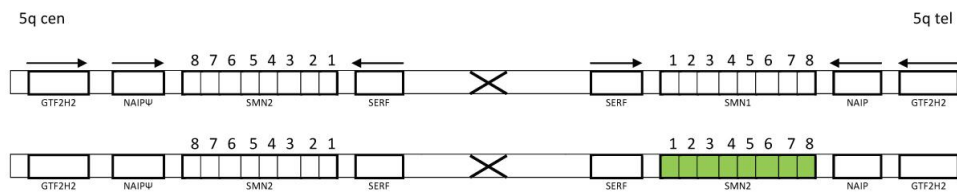
Bolesnik WH891



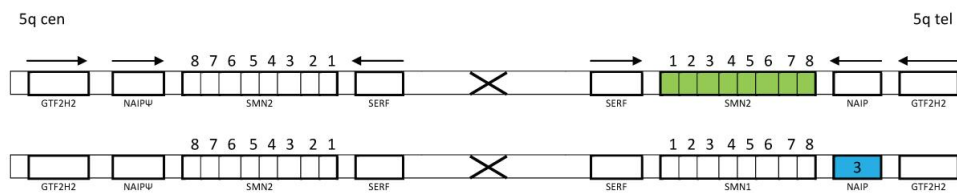
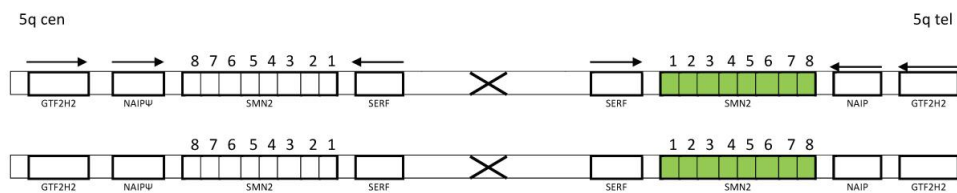
Bolesnik WH892



Bolesnik WH918



WH919



WH920

Biografija autora

Miloš Đ. Brkušaniin rođen je 15. septembra 1987. godine u Kraljevu. Diplomске studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, upisao je školske 2006/2007. godine i završio ih u roku sa prosečnom ocenom 9,75. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, upisao je 2011. godine. U periodu od aprila 2012. do jula 2013. 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 jula 2013. do danas angažovan je kao istraživač saradnik na istom projektu. Učestvovao je i na jednom bilateralnom projektu sa Slovenijom. Kao deo četvoročlanog tima, 2018. godine dobio je grant Pokreni se za nauku koji dodeljuje kompanija Filip Moris u saradnji sa Centrom za razvoj liderstva. Od 2013. godine do danas angažovan je kao saradnik u nastavi na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Univerziteta u Beogradu-Biološkog fakulteta u izvođenju praktične nastave na kursu Molekularna biologija eukariota (osnovne studije) i od 2014. godine angažovan je kao jedan od predavača na kursu Molekularna genetika humanih bolesti (master studije). Bio je član komisije za odbranu četiri diplomska ili master rada. Autor je ili koautor 11 naučnih radova. Autor je ili koautor 19 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 9 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). U 2018. godini dobio je stipendiju Evropskog društva za humanu genetiku (ESHG) za učešće na uglednoj 31. školi Klinička genomika i NGS u Bertinoru (Italija). Iste godine, od strane Sekcije za medicinsku genetiku Društva genetičara Srbije, dodeljena mu je i stipendija National Fellowship ESHG 2018 za učešće na ESHG konferenciji 2018 u Milanu. Pored navedenog, održao je nekoliko usmenih predavanja i predavanja po pozivu na nacionalnim i međunarodnim skupovima, a kao spoljni saradnik Istraživačke stanice Petnica učestvovao je na brojnim seminarima i školama za srednjoškolce i mlade istraživače.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милош Бркушанин

Број индекса M3002/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе“

- 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 Милош Бркушанин

Број индекса M3002/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа
спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе“

Ментор проф. др Душанка Савић-Павићевић

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:

„Структура сегменталне дупликације 5q13.2 као модификатор фенотипа спиналне мишићне атрофије и амиотрофичне латералне склерозе“

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.