Becker Musküler Distrofili Geniş Bir Ailede Moleküler ve Klinik Değerlendirme

Esra Tuğ *, Halil İbrahim Atasoy **, Dr. Hatip Aydın *, Zeynep Ocak ***

*Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD,

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD

***Burç Genetik Tanı Merkezi

Adres: Esra Tuğ. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, İzzet Baysal Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Bolu

Tel: 0 374 2534656/ 3082 **Gsm:** 0 532 5120968 **Fax:** 0 374 2534559 **E-mail:** esratug@hotmail.com

ÖZET:

Amaç: *Becker Müsküler Distrofi (BMD), sıklıkla distrofin geni içindeki fonksiyonel proteinin kısmen değişmesine neden olan mutasyonlar sonucu oluşur. Hipospadias nedeniyle cerrahi operasyon planlanan 9 yaşında bir erkek çocuk, rutin kan testleri sırasında artmış serum kreatin kinaz (CK) aktivitesi nedeniyle değerlendirilmek üzere kliniğimize sevk edildi. Probandın 11 yaşındaki kardeşinin serumunda yüksek CK tespit edilmesi ve 2., 3. ve 5. dereceden akrabalarında yüksek CK ve kas güçsüzlüğü bulgularının olması nedeniyle probanda ve kardeşine distrofin geninin moleküler analizi yapılması planlandı.*

Yöntem: *Probanda ve erkek kardeşine distrofin geninin 3, 4, 8, 12, 17, 19, 32, 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ve 52 ekzonları için moleküler genetik analiz yapıldı. DNA'larının izolasyonu sonrasında multipleks PCR uygulandı ve ürünler agaroz jelde görüntülendi.*

Bulgular: *Bu moleküler analiz ile, probandın ve erkek kardeşinin distrofin geninin 13-19 ekzonlarını içeren bir delesyon taşıyıcısı oldukları gösterildi. Yaş ortalamaları 9-25 arasında değişen ve artmış CK aktivitesi gösteren aile üyelerinin hiçbirinde klinik bulgu mevcut değildi. Probandın 40 yaşında olan dayısı orta derecede kas güçsüzlüğü, annesinin dayısı (60) ise ciddi kas güçsüzlüğü göstermekteydi.*

Sonuçlar: *Moleküler bulgulara dayanılarak, klinik semptomların gelişimi BMD tanısı ile açıklanabilir; ayrıca, ailenin ilk dekadlarda asemptomatik olduğu söylenebilir. Bu rapor, presemptomatik BMD vakalarında, biyokimyasal belirteçler ışığında yapılan moleküler çalışmalar ve ayrıntılı ailesel sorgulanmaların erken tanısal değerini ortaya koymaktadır.*

Anahtar Kelimeler: *Müsküler distrofiler, Becker müsküler distrofi, Distrofin geni, X'e bağlı resesif kalıtım.*

ABSTRACT:

Molecular and clinical evaluation in an extensive family with Becker muscular dystrophy

Objective: *Becker Muscular Dystrophy (BMD) often results from in-frame mutations of the dystrophin gene that allows production of an altered but partially functional protein. A 9-year-old boy was referred for evaluation because of elevated serum creatine kinase (CK) activity, during routine blood screening for hypospadias surgery. Because of blood screening of the proband's older brother (11-year-old) showed elevated CK activity and there are muscle weakness findings together with elevated CK activity in 2nd, 3rd and fifth degree relatives of proband, we planned molecular analysis for dystrophin gene to proband and his brother.*

Material and Methods: *Molecular genetics analysis was undertaken for exons 3, 4, 8, 12, 17, 19, 32, 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 and 52 in the dystrophin gene of the proband and his brother. Multiplex PCR was undertaken with the extracted DNA, and the products were run on an agarose gel.*

Results: *This molecular work-up showed the proband and his brother to be carriers of a deletion implying exons 13-19 of the dystrophin gene. Family members showing elevated CK activity and were aged between 9-25 yrs, had no clinical symptoms at all. 40-years-old maternal uncle of the proband showed mild muscle weakness and 60-years-old maternal grand uncle showed severe muscle weakness.*

Conclusion: *Based on molecular findings, this family would be given a diagnosis of BMD. This diagnosis implies the development of clinical symptoms, even though this family is clearly asymptomatic for the first decades. This report show that there are early diagnostic significance of detailed family inquiry and practised molecular analyses by inspiring biochemical indicators in presymptomatic BMD cases.*

Keywords: *Muscular dystrophies, Becker muscular dystrophy, Dystrophin gene, X-linked recessive inheritance.*

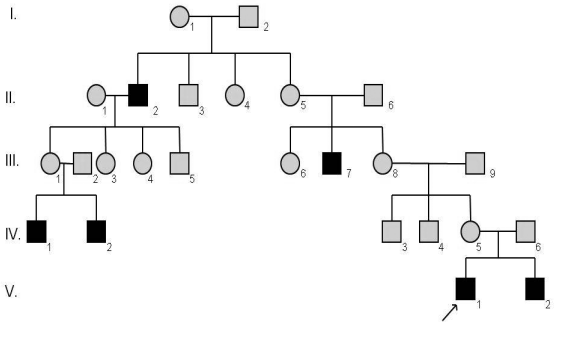
GİRİŞ

Müsküler Distrofiler (MD), ilerleyici kas güçsüzlüğüyle karakterize olan kalıtsal bozuklukların bir grubudur (1). Distrofinopatiler, MD'lerin en sık görülen formudur. Erkeklerde görülen distrofinopatilerin daha ılımlı formu sıklıkla Becker Müsküler Distrofi (BMD) (OMIM 300376) olarak gruplandırılır (2). BMD, sıklıkla distrofin geni içindeki fonksiyonel proteinin kısmen değişmesine neden olan mutasyonlar sonucu oluşur. Hastalık X'e bağlı resesif kalıtım özelliği gösterir. Distrofin genindeki mutasyonlar, Duchenne Müsküler Distrofi (DMD) ve BMD fenotipine neden olmaktadır (3, 4). BMD, çoğunlukla proksimal yerleşimli kasların zayıflığı ve güçsüzlüğünün daha yaygın görüldüğü DMD'ye klinik olarak benzemektedir; fakat BMD, DMD ile mukayese edildiğinde daha yavaş ve ılımlı seyretmektedir. Genellikle yürüme zorlukları 16 yaşından sonra başlamaktadır (3). Bu çalışmada, tipik klinik bulguları olmayan ancak biyokimyasal belirteçlerindeki değişim nedeniyle yapılan moleküler çalışmalar ile tanısal doğrulamanın yapıldığı bir BMD vakasını moleküler özellikleri ve ailesi içindeki klinik özelliklerin çeşitliliği ile birlikte sunmaktayız. Bu aile, distrofin genindeki delesyonlara yönelik olarak moleküler yöntemlerle tarandı; ayrıca derinlemesine sorgulama sonucu saptanan klinik bulgular, elde edilen moleküler sonuçlarla karşılaştırılarak tartışıldı.

OLGU

9 yaşında erkek olgu, planlanan hipospadias cerrahisi nedeniyle yapılan rutin kan testleri sırasında serumunda kreatin kinaz (CK) aktivite artışı nedeniyle değerlendirilmek amacıyla bölümümüze gönderilmiştir. Proband, aralarında akrabalık bulunmayan sağlıklı anne ve babanın ikinci çocuklarıdır. Annesinden alınan bilgiye göre, annenin probanda gebeliği süresince düzenli takip ve kontrolleri yapılmakla birlikte, doğumda herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Doğumdan sonraki gelişimi normal devam etmiş ve bağımsız olarak 12. ayında yürümeye başlamıştır. Fizik muayenesi sırasında, olgunun boyu 121 cm (3. persentil) ve ağırlığı 24 kg (10.persentil) idi. Nabız 96 / dk, solunum sayısı 16/dk, TA 80/60 mmHg, ateş 37,4 ° C olan hastanın bilinci açık ve kooperasyonu tamdı. Baş-boyun, kulak burun boğaz ve solunum sistemi muayenesi normal. Kardiyovasküler sistem muayenesinde S1-S2 ritmik, apeks solda tespit edildi. Gastrointestinal sistem normal, ürogenital sistem muayenesinde testisler skrotumda, hipospadiası mevcuttu. Ekstremiteler normal, "calf hypertrophy" negatif, "Gower" arazı negatifti. Fizik muayenesi sırasında, hastada kas güçsüzlüğü tablosu tespit edilmedi. Ancak, ağır efor sırasında çabuk yorulma hikayesi mevcuttu. Mental fonksiyonları normaldi.Laboratuvar sonuçları: kan sayımı normal olup, serum alanin aminotrasferaz (ALT) 286 IU/L (N: 10-40), aspartat aminotrasferaz (AST) 206 IU/L (15-40), laktat dehidrogenaz (LDH) 788 IU/L (125-243), alkalen fosfataz (ALP) 188 IU/L (40-150), kreatin kinaz (CK) 9350 IU/L (0-190) ve gamma glutamil transpeptidaz (GGT) 11 IU/L (12-64) idi. Viral hepatit markerları negatif olup, USG ve EKO'sunda herhangi bir anomaliye rastlanmadı. Elektromyografisi normal olmasına rağmen, diğer nörolojik muayeneleri çeşitli kaslarda güçsüzlük gösterdi. Diğer sistemlerin klinik incelemesinde herhangi bir hastalık bulgusuna rastlanmadı. Aile hikayelerinin ayrıntılı incelemesi sırasında hastanın 11 yaşında erkek kardeşinin (V:2), 2. ve 3. derece akrabası olan anneannesinin ve büyük annesinin erkek kardeşlerinin (II:2 ve III:7) ve 5. derece akrabası olan iki erkek kuzeninin (IV:1 ve IV:2) de vakamızdaki gibi artmış CK düzeylerine sahip oldukları tespit edildi. Probandın annesinin 40 yaşında olan dayısı (III:7) hafif kas güçsüzlüğü ve 60 yaşında olan büyük dayısı (II:2) ise ciddi kas güçsüzlüğü göstermekteydi. Yaşları 9-25 arasında değişen, belirgin klinik bulgu göstermeyen ancak, artmış CK aktivitesi gösteren aileye ait pedigri **Şekil 1**'de gösterilmektedir.

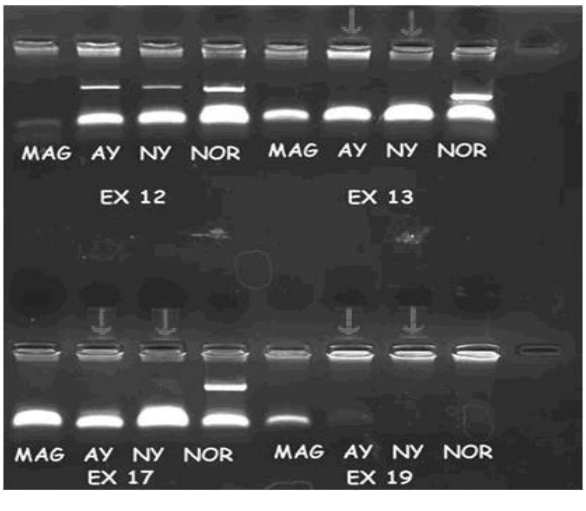
Şekil 1: Probandın aile ağacı.



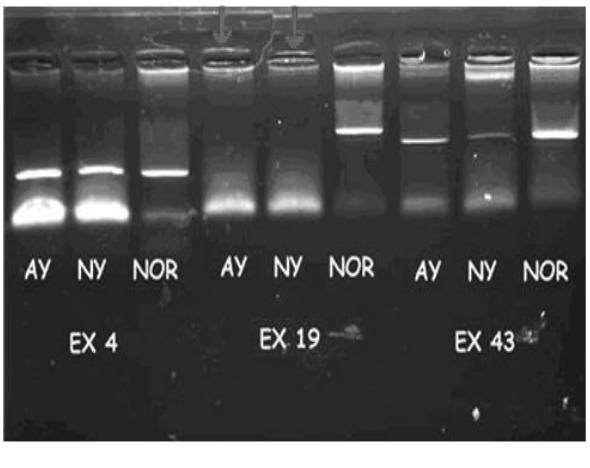
GEREÇ VE YÖNTEM

Probanda ve erkek kardeşine distrofin geninin moleküler genetik analizi yapıldı.Serumda CK yüksekliği ile refere edilen olgu ve kardeşinin periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, Abbs ve ark.nın (5) belirttiği oligonucleotide primerler kullanılarak, Chamberlain ve ark. nın (6) metoduna göre 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 50, 51, 52 ve 60. ekzonlarının multiplex PCR ile amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler %2' lik agaroz jelde 120 volt akım ile 40 dakika yürütüldükten sonra ultraviyole altında incelenmiş ve distrofin gen delesyonları bulunmuştur. Bu moleküler analiz ile probandın ve erkek kardeşinin, distrofin geninin 13-19 ekzonlarını içeren bir delesyon taşıdıkları gösterildi **(Şekil 2 ve 3)**.

Şekil 2: Distrofin geni 12, 13, 17, 19. ekzonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü. MAG: Pozitif kontrol, AY: Proband, NY: Probandın kardeşi, NOR: Normal kontrol.



Şekil 3. Distrofin geni 4, 19, 43. ekzonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü. AY: Proband, NY: Probandın kardeşi, NOR: Normal kontrol.



TARTIŞMA

MD'ler, kas gücü ve bütünlüğünün ilerleyici kaybıyla karakterize edilen dejeneratif kas hastalıklarının genetik olarak heterojen bir grubudur. DMD/BMD, X kromozomu üzerinde ve resesif olarak kalıtılan letal seyirli ciddi bir bozukluktur. Sıklıkları birbirinden farklılık göstermekle birlikte, DMD 3500'de bir ve BMD ise 30.000'de bir canlı erkek çocukta görülmektedir. Hastalığa neden olan mutasyonlardan sorumlu distrofin geni, X kromozomunun kısa kolu üzerinde 21.2 bölgesinde lokalize olmakta ve iskelet kasındaki membran iskeletinin proteinlerini kodlamaktadır (7). Hastalıktan sorumlu mutasyonlar, DMD vakalarının yaklaşık %60-65'inde, BMD vakalarının ise %5-10'unda bulunan ve genin 79 ekzonunu kapsayabilen delesyonlar ya da duplikasyonlar şeklinde olabilmektedir. Geriye kalan %30-35 vakada genin içindeki tek nokta mutasyonları ya da küçük yeniden düzenlenmeler şeklinde bulunmaktadır (5, 7, 8). BMD'de, büyük delesyon ya da duplikasyonlar %85 oran ile yüksek sıklıkta bulunmaktadır (7). BMD hastalarının yaklaşık %70'i delesyon türündeki mutasyonlara sahiptir (2). Bazı delesyon mutasyonları taşıyan hastalar arasında ve aile içinde klinik bulgularda çeşitliliğin var olduğu da bilinmektedir (2, 10). Probandımızda ve erkek kardeşinde yüksek CK, LDH, ALP, ALT ve AST değerleri mevcuttu, ancak klinik bulguların belli belirsiz seyri nedeniyle her ikisine de daha önce tanı konulamamıştı. Probandımızda ve ailesindeki diğer bazı hasta bireylerde (V:2, IV:1 ve IV:2) BMD subklinik olarak seyretmekteydi. Aileden alınan bilgiye göre, II:2 ve III:7 numaralı bireylerin serum CK yüksekliği uzun yıllardır mevcut olmakla birlikte, III:7 numaralı birey şu anda 40'lı yaşlarda hafif kas güçsüzlüğü bulgularına sahip ve II:2 numaralı birey 60 yaşında ve ciddi kas güçsüzlüğü bulguları göstermekteydi. Her iki hastada da serum CK yüksekliği ve yaşla birlikte artan kas güçsüzlüğü bulgusunun nedeni belirlenememekle birlikte, herhangi bir tanısal yaklaşımda bulunulmamıştı. Ayrıca, ailede IV:1 ve IV:2 numaralı bireylerde de serum CK düzeylerinin yüksek olduğu önceden tespit edilmekle birlikte, bu vakalara da tanıya yönelik herhangi bir analiz yapılmamıştı. Bu ailede, etyolojisi

tanımlanamamış olan CK yüksekliğinin ve vakalardaki subklinik bulguların varlığının, distrofin genindeki ekzon 13, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19'u kapsayan delesyonlarla birlikte değerlendirildiğinde BMD ile uyumlu olduğu söylenebilir. Ayrıca, probandın aile ağacı tipik olarak X'e bağlı kalıtım modeli göstermektedir (Şekil 1). Bu tabloda, aile içindeki I:1, II:5, III:1, III:8 ve IV:5 numaralı kadınların bir adet normal X kromozomu ve bir adet distrofin geninde mutasyon bulunan X kromozomu bulundurması nedeniyle taşıyıcı olduğu, erkeklerin ise X kromozomunu annesinden alma zorunluluğu nedeniyle hastalığı %50 ihtimalle gösterme riski bulunmaktadır.

Probandımız ve ailesinde bulunan ekzon 13-19 delesyonu BMD kliniğine neden olurken, bazı vakalarda aynı bölgelerdeki delesyonlar DMD kliniğine neden olabilmektedir. Bir çok çalışmada, distrofin geninde bulunan delesyonlarla ilgili olarak genotip-fenotip korelasyonuna yönelik tahmin yapmanın güçlüklerinden bahsedilmektedir (10). Çünkü aynı delesyonları taşıyan hastalar arasında büyük klinik varyasyonlar olabilmekte ve bu varyasyonları aynı soydaki hasta bireyler arasında da görmek mümkün olabilmektedir. Moleküler analizlerin sonuçları ışığında mevcut BMD tanısı, bu ailedeki klinik bulguların birinci dekadda asemptomatik seyretmesini ve klinik bulguların yaşamın sonraki dönemlerinde gösterdiği gelişim sürecini açıklamaktadır. Bu makale, distrofin genindeki delesyonların klinik tabloda değişkenliğe nedeni olabileceğini vurgulamasının yanı sıra, tipik klinik bulguların yokluğunda ancak kuşkulu biyokimyasal belirteçlerin saptanması durumunda moleküler genetik analizlerin tanısal yaklaşımda gerekliliğini de vurgulamak amacıyla sunulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Emery AE. The muscular dystrophies. BMJ. 1998;317 (7164):991-5.

2. Hamed SA, Sutherland-Smith AJ, Gorospe JRM, Kendrick-Jones J, Hoffman EP. DNA sequence analysis for structure/ function and mutation studies in Becker muscular dystrophy. Clin Genet 2005; 68: 69-79.

3. McKusick VA, Kniffin CL and O'Neill MJF. Muscular Dystrophy, Becker type; Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), updated 2006.

4. Baskin B, Banwell B, Khater RA, Hawkins C, Ray PN. Becker muscular dystrophy caused by an intronic mutation reducing the efficiency of the splice donor site of intron 26 of the dystrophin gene. Neuromuscular Disorders 2009; 19: 189-192.

5. Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. J Med Genet. 1991; 28 (5): 304-11.

6. Chamberlain SJ, Gibs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne Musculer Dystrophy locus via Multiplex DNA amplification. Nucleik Acid Res 1988; 16: 11141-56.

7. Piko H, Vancso V, Nagy B, Ban Z, Herczegfalvi A, Karcagi V. Dystrophin gene analysis in Hungarian Duchenne/Becker muscular dystrophy families-Detection of carrier status in symptomatic and asymptomatic female relatives. Neuromuscular Disorders 2009; 19: 108-112.

8. Darras BT. Molecular genetics of Duchenne and Becker muskcular dystrophy. The Journal of Pediatrics 1990; 117 (1): 1-15.

9. Ionnaccone ST. Current Status of Duchenne Muscular dystrophy. Pediatric Clinic of North America 1992; 39 (4): 879-894.

10. Ramelli GP, Joncourt F, Luetschg J, Weis J, Tolnay M, Burgunder JM. Becker muscular dystrophy with marked divergence between clinical and molecular genetic findings: case series. Swiss Med Wkly 2006; 136: 189-193.

Not: Bu çalışma "Tug E, Duzenli S, Aydin H, Atasoy HI, Ocak Z. Molecular and Clinical Work-up In An Extensive Family With Becker Muscular Dystrophy. Third International Congress of Molecular Medicine, International Union of Biochemistry and Molecular Biology IUBMB 2009; 61 (3): 375, Istanbul-Turkey" olarak Third International Congress of Molecular Medicine, 2009 kongresinde sunulmuştur.