

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Valerija S. Dobričić

**STUDIJA GENETSKE OSNOVE PRIMARNIH
DISTONIJA U POPULACIJI SRBIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Valerija S. Dobričić

**STUDY OF THE GENETIC BASIS OF
DYSTONIA IN SERBIAN POPULATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

prof. dr Ivana Novaković, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor:

Akademik prof. dr Vladimir Kostić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi komisije:

prof. dr Marina Svetel, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

prof. dr Tatjana Pekmezović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

prof. dr Stanka Romac, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Vuku i Nađi

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja Klinike za neurologiju, KCS. Zahvaljujem se svim kolegama sa Klinike, a posebno osnivaču laboratorije prof. dr Vladimiru Kostiću i kolegamicama prof. dr Ivani Novaković, Mileni Janković, Vesni Ralić i Mileni Žarković, na nesebičnoj pomoći i podršci. Najveće hvala mojoj strpljivoj porodici.

STUDIJA GENETSKE OSNOVE PRIMARNIH DISTONIJA U POPULACIJI SRBIJE

REZIME

Uvod: Distonije pripadaju grupi poremećaja pokreta i karakterišu se nevoljnim uvrtanjem, repetitivnim pokretima ili zauzimanjem abnormalnog položaja delova tela, uključujući i trup. Procenjeno je da je prevalencija distonija barem 10 na 100 000 osoba. Postoji više klasifikacija distonija. Etiološka klasifikacija podrazumeva postojanje primarnih (idiopatskih) distonija gde je distonija jedini simptom bolesti i sekundarnih (simptomatskih) distonije gde je distonija samo jedan od simptoma bolesti i izazvane su različitim poznatim uzrocima (npr. trauma, lekovi/toksini, moždani udar). U grupu primarnih distonija svrstavaju se i distonija-plus sindromi za koje je karakteristično da se pored distonije, koja je glavni simptom, javlja i još neki simptom iz grupe poremećaja pokreta. Najnovija klasifikacija distonija je molekularna klasifikacija. Ona je izvršena prema genskim lokusima vezanim za određene tipove distonija. Do sada je okarakterisano najmanje dvadeset monogenских distonija (lokusi DYT1–DYT21; pri čemu je DYT14=DYT5a i DYT9=DYT18), od kojih je za jedanaest identifikovan i gen koji je odgovoran za pojavu bolesti. Od ovih jedanaest monogenских distonija, osam se nasleđuje autozomno dominantno (*TOR1A/DYT1*, *GCH1/DYT5a*, *THAP1/DYT6*, *PNKD/MR-1/DYT8*, *PRRT2/DYT10*, *SGCE/DYT11*, *ATPIA3/DYT12* i *SLC2A1/DYT18*), dve autozomno recesivno (*TH/DYT5b* i *PRKRA/DYT16*) i jedna X-vezano recesivno (*TAF1/DYT3*). Na osnovu podataka iz literature, dosadašnje kličke prakse i epidemioloških podataka pokazalo se da se kod pacijenata obolelih od primarne distonije najčešće radi o DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 ili DYT18.

Cilj: Ovo istraživanje je imalo za cilj utvrđivanje učestalosti i spektra mutacija u genima DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 i DYT18 kod bolesnika sa primarnom distonijom u populaciji Srbije. Zatim, ispitivanje potencijalnih korelacija između genotipa i fenotipa kod pacijenata kod kojih su detektovane mutacije i utvrđivanje da li je na osnovu dobijenih rezultata moguće formirati šemu za genetsko testiranje distonija u našoj populaciji.

Materijal i metode: U ovo ispitivanje uključena su ukupno 352 pacijenata sa primarnom distonijom, 45 srodnika obolelih i 106 osoba bez neuroloških smetnji. Prisustvo mutacija u *TORIA*, *THAPI*, *GCHI*, *SGCE*, *PNKD* i *SLC2A1* genima analizirano je automatskim sekvenciranjem, dok je prisustvo mutacije c.68C>T u egzonu 1 *GCHI* gena u kontrolnoj populaciji određivano PCR-om specifičnim za alel. Detekcija delecija i duplikacija u *GCHI* i *SGCE* genima vršena je primenom MLPA metode. Za statističku obradu podataka korišćeni su χ^2 test i Fišerov egzaktni test.

Rezultati: Kod ukupno 42 osobe detektivno je ukupno 14 različitih mutacija u analiziranim genima. Pri tome je mutacija c.907_909delGAG u *TORIA* genu detektivno kod 17 osoba (9 pacijenata i 8 asimptomatskih članova porodica), u *THAPI* genu je detektivno 5 različitih mutacija (c. -220C>T, c.62C>G, c.85C>T, c.109_132dupl, c.496G>T) kod 12 osoba (7 pacijenata i 5 asimptomatskih srodnika), u *GCHI* genu su detektivno 4 različite mutacije (delecija egzona 1, c.228delG, c.470T>C, c.626+1G>A) kod 9 osoba (8 pacijenata i 1 asimptomatski član porodice), u *SGCE* genu su detektivno 2 različite mutacije (c.709C>T, c.966delT) kod 2 pacijenta. U *PNKD* i *SLC2A1* genima detektivno je po jedna mutacija (c.26C>T u *PNKD* i c.516delG u *SLC2A1*).

Zaključak: Formirana je banka uzoraka krvi i DNK od 352 pacijenta iz Srbije sa primarnom distonijom i 45 srodnika obolelih. Optimizovane su metode za detekciju mutacija u *TORIA* (DYT1), *THAPI* (DYT6), *GCHI* (DYT5a), *SGCE* (DYT11), *PNKD* (DYT8) i *SLC2A1* (DYT18) genima. Kod ukupno 42 osobe detektivno je 14 različitih mutacija u analiziranim genima, od kojih 6 nije do sada opisano u literaturi. Učestalosti mutacija nisu odstupale od učestalosti očekivanih na osnovu dosadašnjih podataka u literaturi. Fenotipska prezentacija kod svih pacijenata sa mutacijom je odgovarala spektru kliničkih manifestacija koji se opisuje u literaturi za odgovarajuće tipove distonije. Formirana je šema za genetsko testiranje primarnih distonija u našoj populaciji.

Ključne reči: distonija, neurogenetika, DYT1, DYT6, DYT5a, DYT11, DYT8, DYT18, genetičko testiranje

Naučna oblast: Medicinska genetika

Uža naučna oblast: Neurogenetika

UDK broj: 616.8-009.18:577.2 (497.11) (043.3)

STUDY OF THE GENETIC BASIS OF DYSTONIA IN SERBIAN POPULATION

SUMMARY

Background: Dystonia is a movement disorder characterized by involuntary twisting, repetitive movements, and abnormal postures. It has been estimated that the prevalence of dystonia is 10/100 000. There are several types of dystonia classification. If dystonia is classified by etiology, it is dichotomized into primary (idiopathic) and secondary (symptomatic) forms. Primary refers to that form of dystonia where there are no additional neurological features, while secondary refers to that form of dystonia where dystonia is one of the symptoms and it is caused by a variety of known causes (e.g. trauma, medications/toxins, and stroke). Dystonia plus syndromes also belong to the primary dystonia, and they are characterized by dystonia as the main symptom accompanied by some additional movement disorder symptom(s). A molecular classification schema is the latest type of dystonia classification. It is based on genetic loci associated with certain types of dystonia. To date, 20 different monogenic forms of dystonia have been described (DYT1 to DYT21; with DYT14 = DYT5 and DYT9=DYT18), and 11 genes in which mutations cause dystonia have been identified. Eight monogenic forms are inherited as autosomal dominant (*TOR1A/DYT1*, *GCH1/DYT5a*, *THAP1/DYT6*, *PNKD/MR-1/DYT8*, *PRRT2/DYT10*, *SGCE/DYT11*, *ATP1A3/DYT12* and *SLC2A1/DYT18*), two as autosomal recessive (*TH/DYT5b* and *PRKRA/DYT16*) and one as an X-linked recessive (*TAF1/DYT3*) trait. According to data from the literature, previous clinical praxis and epidemiological data, it has been shown that DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 or DYT18 are the most frequent types of dystonia in primary dystonia cases.

Aim: This study was aimed to determine the frequency of mutations and the mutation spectrum in DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 and DYT18 genes in Serbian primary dystonia patients. Another aim of this study was to examine the genotype-phenotype correlations in patients positive for mutations and to propose a testing scheme for dystonia in Serbian population.

Material and methods: This study comprised 352 primary dystonia patients, 45 patient's relatives, and 106 control subjects without neurological disorders. The presence of *TOR1A*, *THAP1*, *GCHI*, *SGCE*, *PNKD* and *SLC2A1* gene mutations was analyzed by automatic sequencing, while the presence of c.68C>T mutation in exon 1 of *GCHI* gene was determined by allele-specific PCR. Duplications and deletions in *GCHI* and *SGCE* genes were analyzed by MLPA method. For statistical analyses χ^2 test and Fisher test were used.

Results: A total number of 14 different mutations were detected in 42 persons in analyzed genes. Mutation c.907_909delGAG in *TOR1A* gene was detected in 17 samples (9 patients and 8 asymptomatic family members). Five different mutations were found in *THAP1* gene (c.-220C>T, c.62C>G, c.85C>T, c.109_132dupl, c.496G>T) in 12 samples (7 patients and 5 asymptomatic relatives). In 9 samples (8 patients and 1 asymptomatic family member) 4 different *GCHI* mutations (exon 1 deletion, c.228delG, c.470T>C, c.626+1G>A) were detected. In *SGCE* gene, two different mutations (c.709C>T, c.966delT) were revealed in two patients. One patient harbored mutation in *PNKD* gene (c.26C>T), and also one patient had mutation in *SLC2A1* gene (c.516delG).

Conclusion: A bank of blood and DNA samples from 352 Serbian primary dystonia patients and 45 relatives has been established. Methods for mutation detection in *TOR1A* (DYT1), *THAP1* (DYT6), *GCHI* (DYT5a), *SGCE* (DYT11), *PNKD* (DYT8) and *SLC2A1* (DYT18) genes have been optimized. A total number of 14 different mutations in 42 samples were detected, where 6 mutations haven't been reported in the literature yet. Mutation frequencies are in accordance with data published so far. Phenotypic presentation in patients with mutation corresponded to the clinical spectrum that is described for the certain types of dystonia in the literature. A scheme for the testing strategy of primary dystonia in Serbian population has been proposed.

Keywords: dystonia, neurogenetic, DYT1, DYT6, DYT5a, DYT11, DYT8, DYT18, genetic testing

Academic Expertise: Medical Genetics

Field of Academic Expertise: Neurogenetics

UDK number: 616.8-009.18:577.2 (497.11) (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ISTORIJAT	1
1.2. KLASIFIKACIJA DISTONIJA	2
1.3. DYT1	4
1.3.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	4
1.3.2. Molekularno genetička osnova DYT1	5
1.3.3. Protein TORZIN A: struktura, uloga i molekularna patologija	7
1.4. DYT6	11
1.4.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	11
1.4.2. Molekularno genetička osnova DYT6	12
1.4.3. Protein THAP1: struktura, uloga i molekularna patologija	13
1.5. DYT5a	16
1.5.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	16
1.5.2. Molekularno genetička osnova DYT5a	17
1.5.3. Protein GTPCH1: struktura, uloga i molekularna patologija	19
1.6. DYT11	22
1.6.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	22
1.6.2. Molekularno genetička osnova DYT11	23
1.6.3. Protein epsilon-sarkoglikan: struktura, uloga i molekularna patologija	25
1.7. DYT8	27
1.7.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	27
1.7.2. Molekularno genetička osnova DYT8	28
1.7.3. Protein PNKD: struktura, uloga i molekularna patologija	29
1.8. DYT18	32
1.8.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje	32
1.8.2. Molekularno genetička osnova DYT18	32
1.8.3. Protein GLUT1: struktura, uloga i molekularna patologija	34
2. CILJEVI RADA	38

3. MATERIJAL I METODE	39
3.1. PACIJENTI I KONTROLE	39
3.2. IZOLOVANJE GENOMSKE DNK IZ LIMFOCITA	
PERIFERNE KRVI	40
3.2.1. Procedura izolacije DNK iz limfocita periferne krvi upotrebom QIAamp DNA mini kita	40
3.3. ODREĐIVANJE KVANTITETA I KVALITETA GENOMSKE DNK	41
3.3.1. Procedura određivanja koncentracije DNK na spektrofotometru	42
3.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERIZACIJE – PCR	42
3.4.1. Alel-specifičan PCR	48
3.5. ELEKTROFOREZA NA AGAROSNOM GELU	49
3.5.1. Procedura pripreme agaroznog gela	49
3.5.2. Procedura pripreme uzoraka i elektroforeza	50
3.6. ELEKTROFOREZA NA DENATURISUĆEM POLIAKRILAMIDNOM GELU (PAGE)	50
3.6.1. Procedura pripreme denaturišućeg poliakrilamidnog gela	51
3.6.2. Procedura pripreme uzoraka za elektroforezu i elektroforeza	51
3.6.3. Procedura bojenja gela srebrom	52
3.7. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	52
3.7.1. Sekvenciranje uzoraka	53
3.7.1.1. Priprema uzoraka za reakciju sekvenciranja	54
3.7.1.2. Reakcija sekvenciranja (<i>Cycle sequencing</i> reakcija)	55
3.7.1.3. Prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja etanol/Na-acetat precipitacijom	55
3.7.1.4. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja	56
3.7.1.5. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem	57
3.7.2. MLPA (eng. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	58
3.7.2.1. Procedura pripreme MLPA reakcije	59

3.7.2.2. Procedura pripreme MLPA uzoraka za kapilarnu elektroforezu	60
3.7.2.3. Kapilarna elektroforeza MLPA produkata i analiza rezultata	61
3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	61
4. REZULTATI	62
4.1. DETEKCIJA GAG DELECIJE U <i>TOR1A</i> /DYT1 GENU	62
4.2. ANALIZA SEKVENCE <i>THAP1</i> /DYT6 GENA	64
4.3. ANALIZA SEKVENCE <i>GCHI</i> /DYT5a GENA	68
4.4. ANALIZA SEKVENCE <i>SGCE</i> /DYT11 GENA	71
4.5. DETEKCIJA c.20C>T, c.26C>T i c.97G>C MUTACIJA U <i>PNKD</i> /DYT8 GENU	73
4.6. ANALIZA SEKVENCE <i>SLC2A1</i> /DYT18 GENA	74
5. DISKUSIJA	77
5.1. DYT1	77
5.2. DYT6	78
5.2.1. Promene u kodirajućim regionim	78
5.2.2. Promene u nekodirajućim regionima	80
5.2.3. Genotip-fenotip korelacije	81
5.3. DYT5a	82
5.3.1. Promene u kodirajućim regionim	83
5.3.2. Promene u nekodirajućim regionima	85
5.3.3. Genotip-fenotip korelacije	86
5.4. DYT11	87
5.4.1. Promene u kodirajućim regionima	87
5.4.2. Promene u nekodirajućim regionima	89
5.4.3. Genotip-fenotip korelacije	89
5.5. DYT8	90
5.5.1. Promene u kodirajućim regionima	90
5.5.2. Genotip-fenotip korelacije	91
5.6. DYT18	91

5.6.1. Promene u kodirajućim regionima	91
5.6.2. Promene u nekodirajućim regionima	92
5.6.3. Genotip-fenotip korelacije	92
5.7. ŠEMA ZA GENETSKO TESTIRANJE	93
6. ZAKLJUČCI RADA	97
7. LITERATURA	99
8. BIOGRAFIJA AUTORA	127

1. UVOD

1.1. ISTORIJAT

Prvi opis bolesnika sa generalizovanom torzionom distonijom dao je španski lekar Luis Barraquer I Roviralta (1855–1928) 1897. godine (Barraquer, 1897; Barraquer-Bordas and Gimenez-Roldan, 1988). Nekoliko godina kasnije, 1908. godine, Marcus Walter Schwalbe (1883–1927) objavljuje disertaciju o porodici sa troje bolesne dece čiji su simptomi kasnije prepoznati kao primarna generalizovana distonija ranog početka (Schwalbe, 1908). Tri godine kasnije, 1911. godine, Hermann Oppenheim (1858–1919) opisuje četvoro dece sa istim oboljenjem i uvodi termin *dystonia musculorum deformans* (Oppenheim, 1911). Međutim, Oppenheim nije uočio naslednu prirodu bolesti, što su iste godine, nešto kasnije, uradili Flatau i Sterling i predložili naziv progresivni torzioni spazam (Flatau and Sterling, 1911). Naziv *distonija* je ipak vrlo brzo prihvaćen od strane neurologa i korišćen je da opiše kako posebnu motoričku fenomenologiju tako i klinički sindrom u kome se ove motoričke karakteristike javljaju. Vremenom su terminu distonija davana različita značenja, sve dok na odboru fondacije Dystonia Medical Research Foundation nije data sledeća definicija: Distonija je sindrom produžene mišićne kontrakcije koja (često) dovodi do uvrtnja, repetitivnih pokreta ili zauzimanja abnormalnog položaja (Fahn, 1987; Fahn, 1988).

Veliki doprinos na polju distonije dali su i Ernst Herz i Wolfgang Zeman sa saradnicima. Herz je u svojim radovima pokazao da je distonija zaseban neurološki entitet, ali i da se javlja u drugim neurološkim bolestima (Herz, 1944a, b, c). Wolfgang Zeman i saradnici su izveli prve epidemiološke studije, istakli autozomno dominantni obrazac nasleđivanja i opisali fokalne distonije kao *formes frustes* generalizovane distonije (Zeman, 1970; 1976; Zeman and Dyken 1967, Zeman *et al.*, 1959; 1960).

Međutim, verovatno najveći događaj u istorijatu proučavanja distonije bilo je otkrivanje lokusa 9q32–34 za idiopatsku distoniju koji je označen kao DYT1 1989. godine (Ozelius *et al.*, 1989). Od tada pa sve do danas kontinuirano traje opisivanje novih genetskih formi distonija.

Procenjeno je da je prevalencija distonija barem 10 na 100 000 osoba (Matsumoto *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 2004). U populaciji Srbije utvrđeno je da je prevalencija svih tipova primarnih distonija 13.6 na 100 000 osoba (Pekmezovic *et al.*, 2003).

1.2. KLASIFIKACIJA DISTONIJA

Postoji više vrsta klasifikacija distonija. U kliničkoj praksi najčešće se koristi klasifikacija zasnovana na delu, odnosno delovima tela koji su zahvaćeni distonijom. Tako razlikujemo fokalnu (zahvaćen je samo jedan deo tela), segmentnu (zahvaćeni su susedni delovi tela), multifokalnu (zahvaćeni su nesusedni delovi tela), generalizovanu (zahvaćene su obe noge i najmanje još jedan deo tela) i hemidistoniju (zahvaćena je polovina tela, najčešće je simptomatska).

Etiološka klasifikacija podrazumeva postojanje primarnih (idiopatskih) i sekundarnih (simptomatskih) distonija (Fahn *et al.*, 1998; Geyer and Bressman, 2006). Kod primarnih formi, distonija je jedini simptom bolesti, najčešće ne postoje značajne neuropatološke promene i njihov uzrok je obično ili genetski ili nije poznat. Kod sekundarnih formi, distonija je samo jedan od simptoma bolesti i prouzrokovana je različitim poznatim uzrocima (npr. encefalitis, perinatalno moždano oštećenje, trauma, lekovi/toksini, moždani udar, različite neurodegenerativne bolesti).

Najnovija i opšteprihvaćena klasifikacija distonija je molekularna klasifikacija. Ona je izvršena prema genskim lokusima vezanim za određene tipove distonija, pri čemu su monogenske forme označavane akronimom *DYT* i rednim brojem prema hronološkom redu pojavljivanja u literaturi (Tabela 1). Do sada je okarakterisano najmanje dvadeset monogenetskih distonija (lokusi *DYT1–DYT21*; pri čemu je *DYT14=DYT5a* (Wider *et al.*, 2008) i *DYT9=DYT18* (Weber *et al.*, 2011)), od kojih je za jedanaest identifikovan i gen koji je odgovoran za pojavu bolesti (Brüggemann and Klein 2010; Norgren *et al.*, 2011). Od ovih jedanaest monogenetskih distonija, osam se nasleđuje autozomno dominantno (*TOR1A/DYT1*, *GCHI/DYT5a*, *THAP1/DYT6*, *PNKD/MR-1/DYT8*, *PRRT2/DYT10*, *SGCE/DYT11*, *ATP1A3/DYT12* i *SLC2A1/DYT18*), dve autozomno recesivno (*TH/DYT5b* i *PRKRA/DYT16*) i jedna X-vezano recesivno (*TAF1/DYT3*).

Tabela 1. Molekularna klasifikacija distonija.

Oznaka	Klinička slika	Nasleđivanje	OMIM	Genski lokus	Gen
DYT1	Generalizovana torziona distonija ranog početka	AD	128 100	9q34	TOR1A
DYT2	Autozomno recesivna torziona distonija	AR	224 500	–	–
DYT3	Lubag, X-vezana distonija-parkinsonizam	XR	314 250	Xq13.1	TAF1
DYT4	„Whispering” distonija (opisana samo jedna porodica)	AD	128 101	–	–
DYT5a	Dopa-responsivna distonija, Segawa sindrom	AD	128 230	14q22.1–q22.2	GCH1
DYT5b	Autozomno recesivna dopa-responsivna distonija	AR	128 230	11p15.5	TH
DYT6	Torziona distonija mešanog tipa sa početkom u adolescenciji	AD	602 629	8p11.21	THAP1
DYT7	Fokalna distonija sa adultnim početkom	AD	602 124	18p	–
DYT8	Paroksizmalna nekinezigena diskinezija	AD	118 800	2q35	PNKD/MR1
DYT10	Paroksizmalna kinezigena diskinezija	AD	128 200	16p11.2–q12.1	PRRT2
DYT11	Mioklonička distonija	AD	159 900	7q21	SGCE
DYT12	Distonija brzog početka sa parkinsonizmom	AD	128 235	19q12–q13.2	ATP1A3
DYT13	Kraniocervikobrahijalna distonija	AD	607 671	1p36.13–p36.32	–
DYT15	Mioklonička distonija	AD	607 488	18p11	–
DYT16	Autozomno recesivna distonija–parkinsonizam	AR	612 067	2q31.3	PRKRA
DYT17	Torziona distonija juvenilnog početka sa tortikolisom i dizartrijom	AR	612 406	20p11.22–q13.12	–
DYT18	Paroksizmalna naporom izazvana diskinezija	AD	612 126	1p31.3–p35	SLC2A1
DYT19	Paroksizmalna kinezigena diskinezija 2	AD	611 031	16q13–q22.1	–
DYT20	Paroksizmalna nekinezigena diskinezija	AD	611 147	2q31	–
DYT21	Torziona distonija kasnog početka	AD	614 588	2q14.3–q21.3	–

AD autozomno dominantno, AR autozomno recesivno, OMIM (eng. *online mendelian inheritance in man*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Monogenske forme distonije se vrlo često iz praktičnih razloga dele na: čiste distonije, distonija-plus sindrome i paroksizmalne distonije. Čiste primarne distonije sa poznatom genetskom osnovom su DYT1, DYT6 i DYT16. Za distonija-plus sindrome karakteristično je da se pored distonije, koja je glavni simptom, javlja i još neki simptom iz grupe poremećaja pokreta (Klein, 2005). Forme distonija-plus sindroma su: dopa-reaktivna

distonija (DYT5), mioklonička distonija (DYT11) i distonija brzog početka sa parkinsonizmom (DYT12). Paroksizmalne diskinezije se manifestuju epizodično, distonija je obično samo jedan od nekoliko prisutnih poremećaja pokreta i između epizoda ne postoje neurološke abnormalnosti. Od paroksizmalnih diskinezija sa poznatom genetskom osnovom ovde pripadaju: paroksizmalna nekinezigena diskinezija (DYT8), paroksizmalna kinezigena diskinezija (DYT10) i paroksizmalna naporom izazvana diskinezija (DYT18).

Na osnovu podataka iz literature, dosadašnje kličke prakse i epidemioloških podataka pokazalo se da se kod bolesnika obolelih od primarne distonije najčešće radi o DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 ili DYT18 distoniji.

1.3. DYT1

1.3.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

Distonija tip 1 (DYT1) je distonija ranog početka. U proseku, prvi simptomi počinju oko 12. godine starosti (12.5 ± 8.2) (Fahn and Jankovic, 2007), obično se javljaju na ekstremitetima i distonija se generalizuje kroz nekoliko godina od početka bolesti. Međutim, klinička slika DYT1 može značajno da se razlikuje kako u pogledu godina i mesta početka prvih simptoma, tako i u stepenu progresije simptoma. Moguć je početak bolesti u adolescentnom ili ranom odraslom dobu, a u nekim slučajevima distonija se ne generalizuje nego ostaje fokalna ili segmentna (Bressman *et al.*, 2002; Grundmann *et al.*, 2003).

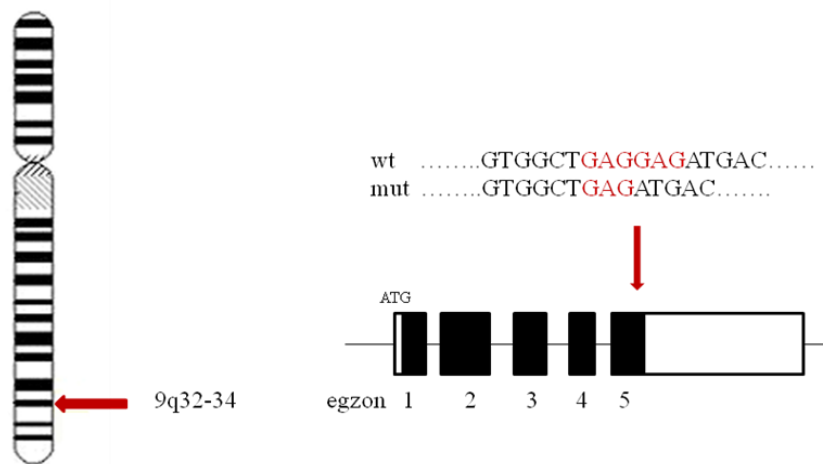
DYT1 se najčešće javlja u populaciji Aškenazi Jevreja sa procenjenom prevalencijom od 1/16 000–1/20 000. U nejevrejskoj populaciji prevalencija iznosi oko 1/200 000 (Müller and Kupke, 1990). Veća prevalencija u Aškenazi populaciji posledica je efekta osnivača i genetskog drifta (mala osnivačka populacija je doživela dramatičan porast u 18. veku), a ne neke selektivne prednosti koju bi imali nemanifestni heterozigotni nosioci (Risch *et al.*, 1995). Takođe, procenjeno je da se u oko 16% do 53% distonija ranog početka u nejevrejskim i 80% do 90% distonija ranog početka u Aškenazi populaciji radi o

distoniji tip 1 (Risch *et al.*, 1995; Bressman *et al.*, 1994; Valente *et al.*, 1998; Ikeuchi *et al.*, 1999; Bressman *et al.*, 2000; Zorzi *et al.*, 2002).

Nasleđivanje DYT1 je autozomno dominantno sa smanjenom penetrabilnošću od 30% (Bressman *et al.*, 1989, Risch *et al.*, 1990).

1.3.2. Molekularno genetička osnova DYT1

Prva distonija za koju je mapiran genski lokus je bila forma distonije opisana od strane Oppenheim-a (1911), danas poznata kao DYT1. Ovaj lokus je mapiran na dugom kraku hromozoma 9 (9q32–34) (Ozelius *et al.*, 1989) (Slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *TOR1A* gena.

Gen odgovoran za DYT1, *TOR1A* gen, identifikovali su Ozelius i saradnici 1997. godine. *TOR1A* se nalazi na dugom kraku hromozoma 9, prostire se na 11,2 kb i sadrži pet egzona. Delecija jednog od dva susjedna GAG trinukleotida u egzonu 5 *TOR1A* gena dovodi do gubitka jedne glutaminske kiseline u blizini C-terminusa proteina torzinaA i uzrokuje fenotip DYT1 (Ozelius *et al.*, 1997). Oznaka ove mutacije na nivou sekvence DNK je c.904_906delGAG, odnosno na nivou proteina p.Glu302del ili $\Delta E302$. Analiza haplotipa koji obuhvata GAG deleciju pokazala je da je ova mutacija nastala nezavisno u nekoliko populacija (Klein *et al.*, 1998). U populaciji Aškenazi Jevreja GAG delecija potiče

od zajedničkog pretka koji je živeo pre oko 350 godina u Belorusiji ili Litvaniji (Risch *et al.*, 1995). Pretpostavlja se da bi uzrok visoke učestalosti javljanja GAG delecije u *TORIA* genu mogla biti genetska nestabilnost izazvana postojanjem nesavršenog tandemskog ponovka od 24bp u regionu delecije (Klein *et al.*, 1998).

Osim GAG delecije, još nekoliko mutacije je opisano u *TORIA* genu. U egzonu 5 opisana je delecija od 18bp (c.966_983del18) u porodici gde su oboleli članovi imali distoniju i mioklonus (Leung *et al.*, 2001). Međutim, kasnije je pokazano da su oboleli članovi nosili i mutaciju u *SGCE* genu koji uzrokuje miokloničku distoniju (Klein *et al.*, 2002a), čime je bačena sumnja na značaj 18bp delecije kao uzročnika simptoma bolesti. Još jedna delecija u egzonu 5 *TORIA* gena, ali od 4bp (c.934_937delAGAG), pronađena je kod zdrave osobe koja je bila deo kontrolnog uzorka i nije neurološki pregledana (Kabakci *et al.*, 2004). Patogenost ove mutacije takođe ostaje nerazjašnjena. Tranzicija u egzonu 5 (c.863G>A) opisana je kod bolesnice sa generalizovanom distonijom i njene asimptomatske majke. Ova mutacija pogađa evolutivno visoko konzervirani arginin na poziciji 288 i zamenjuje ga glutaminom. Osim toga, funkcionalne studije na ćelijskom nivou pokazale su da na jedarnoj membrani dolazi do istih morfoloških promena (uvećanje perinuklearnog prostora) koje se dešavaju i u slučaju tipične GAG delecije. Sve ovo ukazuje na verovatnu patogenost navedene mutacije (Zirn *et al.*, 2008a). Još jedna tačkasta mutacija (c.613T>A) opisana je kod bolesnice sa fokalnom distonijom kasnog početka. Ova mutacija dovodi do zamene visoko konzerviranog fenilalanina na poziciji 205 izoleucinom. Ekspresione studije na ćelijskim kulturama pokazale su da i ova mutacija, kao i prethodna, dovodi do patoloških promena u ćeliji koje su vrlo slične onima koje su izazvane GAG delecijom, što sve govori u prilog njene patogenosti (Calakos *et al.*, 2010). Na kraju, pored gore navedenih promena u *TORIA* sekvenci treba istaći i značaj polimorfizma c.646G>C u egzonu 4. Ova transverzija dovodi do zamene aspartamske kiseline na poziciji 216 histidinom. Aspartamska kiselina se nalazi na 88%, a histidin na 12% alela u opštoj populaciji (Ozelius *et al.*, 1997). Ovaj polimorfizam deluje kao modifikator penetrabilnosti GAG delecije. U ćelijskom sistemu je pokazano da histidin na poziciji 216 slabi fenotipsku manifestaciju GAG delecije (Kock *et al.*, 2006). Takođe, kod osoba sa GAG delecijom učestalost His216 alela je povećana kod nemanifestnih nosilaca i smanjena kod nosilaca sa distonijom (Risch *et al.*, 2007; Kamm *et al.*, 2008).

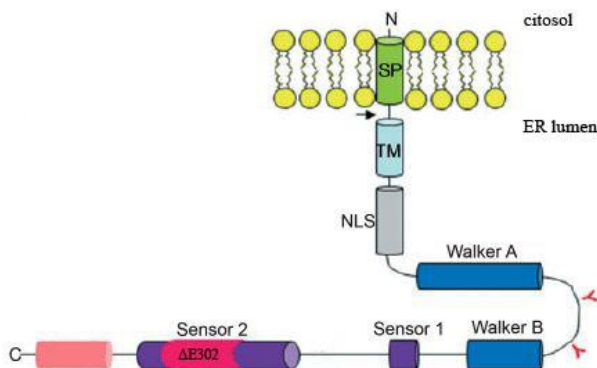
1.3.3. Protein TORZIN A: struktura, uloga i molekularna patologija

TORIA kodira za protein torzin A koji se sastoji od 332 amino kiseline (~37kD) (Ozelius *et al.*, 1997). Ovaj protein deli 70% homologije sa proteinom koji je nazvan torzin B i čiji gen mapira na hromozomu 9q34, i to odmah do *TORIA* u rep-rep orijentaciji. Pretpostavlja se da su oba gena nastala tandemsom duplikacijom predačkog gena (Ozelius *et al.*, 1999). Osim torzina B, torzin A ima još dva homologa sa kojima deli 50% homologije u aminokiselinskoj sekvenci. To su torzin 2A, čiji je gen mapiran na poziciji 9q34 oko 10 cM centromerno od *TORIA* i torzin 3A, čiji je gen mapiran na poziciji 1q24 (Ozelius *et al.*, 1999; Dron *et al.* 2002). Torzin A, kao i sva tri njegova homologa široko su eksprimirani (Ozelius *et al.*, 1997; Ozelius *et al.*, 1999; Dron *et al.*, 2002). U CNS-u je najviši nivo ekspresije torzina A pokazan u dopaminergičkim neuronima pars compacta substantije nigre (Augood *et al.*, 1998; 1999), ukazujući na vezu između dopaminergičkog sistema bazalnih ganglija i DYT1 distonije (Shashidharan *et al.*, 2000; Konakova and Pulst, 2001; Augood *et al.*, 2003).

Torzin A je član AAA+ (eng. *ATPases associated with diverse cellular activities*) familije ATPaza (Lupas *et al.*, 1997; Neuwald *et al.*, 1999; Ozelius *et al.*, 1997). Tipično za proteine ove familije je da: formiraju šestočlani homomerne prstenaste strukture, poseduju Mg^{++} zavisnu ATPaznu aktivnost i imaju istovetnu sekundarnu strukturu (Neuwald *et al.*, 1999). Oni obavljaju funkciju šaperona odnosno, posreduju u promenama konformacije svojih ciljnih proteina, imaju ulogu u zauzimanju ispravne konformacije proteina koji se sintetišu, degradaciji denaturisanih proteina, citoskeletnoj dinamici, membranskom prometu, fuziji vezikula i pokretanju organela (Hanson and Whiteheart, 2005; Vale, 2000).

Prema primarnoj strukturi (Slika 2) predviđeno je da torzin A na N-terminusu ima sekvencu signalnog peptida (SP; ak 1-20) koja se uklanja sa finalnog proteina. Zatim sledi pretpostavljeni transmembranski domen (TM) i signal za jedarnu lokalizaciju (NLS; ak 76-94). Između SP i TM domena nalazi se mesto odsecanja signalnog peptida, što dovodi do potpune translokacije torzina A u lumen endoplazmatičnog retikuluma (ER). Posle NLS domena sledi AAA+ modul koji se sastoji od Walker A (ak 95-119) i Walker B (ak 164-175) nukleotid vezujućih motiva, i zatim, na C-terminusu, dva α heliksa Sensor1 i Sensor2 (Neuwald *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2004). Pretpostavlja se da upravo ova dva Sensor domena

posreduju u interakciji sa supstratom i da imaju ključnu ulogu u hidrolizi ATP-a (Ogura and Wilkinson, 2001). Mutacija $\Delta E302$ nalazi se u sensor2 regionu. Torzin A poseduje i dva mesta moguće glikozilacije, N143 i N158 (Ozelius *et al.*, 1997; 1999; Neuwald *et al.*, 1999; Kamm *et al.*, 2004; Callan *et al.* 2007).



Slika 2. Šematski prikaz strukture torzina A, adaptirano iz Granata *et al.*, 2009. Streljci označava mesto sečenja signalnog peptida.

U više studija je pokazano da torzin A ima funkciju na nekoliko subćelijskih lokacija uključujući jedarnu ovojnicu (Goodchild and Dauer 2004; Naismith *et al.*, 2004), endoplazmatski retikulum (ER) (Hewett *et al.* 2000; 2003; Kustedjo *et al.*, 2003) i kompartmane sekretornih i sinaptički vezikula (Hewett *et al.*, 2007; 2008; Torres *et al.*, 2004; Granata *et al.*, 2008).

Prvi biohemijski rezultati su ukazivali da je normalni, odnosno wild-type (wt), torzin A membranski protein u ER okrenut ka lumenu (Hewett *et al.*, 2000; 2003; Kustedjo *et al.* 2003). Međutim, nešto kasnije je pokazano da je torzin A potpuno lociran u lumenu ER-a, a da je sa membranom samo periferno asociran (Callan *et al.*, 2007). U skladu sa ovim je i podatak da torzin A interaguje sa luminalnim domenom LULL1 (eng. *luminal domain-like LAP1*) proteina, transmembranskog proteina predominantno lokalizovanog u ER-u (Goodchild and Dauer, 2005). Takođe, pokazano je da torzin A kolokalizuje sa printor proteinom u ER-u. Pretpostavlja se da printor služi kao kofaktor torzinu A (Giles *et al.*, 2009).

Značajan deo domena torzina A koji je asociran sa membranom interaguje sa proteinima van ER-a, uključujući citoplazmatski KLC1 (Kamm *et al.*, 2004) i citoskeletni protein vimentin (Hewett *et al.*, 2006). KLC1 je subjedinica kinezin 1 motornog kompleksa koji predstavlja molekularni motor odgovoran za anterogradni transport duž mikrotubula,

pa je sugerisano da bi torzin A mogao učestvovati u intraćelijskom transportu regulišući asocijaciju kinezina 1 sa njegovim „tovarom“. Ova interakcija je prekinuta u ćelijama koje ekspimiraju mutirani ΔE -torzin A. (Kamm *et al.*, 2004). Osim toga, u ćelijama neuroblastoma torzin A delimično kolokalizuje sa markerima sinaptičkih vezikula (Hewett *et al.*, 2000; 2006) i sa snapinom na dense-core granulama (Granata *et al.*, 2008). Interakcija sa vimentinom omogućava torzinu A da učestvuje u dinamici citoskeleta. Pokazano je da prekomerna ekspresija mutiranog torzina A inhibira rast neurita, sugerišući da mutirani torzin A može da ometa citoskeletne funkcije posredovane vimentinom (Hewett *et al.*, 2006; Ferrari-Toninelli *et al.*, 2004).

Smatra se da torzin A ima suštinsku ulogu u jedarnoj ovojnici gde se vezuje za specifične proteine ovojnice kao što su LAP1 (eng. *lamina-associated polypeptide 1*), SUN (eng. *Sad1 and UNC84 domain containing 1*) i nesprini (Goodchild and Dauer 2005; Jungwirth *et al.*, 2011; Nery *et al.*, 2008). LAP1 je koncentrisan na unutrašnjoj jedarnoj membrani i svojim C-terminalnim (lumenalnim) regionom interaguje sa torzinom A (Goodchild and Dauer, 2005). LAP1 ima ključnu ulogu u vezivanju lamina za unutrašnju jedarnu membranu (Powell and Burke, 1990). SUN1 protein je takođe lokalizovan u unutrašnjoj jedarnoj membrani i njegovo odsustvo u ćeliji dovodi do pomeranja torzina A i ΔE -torzina A iz jedarne ovojnice u ER. SUN proteini poseduju jedarni domen preko koga interaguju sa laminima i domen u lumenu jedarne ovojnice koji interaguje sa nesprinima, formirajući tako LINC kompleks (eng. *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) odnosno vezu između jedarnog i citoplazmatskog skeleta (Crisp *et al.*, 2006; Haque *et al.*, 2006; Razafsky and Hodzic, 2009). Nesprini su proteini koji povezuju spoljašnju jedarnu membranu sa citoskeletom i posreduju u interakciji jedra sa raznim citoskeletnim strukturama kao što su aktinski filamenti, intermedijarni filamenti, mikrotubule, kao i pridruženim motornim proteinima kao što su kinezin, dinein i dinaktin (Lu *et al.*, 2008). Uzevši sve ove interakcije u obzir, može se pretpostaviti da torzin A i proteini sa kojima on interaguje u jedarnoj ovojnici imaju ulogu u modulaciji veze između jedra i citoskeleta omogućavajući menjanje jedarne pozicije u ćeliji prilikom polarizacije, migracije i diferencijacije (Atai *et al.*, 2012).

Kada se prekomerno ekspimiraju i wt i mutirani torzin A (ΔE -torzin A) se detektuju u lumenu jedarne ovojnice (Gonzalez-Alegre and Paulson 2004; Goodchild and

Dauer 2004; Naismith *et al.*, 2004). Akumulacija ΔE -torzina A je povezana sa abnormalnom morfologijom jedarne ovojnice i formiranjem hernijacija i spiralnih perinuklearnih membranskih inkluzija (Hewett *et al.*, 2000; Kustedjo *et al.*, 2003; Gonzalez-Alegre and Paulson 2004; Misbahuddin *et al.*, 2005). U funkcionalnim analizama napravljeni su knock-in i knock-out animalni modeli. Knock-in modeli nose u svom genomu ubačen humani gen od interesa, dok su knock-out modeli konstruisani tako da im je iz genoma izbačen gen koji je homolog analiziranom humanom genu. Pokazano je da u kulturi primarnih neurona knock-in $Tor1a^{\Delta E/\Delta E}$ i knock-out $Tor1a^{-/-}$ miševa samo u neuronima dolazi do formiranja hernijacija i mehurića, dok su drugi tipovi ćelija pošteđeni. Treba napomenuti da kod $Tor1a^{\Delta E/+}$ miševa nije uočeno formiranje jedarnih vezikula, pa se pretpostavlja da do ovih morfoloških promena dolazi samo pri potpunom odsustvu funkcije torzina A, odnosno da one nisu dovoljno senzitivno merilo funkcije torzina A (Goodchild *et al.*, 2005). Fenotipske manifestacije na neuronima $Tor1a^{\Delta E/\Delta E}$ i $Tor1a^{-/-}$ miševa svakako vrlo dobro odražavaju tkivnu specifičnost simptoma bolesti kod ljudi. Ovim se nameće zaključak da torzin A učestvuje u biološkim procesima koji su specifični za neurone ili da učestvuje u široko zastupljenim ćelijskim procesima, ali su drugi tipovi ćelija manje osetljivi na njihovo remećenje. Studija na LAP1 knock-out miševima je pokazala da oni razvijaju identične abnormalnosti neuronalne jedarne membrane kao i knock-in $Tor1a^{\Delta E/\Delta E}$ i knock-out $Tor1a^{-/-}$ miševi, ali da se slične promene uočavaju i kod drugih ćelija. Odnosno, torzin A i LAP1 učestvuju u široko zastupljenim ćelijskim procesima na koje su selektivno osetljivi neuroni (kod torzin A mutiranog miša). Osim toga, pokazano je da je visok nivo torzina B u ostalim tipovima ćelija faktor koji ih štiti od posledice disfunkcije torzina A, čime se ukazuje na značaj funkcije LAP1 proteina i torzina B u patogenezi DYT1 distonije (Kim *et al.*, 2010).

Pretpostavlja se da u osnovi mehanizma patogeneze DYT1 leži dominantno negativan efekta ΔE -torzina A nad wt torzinom A koji dovodi do gubitka funkcije wt torzina A. Naime, pokazano je da ΔE -torzin A zajedno sa wt torzinom A gradi heteromultimere (Gonzalez-Alegre and Paulson, 2004). Multimeri koji sadrže ΔE -torzin A su „zarobljeni“ u jedarnoj ovojnici i tu se nagomilavaju uzrokujući abnormalnu morfologiju membrane (Goodchild and Dauer, 2004; Naismith *et al.*, 2004, Torres *et al.*, 2004, Gonzalez-Alegre *et al.*, 2005). Broj funkcionalnih multimera koji su formirani isključivo od

wt torzina A bi zavisio od odnosa nivoa ekspresije wt torzina A i ΔE -torzina A. Tako bi faktori koji utiču na ovaj odnos, kao što su potencijalni različiti mehanizmi degradacije ova dva proteina, mogli uticati na patogenezu bolesti i verovatno na penetrabilnost (Gordon and Gonzalez-Alegre, 2008).

Specifičan neurološki fenotip ΔE -torzin A mutacije ogleda se i u vezi torzina A sa prometom dopamina u neuronima. Naime, pokazano je da torzin A reguliše transport dopaminskog transportera DAT-1 do ćelijske membrane (Torres *et al.*, 2004). Na ćelijama neuroblastoma i hipokampalnim neuronima je pokazano da torzin A interaguje sa snapinom, proteinom koji je važna komponenta za egzocitozu vezikula i da prekomerna ekspresija ΔE -torzin A utiče na recikliranje sinaptičkih vezikula (Granata *et al.*, 2008; 2011). Kakazu i saradnici (2012) su radili na hipokampalnim neuronima homo- i heterozigotnih ΔE -torzin A knock-in miševa, i pokazali da jedna kopija ΔE -torzina A ubrzava egzocitozu koja se dešava posle izlaganje ćelije visokoj aktivnosti. Ovo pojačanje egzocitoze sinaptičkih vezikula u heterozigotnim neuronima ukazuje na to da wt torzin A inhibira sinaptičku transmisiju na presinaptičkom nivou. Regulacija recikliranja sinaptičkih vezikula na koju utiče neuronalna aktivnost ide u prilog teorije da sinaptičke abnormalnosti doprinose patofiziologiji DYT1 distonije.

1.4. DYT6

1.4.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

Distonija tip 6 (DYT6) je distonija ranog početka. Prvi simptomi najčešće pogađaju kranijalne mišiće (spazmodična disfonija, oromandibularna distonija), cervikalne mišiće (tortikolis) i mišiće gornjih ekstremiteta, mada je moguć početak simptoma i na donjim ekstremitetima (Ozelius 2004; Saunders-Pullman *et al.*, 2007). Simptomi obično počinju tokom detinjstva ili u adolescenciji, (16.8 ± 12.6 godina), ali su zabeleženi slučajevi početka u adultnom dobu (Le Doux *et al.*, 2012). Distonija tip 6 je progresivna, pa se često generalizuje tokom vremena. U poređenju sa DYT1 distonijom, DYT6 distonija ima kasniji

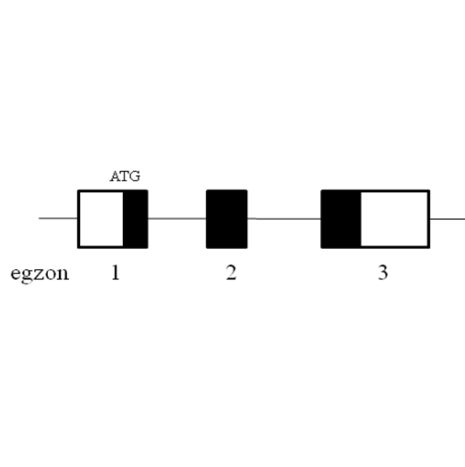
početak, češće zahvata kranio-cervikalni region i distribucija češće ostaje fokalna ili segmentna (Fuchs *et al.*, 2009; Bressman *et al.*, 2009; Ozelius, 2004; Saunders-Pullman *et al.*, 2007).

DYT6 je prvobitno opisana u populaciji Menonit Amiša (Almasy *et al.*, 1997; Saunders-Pullman *et al.*, 2007), ali su kasnije studije pokazale prisustvo DYT6 u mnogim drugim populacijama. Međutim, iako se procenjuje da bi DYT6 mogla biti drugi najčešći tip primarne monogenske distonije, još uvek nema podataka o njenoj prevalenciji (Müller, 2009). Takođe, još uvek se prikupljaju podaci o fenotipskom spektru ovog tipa distonije, s obzirom na to da je on pre svega nekoliko godina okarakterisan na molekularnom nivou.

Nasleđivanje DYT6 je autozomno dominantno, nezavisno od pola, sa smanjenom penetrabilnošću od oko 60% (Fuchs *et al.*, 2009).

1.4.2. Molekularno genetička osnova DYT6

Analizama vezanosti u dve porodice Menonit Amiša 1997. godine DYT6 lokus je mapiran na hromozomsku poziciju 8p21-q22 (Almasy *et al.*, 1997). Nekoliko godina kasnije navedeni region je sužen i na poziciji 8p11.21 identifikovan je *THAP1* gen u kome mutacije dovode do distonije tip 6 (Fuchs *et al.*, 2009) (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *THAP1* gena.

THAP1 kodira za THAP1 protein (eng. *Thanatos-associated protein domain containing apoptosis-associated protein 1*) i sastoji se od 3 egzona. Do sada je opisano više od 70 mutacija (LeDoux *et al.*, 2012) u *THAP1* genu koje se nalaze u sva tri egzona. Najčešće se javljaju tačkaste mutacije i to mutacije promenjenog smisla (*missense*) i besmislene mutacije (*nonsense*), dok su male delecije i insercije ređe opisivane (Blanchard *et al.*, 2011). Velike delecije i insercije do sad nisu opisane. U različitim studijama učestalost mutacija se kretala od 0.6 % (Bonetti *et al.*, 2009) do 4.7% (De Carvalho Aguiar *et al.*, 2010). Podaci o učestalosti DYT6 mutacija se razlikuju među studijama pre svega zbog primenjenih različitih kriterijuma za uključivanje bolesnika u studiju.

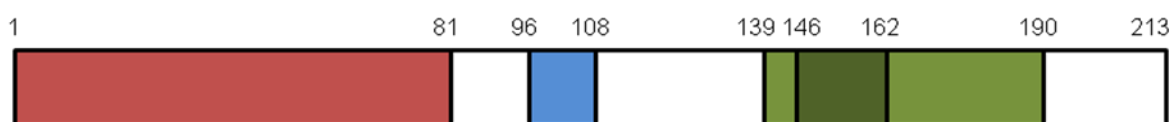
Iako je nasleđivanje DYT6 autozomno dominantno, opisana su i dva slučaja gde su pacijenti bili homozigotni nosioci mutacija u *THAP1* (p.N136S i p.L32H). Bolesnik koji je nosio homozigotnu p.N136S mutaciju imao je cervikalnu distoniju, bilateralnu distoniju ruku i negativnu porodičnu istoriju za distoniju (Houlden *et al.*, 2010). Sa druge strane, tri sestre iz braka u srodstvu, homozigoti za p.L32H mutaciju, imale su generalizovanu distoniju. Heterozigotni nosioci mutacije iz ove porodice bili su asimptomatski (Schneider *et al.*, 2011).

Osim mutacija u kodirajućem regionu, opisano je i sedam intronskih mutacija (Houlden *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Groen *et al.*, 2010; 2011; Lohmann *et al.*, 2012; Kamm *et al.*, 2011; Puschmann *et al.*, 2011), tri promene u 5'UTR regionu (Houlden *et al.*, 2010; Djamarti *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010; Groen *et al.*, 2010; 2011; Kamm *et al.*, 2011; Lohmann *et al.*, 2012; Maria *et al.*, 2012) i pet promena u 3'UTR regionu (Puschmann *et al.*, 2011; Lohmann *et al.*, 2012). Za neke od ovih varijanti je pokazano da se javljaju sa podjednakom učestalošću kod bolesnika i u kontrolnoj populaciji, ali za većinu potencijalni patogeni efekat (npr. kroz uticaj na iskrajanje egzona ili ekspresiju) tek treba da se odredi.

1.4.3. Protein THAP1: struktura, uloga i molekularna patologija

THAP1 protein je prvi od dvanaest članova THAP familije proteina koji se karakterišu prisustvom THAP (eng. *Thanatos-associated protein*) domena. To je cink-

vezujući domen koji se nalazi kod velikog broja proteina uključenih u procese regulacije transkripcije, apoptoze i kontrole ćelijskog ciklusa (Roussigne *et al.*, 2003). THAP1 protein je dugačak 213 aa, na njegovom N-terminusu nalazi se THAP domen (aa 1-81) koji se vezuje za DNK, zatim sledi prolinom bogat region (aa 90-110) i signal za jedarnu lokalizaciju (aa 146-162) koji se nalazi u okviru većeg *coiled-coil* domena (Clouaire *et al.*, 2005; Bessiere *et al.*, 2008) (Slika 4). Pretpostavlja se da bi THAP proteini preko *coiled-coil* domena mogli da posreduju u proteinskim interakcijama. Pokazano je da monomer THAP1 proteina ima nizak afinitet vezivanja za DNK (Campagne *et al.*, 2010) i da *in vivo* THAP1 verovatno funkcioniše kao homodimer u okviru nekog većeg multimernog DNK-vezujućeg kompleksa (Sengel *et al.*, 2011).



Slika 4. Šematski prikaz THAP1 proteina: crveno - THAP domen, plavo - prolinom bogat region, svetlo zeleno - *coiled-coil* domen, tamno zeleno - lokalizaciju, adaptirano sa www.umd.be.

Postoje dve izoforme THAP1 proteina (Girard *et al.*, 2010). Pored napred opisane forme, postoji i druga izoforma koja nastaje alternativnim iskrajanjem egzona 2 iz primarnog transkripta, tako da se dobija skraćeni protein kome nedostaje C-terminalni deo THAP domena. Obe izoforme su eksprimirane u mnogim tkivima, mada su sva dosadašnja proučavanja vezana za izoformu sa celim THAP domenom. Najviši nivo ekspresije THAP1 proteina je pokazan u srcu, skeletnim mišićima, bubrezima i jetri (Mazars *et al.*, 2010). U mozgu i placenti nivo ekspresije je nešto niži, pri čemu su regioni mozga sa najvišim nivoom ekspresije Purkinjeove ćelije malog mozga, girus dentatus, piramidalne ćelije hipokampusu i korteks malog mozga (LeDoux *et al.*, 2012).

Što se tiče unutarćelijske lokalizacije, THAP1 protein se nalazi samo u jedru. Može da ima ili difuznu ili diskretnu tačkastu distribuciju i asociiran je sa PML (eng. *promyelocytic leukemia*) jedarnim telašcima (Roussigne *et al.*, 2003). PML jedarna telašca su diskretni subjedarni domeni organizovani od strane PML proteina koji je tumor supresorni protein esencijalan u više apoptotskih puteva (Wang *et al.*, 1998a; 1998b). Osim

toga, ova telašca omogućavaju posttranslacionu modifikaciju partner proteina što dovodi do njihove sekvestracije, aktivacije ili degradacije (Bernardi and Pandolfi, 2007).

THAP1 protein interaguje sa Par-4 proteinom (eng. *prostate apoptosis response-4*), proapoptotskim proteinom koji deluje kao transkripcioni regulator i koji je takođe regrutovan u PML telašca (Roussigne *et al.*, 2003). Par-4 protein se pod normalnim uslovima nalazi u maloj količini u dendritima i sinapsama, ali se njegova količina naglo povećava u neuronima koji su izloženi okidačima kao što su ukidanje trofičkih faktora, oksidativni stres i egzotoksini (Duan *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1998). Indukcija ekspresije Par-4 gena je povezana sa smrću neurona kod nekoliko neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest (Duan *et al.*, 1999), Alchajmerova bolest (Guo *et al.*, 1998) i amiotrofična lateralna skleroza (Pedersen *et al.*, 2000). Osim toga, Par-4 protein interaguje sa D2 dopaminskim receptorom (D2DR), što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u modulaciji kalcijumom posredovanog dopaminergičkog signalnog puta (Park *et al.*, 2005). Pretpostavlja se da PML telašca regulišu funkciju THAP1 i Par-4 proteina tako što bi PML telašca bila mesta formiranja i/ili posttranslacione modifikacije THAP1/Par-4 kompleksa ili bi služila kao mesto njihovog skladištenja ili degradacije, regulišući tako nivo slobodnog THAP1 i Par-4 proteina u nukleoplazmi (Roussigne *et al.*, 2003).

Pokazano je da THAP1 protein obavlja ulogu transkripcionog faktora koji reguliše proliferaciju endotelijalnih ćelija i progresiju ćelijskog ciklusa iz G1 u S fazu tokom pripreme za deobu ćelije. THAP1 se vezuje za DNK motiv 5'-[AT]NTNN[GT]GGCA[AGT]-3' i moduliše ekspresiju gena pRB/E2F puta ćelijskog ciklusa, uključujući i *RRM1* gen. *RRM1* je u ćelijskom ciklusu ključan za prelaz iz G1 u S fazu i za sintezu DNK u S fazi ćelijskog ciklusa. Kako prekomerna, tako i nedovoljna ekspresija THAP1 dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa između G1 i S faze, odnosno neophodan je optimalan nivo THAP1 proteina da bi on mogao da obavlja svoje fiziološke funkcije (Cayrol *et al.*, 2007). Mazars i saradnici (2010) su pokazali da THAP1 aktivira ekspresiju *RRM1* gena u interakciji sa HCF-1 i OGT proteinima. HCF-1 (eng. *Host cell factor 1*) protein je potentni transkripcioni koaktivator i regulator ćelijskog ciklusa, dok OGT (eng. *O-GlcNAc transferase*) protein katalizuje transfer O-vezane N-acetilglukozamin grupe na razne ćelijske i jedarne proteine.

Najnovije studije ukazuju na funkcionalnu povezanost THAP1 i TOR1A proteina, a time i na zajedničke molekularne osnove DYT6 i DYT1 distonije. *In vitro* studije su pokazale da se THAP1 vezuje za promotorski region *TORIA* gena i reguliše njegovu ekspresiju (Kaiser *et al.*, 2010; Gavarini *et al.*, 2010). Pokazano je da wt THAP1 snižava ekspresiju *TORIA*, dok mutirani THAP1 smanjuje ovu represiju nad *TORIA*. Međutim, u kultivisanim fibroblastima u kojima je *THAP1* utišan pomoću RNK interferencije, ili u fibroblastima koji su nosili heterozigotnu *THAP1* mutaciju, nije bilo značajnih promena nivoa ekspresije *TORIA* (Kaiser *et al.*, 2010). Slično, u limfoblastoidnim ćelijskim linijama bolesnika sa *THAP1* mutacijama nije uočena promena u nivou *TORIA* ekspresije (Gavarini *et al.*, 2010). Moguće objašnjenje bi bilo da je THAP1-*TORIA* interakcija patofiziološki relevantna samo u CNS-u ili čak samo u određenim podtipovima neurona.

Iako još uvek nisu poznati svi kofaktori koji sa THAP1 proteinom učestvuju u regulaciji ciljnih gena, kao ni svi ciljni geni, dosadašnji podaci su povezali THAP1 protein sa apoptozom (preko interakcije sa Par-4) i sa regulacijom ćelijskog ciklusa (preko HCF-1).

1.5. DYT5a

1.5.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

Distonija tip 5a (DYT5a), poznata je još i pod nazivom Segawa sindrom, DRD (eng. *DOPA responsive dystonia*) ili autozomno dominantna GTP Ciklohidrolaza 1 deficitarna DOPA responsivna distonija. To je distonija plus sindrom koji se karakteriše dnevnom fluktuacijom simptoma u oko 75% slučajeva, parkinsonizmom i dramatičnim odgovorom na terapiju L-dopom (Segawa *et al.*, 1976; Nygaard, 1993a; Nygaard *et al.*, 1993b). Klinička slika DYT5a može da varira od generalizovane, segmentne i multifokalne distonije, preko abnormalnosti u položaju tela, parkinsonizma, abnormalnosti u hodu i blagog tremora do subjektivnih smetnji i simptoma koje je moguće uočiti samo prilikom indukcije tokom neurološkog pregleda (Nygaard *et al.*, 1990; Furukawa *et al.*, 1998a; Steinberger *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2002). Distonija DYT5a obično počinje u detinjstvu,

ali godine početka prvih simptoma vrlo variraju, pa bolest može početi i u adolescenciji ili čak u adultnom dobu.

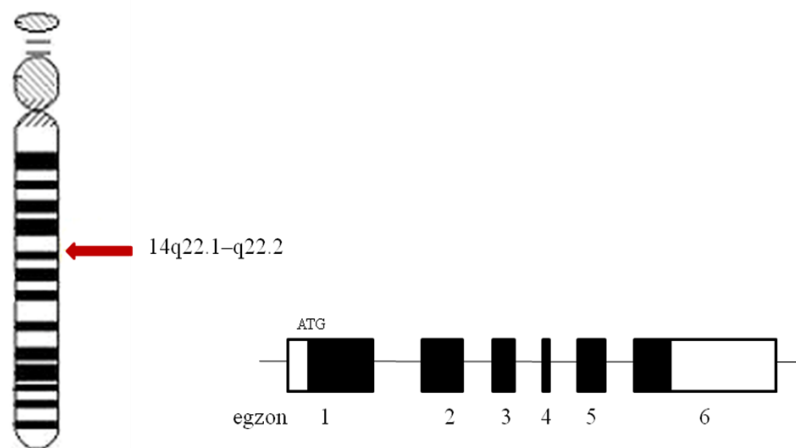
Prevalencija DYT5a procenjena je na 0,5/1 000 000, ali pretpostavlja se da je stvarna prevalencija ipak nešto veća zbog činjenice da određeni broj slučajeva promakne dijagnozi. Uočeno je i da žene oboljevaju češće od muškaraca (Nygaard *et al.*, 1988; 1993b). Nije uočena povećana prevalenca DYT5a ni u jednoj etničkoj grupi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>).

DYT5a se nasleđuje autozomno dominantno sa smanjenom penetrabilnošću. U različitim studijama su dobijane različite vrednosti penetrabilnosti. Tako je u jednoj velikoj severnoameričkoj porodici penetrabilnost prvobitno izračunata i iznosila je 30% (Nygaard *et al.*, 1990), ali kada su kasnije uzeti u obzir i manje приметni simptomi, penetrabilnost je procenjena na 60%. Studija na pet DYT5a porodica dala je prosečnu penetrabilnost od 80%, odnosno 100% kod žena i 55% kod muškaraca (Steinberger *et al.*, 1998). Druge dve studije dobile su međusobno slične vrednosti: 87% kod žena, 38% kod muškaraca (Furukawa *et al.* 1998a) i 87% kod žena, 35% kod muškaraca (Segawa *et al.* 2003).

U nekoliko porodica sa DYT5a sugerisano je postojanje fenomena anticipacije, odnosno ranija pojava simptoma i teža klinička slika bolesti u narednim generacijama (Segawa, 2000).

1.5.2. Molekularno genetička osnova DYT5a

Analizama vezanosti 1993. godine gen za DYT5a je mapiran na hromozomu 14q (Nygaard *et al.* 1993b). Vrlo brzo nakon toga izvršeno je preciznije mapiranje gena na poziciju 14q22.1-q22.2 i otkriveno je da se radi o *GCH1* genu (Ichinose *et al.*, 1994) (Slika 5).



Slika 5. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *GCHI* gena.

GCHI kodira za guanozin trifosfat ciklohidrolazu tip 1 (GTPCH1) i sastoji se od 6 egzona (Ichinose *et al.*, 1995). Do sada je opisano više od 150 mutacija u *GCHI* genu koje se nalaze duž svih 6 egzona uključujući i mesta za iskrajanje egzona. Tačkaste mutacije (*missense*, *nonsense* i mutacije u mestu za iskrajanje egzona) detektovane su kod 50% - 60% klinički dobro okarakterisanih slučajeva DYT5a (Bandmann *et al.*, 1996; 1998; Weber *et al.*, 1997; Steinberger *et al.*, 2000; Furukawa, 2004). Dosta često se opisuju i male delecije (Furukawa *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2002b, Hagenah *et al.*, 2005, Steinberger *et al.*, 2007; Zirn *et al.*, 2008b), pa je postojanje mutacije u *GCHI* genu, uključujući i mikrodelecije, pokazano kod 71%-87% slučajeva DYT5a (Hagenah *et al.*, 2005; Zirn *et al.*, 2008b).

Treba napomenuti da je do sada opisano i nekoliko slučajeva recesivnih mutacija u *GCHI* (Blau *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 1998b; Hwu *et al.*, 1999; Hirano and Ueno, 1999; Nardocci *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2008; Bruggemann *et al.*, 2012). Kod ovih bolesnika klinička slika može da se kreće od kompleksne neurološke disfunkcije i globalnog zaostajanja u razvoju do blage slike tipične DYT5a distonije.

Osim *GCHI* postoje i drugi geni u kojima mutacije mogu da dovedu do DYT5a fenotipa. Mutacije u *PTS* genu (gen za 6-piruvoil tetrahidropterin sintazu), obično dovode do hiperfenilalaninemije, mada je opisano da mogu da uzrokuju i DYT5a fenotip (Hanihara *et al.*, 1997). Mutacije u *SRP* genu (gen za sepiapterin reduktazu), su u nekoliko slučajeva opisivane da u homozigotnom stanju dovode do DYT5a distonije sa kompleksnim i teškim kliničkim simptomima (Bonafe *et al.*, 2001; Neville *et al.*, 2005, Abeling *et al.*, 2006).

Osim toga, u jednom slučaju autozomno dominantne DYT5a distonije, sa relativno blagom kliničkom slikom, detektovana je heterozigotna mutacija u 5' regionu koji se ne prevodi (5'UTR) *SRP* gena (Steinberger *et al.*, 2004). Homozigotne mutacije u *TH* genu (gen za tirozin hidroksilazu), dovode do tipične kliničke slike DYT5a (Ludecke *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 2001; Shiller *et al.*, 2004) ili do L-dopa responsivnog parkinsonizma (Ludecke *et al.*, 1996; van den Heuvel *et al.*, 1998). Homozigotne mutacije u *PARK2* genu najčešće uzrokuju juvenilni parkinsonizam, ali retko mogu da dovedu i do tipične DYT5a distonije (Tassin *et al.*, 2000). Kod autozomno recesivnih formi DRD fenotip je generalno teži i uključuje kognitivni deficit i zaostajanje u razvoju (Asmus and Gasser, 2010).

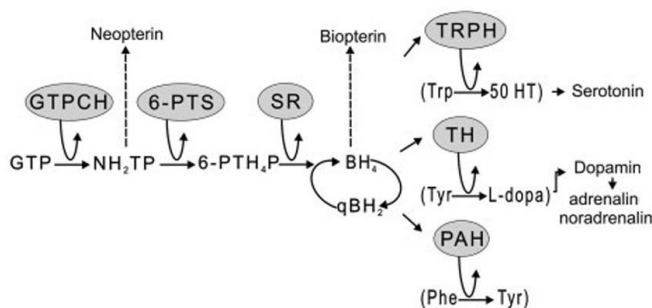
Kod DYT5a nije zapažen efekat osnivača; u većini slučajeva različite porodice nose različite mutacije - tzv. privatne mutacije. U skladu sa tim je i karakteristično visoka učestalost sporadičnih (*de novo*) mutacija u *GCHI* (Furukawa *et al.* 1998a).

Opisan je i jedan interesantan polimorfizam u kodirajućem regionu *GCHI* gena, u egzonu 1 (c.68C>T, p.Pro23Leu). Ova promena je prvobitno prijavljena kao patogena mutacija u 8 različitih porodica (Jarman *et al.*, 1997a; de la Fuente-Fernandez, 1997; Steinberger *et al.*, 2000; Scola *et al.*, 2007; Zirn *et al.*, 2008b). Međutim, opisana su dva slučaja gde se promena Pro23Leu javila zajedno sa malom delecijom, odnosno missense mutacijom, takođe u egzonu 1. Osim toga, utvrđeno je da se promena Pro23Leu javlja sa učestalošću od 1/174 kontrolna hromozoma a Polyphen softver je navedenu promenu protumačio kao benignu. Sve ovo ukazuje da se najverovatnije radi o polimorfizmu sekvence a ne o mutaciji koja uslovljava bolest (Clot *et al.*, 2009).

1.5.3. Protein GTPCH1: struktura, uloga i molekularna patologija

Protein GTPCH1 je član familije GTP ciklohidrolaza, sastoji se od 250 aa i ima ključni značaja u sintezi dopamina. GTPCH1 katalizuje konverziju GTP-a u D-eritro-7, 8-dihidroneopterin trifosfat, što je prvi korak u sintezi tetrahidrobiopterina (BH4). BH4 je esencijalni kofaktor za tirozin-, fenilalanin- i triptofan hidroksilaze koje katalizuju sintezu L-dope/dopamina, tirozina i 5-hidroksi-triptofana/serotonina, kao i za azot oksid sintaze (Thony *et al.*, 2000) (Slika 6.). Povoljni odgovor DYT5a bolesnika na L-dopu koji je uočen

u kliničkoj praksi u potpunosti koreliše sa otkrivenom molekularnom osnovom bolesti.



Slika 6. Put biosinteze pteridina; uloga GTP ciklohidroksilaze 1 (GTPCH1) u sintezi L-dopa, adaptirano iz Müller, 2009. GTP = guanozin trifosfat, NH₂TP = dihidroneopterin trifosfat, 6-PTS = 6-piruvoil tetrahydropterin sintaza, 6-PTH₄P = 6- piruvoil tetrahydropterin, BH₄ = tetrahydrobiopterin, qBH₂ = kuinoid dihidrobiopterin, Phe = fenilalanin, Tyr = tirozin, Trp = triptofan, PAH = fenilalanin hidroksilaza, TRPH = triptofan hidroksilaza. Strelice označavaju da TH, PAH i TRPH koriste BH₄ kao kofaktor.

GTPCH1 je homodekamerni enzim koga čine dva pentamerna prstena povezana na takav način da daju enzimu strukturu toroida (prstenasta struktura) (Auerbach *et al.*, 2000). Na periferiji toroida se nalazi deset aktivnih mesta, od kojih je svako formirano na tromeđi tri susedne subjedinice. Na GTPCH1 dekamer naležu dve „kape“ koje pravi GFRP protein (eng. *GCH feedback regulatory protein*) (Maita *et al.*, 2002; 2004).

Regulacija aktivnosti GTPCH1 enzima je dosta kompleksna. Pokazano je da se kod sisara BH₄ vezuje za GTPCH1, što dovodi do konformacionih promena i inhibicije enzima, dok fenilalanin preko formiranja kompleksa sa GFRP proteinom stabilizuje aktivnu konfiguraciju enzima (Harada *et al.*, 1993; Milstien *et al.*, 1996, Maita *et al.*, 2002; 2004). Za katalitičku aktivnost enzima neophodan je cink, dok joni magnezijuma dovode do inhibicije enzima (Suzuki *et al.*, 2004). Osim toga, aktivnost je modulirana i fosforilacijom (Hesslinger *et al.*, 1998; Lapize *et al.*, 1998), kao i inaktivnim izoformama GTPCH1 proteina (Pandya *et al.*, 2006). Inaktivne forme proteina nastaju translacijom alternativnih transkripata *GCH1* gena. Alternativnim iskrajanjem egzona 5 i 6 primarnog transkripta dobijaju se transkripti tip 2 i tip 4, dok

tip 3 sadrži prevremeni STOP kodon (Togari *et al.*, 1992; Golderer *et al.*, 2001). Proteini koji se sintetišu sa alternativnih transkripata tip 2, 3 i 4 imaju redom 213 ak, 209 ak i 233 ak i od wt proteina (tip 1, 250 ak) se razlikuju na C-terminusu (Golderer *et al.*, 2001). Enzimsku aktivnost poseduje samo protein tip 1 (Guetlich *et al.*, 1994). Pokazano je da

inaktivne izoforme imaju sposobnost formiranja dekamera i da koekspresija ovih izoformi zajedno sa wt enzimom dovodi do smanjenja kako nivoa enzima, tako i do smanjenja njegove enzimske aktivnosti. Jedno od mogućih objašnjenja kako inaktivne izoforme interferiraju sa funkcijom wt enzima bi moglo biti da se one ugrađuju u heterodekamere, smanjujući tako stabilnost i aktivnost enzima (Pandya *et al.*, 2006).

Iako je jasno da nedostatak funkcionalnog GTPCH1 dovodi do smanjene sinteze BH4, a samim tim dalje do nedovoljne sinteze L-dope i dopamina, nije razjašnjeno da li se radi o dominantno negativnom efektu *GCHI* mutacija ili o haploinsuficijenciji. U prilog dominantno negativnom efektu idu rezultati koji pokazuju da je kod nekih heterozigotnih nosilaca mutacije aktivnost GTPCH1 smanjena za više od 50% (Ichinose *et al.*, 1994), pa je pretpostavljeno da wt i mutirani monomeri formiraju nefunkcionalne GTPCH1 heterodekamere ili heterodekamere sa smanjenom aktivnošću. Još jednu potvrdu ove teorije pružili su eksperimenti gde je vršena kotransfekcija COS7 ćelija sa wt i mutiranom *GCHI* cDNK i dobijeno je smanjenje aktivnosti GTPCH1 enzima (Hirano and Ueno, 1999). Međutim, vrlo brzo je pokazano da kod barem dve *GCHI* mutacije (R88W i R184H) ne dolazi do formiranja heterodekamera (Suzuki *et al.*, 1999), kao i da potpune delecije *GCHI* gena takođe dovode do DYT5a fenotipa (Furukawa *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2002b, Hagenah *et al.*, 2005), što dokazuje da je haploinsuficijencija (nedostatak jedne funkcionalne kopije gena) *GCHI* sama po sebi dovoljna da izazove DYT5a.

Ekspresija *GCHI* je različito regulisana u različitim humanim tkivima (Hirano *et al.*, 1997) pa se pretpostavlja da fenotipska varijabilnost neuroloških simptoma od blagih do vrlo teških u GTPCH1 deficijenciji zavisi od stepena redukcije nivoa BH4 u mozgu (Furukawa *et al.*, 1998b; Ichinose *et al.*, 1995). Pokazano je da je ekspresija *GCHI* u nigrostrijatalnim dopaminergičkim (NSDA) neuronima miša, pacova i čoveka na vrlo niskom nivou (Lentz *et al.*, 1996; Shimoji *et al.*, 1999; Hirayama and Kapatos, 2001). Smatra se da upravo ovaj nizak nivo ekspresije čini funkcionisanje NSDA neurona jedinstveno osetljivim na mutacije koje snižavaju ekspresiju *GCHI* (Kapatos *et al.*, 2009). Postmortem biohemijske analize na mozgu DRD bolesnika pokazale su postojanje velikog smanjenja ne samo ukupnog biopterina (BP; većina se nalazi u obliku BH4), neopterina (NP; sporedni proizvod GTPCH1 enzimske reakcije) i dopamina (DA), nego i TH proteina u strijatumu (Rajput *et al.*, 1994; Furukawa *et al.*, 1999).

Zanimljivo je da kod asimptomatskih nosilaca *GCHI* mutacije takođe postoji značajno sniženje BP i NP u striatumu koje je jednako kao kod simptomatskih nosilaca (Furukawa *et al.*, 1999; 2002), ali je gubitak TH proteina umereniji (Furukawa *et al.*, 2002). Stoga je sugerisano da DRD nije uzrokovana samo smanjenom aktivnošću TH zbog niskog nivoa kofaktora (BH4), nego i zbog gubitka TH proteina, i da BH4 verovatno kontroliše stabilnost TH molekula (Furukawa and Kish, 1999; Furukawa *et al.*, 1999). U skladu sa ovim su i rezultati Sumi-Ichinose i saradnika (2001) koji pokazuju da u mozgu BH4-deficijentnih *PTS* knock-out miševa postoji gubitak TH proteina ali ne i TH iRNK.

1.6. DYT11

1.6.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

Distonija tip 11 (DYT11), poznata još i pod nazivom mioklonička distonija, karakteriše se brzim i kratkim mišićnim kontrakcijama (mioklonusom) i distonijom. Mioklonički trzaji su često prvi simptom koji se javlja i kasnije je praćen relativno blagom distonijom koja se manifestuje kao cervikalna distonija ili grč pisanja (Müller, 2009). Mioklonus uglavnom pogađa vrat i aksijalnu muskulaturu. Regioni donjih ekstremiteta ili lica su pogođeni u 25% slučajeva svaki (Asmus and Gasser, 2004; Nardocci *et al.*, 2008; Roze *et al.*, 2008). Kod većine bolesnika mioklonus se ublažava nakon konzumiranja alkohola. Osim toga, često se javljaju i psihijatrijski simptomi koji uključuju: depresiju, opsesivno-kompulzivno ponašanje, napade panike i poremećaj pažnje sa hiperaktivnošću (Kinugawa *et al.*, 2009). Distonija tip 11 obično počinje u detinjstvu i adolescenciji, ali može da počne i jako kasno, npr. tokom osme decenije života (Foncke *et al.*, 2006).

Distonija tip 11 je veoma retko oboljenje, procenjeno je da je njena prevalencija u Evropi 2/1 000 000 (Asmus *et al.*, 2007).

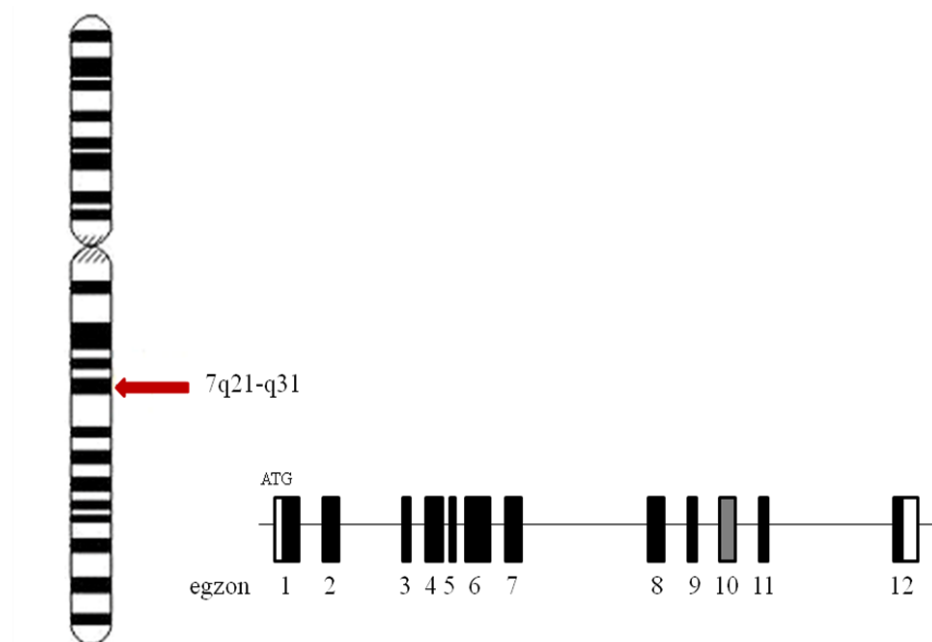
Nasleđivanje je autozomno dominantno sa smanjenom penetrabilnošću usled imprintinga alela nasleđenog od majke (Zimprich *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2002; Grabowski *et al.*, 2003). Pri tome, nasleđivanje mutiranog gena od oca uvek dovodi do

oboljevanja, a nasleđivanje od majke dovodi do razvoja bolesti samo u 10-15% slučajeva. Zbog toga, u porodicama gde je mutirani alel nasleđen od majke, može izgledati da je nasleđivanje bolesti pseudo-recesivno ili pseudo-sporadično. Opisano je da maternalna uniparentalna dizomija takođe može dovesti do DYT11 usled imprintinga (inaktivacije) oba majčina gena (Guettard *et al.*, 2008; Stark *et al.*, 2010).

Muškarci i žene oboljevaju sa jednakom učestalošću (Gasser, 1998; Klein, 2002).

1.6.2. Molekularno genetička osnova DYT11

Dve grupe autora su analizama vezanosti nezavisno pokazale je da se lokus odgovoran za DYT11 nalazi na hromozomu 7 (7q21-q31) (Nygaard *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2000) (Slika 7). Nakon toga, pozicionim kloniranjem ovaj region je sužen i otkriveno je pet heterozigotnih mutacija u *SGCE* genu kod šest nemačkih porodica sa miokloničkom distonijom (Zimprich *et al.*, 2001).



Slika 7. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *SGCE* gena.

SGCE gen kodira za protein epsilon-sarkoglikan (SGCE). Gen se sastoji od 12 egzona, pri čemu se egzon 10 (ili 9b) alternativno iskraja prilikom obrade primarnog

prepisa iRNK (Zimprich *et al.*, 2001). *SGCE* gen široko je eksprimiran kako u embrionalnim, tako i u adultnim tkivima, naročito u mišićima i nervnom sistemu (Ettinger *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 1999; Imamura *et al.*, 2000). U mozgu je posebno visoka ekspresija u olfaktornim mitralnim ćelijama, Purkinjeovim ćelijama u malom mozgu i monoaminergičkim neuronima srednjeg mozga (Chan *et al.*, 2005).

U okviru promotorskog regiona i prvog egzona *SGCE* gena nalaze se CpG ostrvca koja se različito metiliraju u zavisnosti od roditeljskog porekla alela. Alel nasleđen od majke je pretežno metilovan i time inaktiviran, dok je alel nasleđen od oca demetilovan i aktivan (Müller *et al.*, 2002; Grabowski *et al.*, 2003). To je molekularni mehanizam napred opisanog fenomena imprintinga *SGCE* gena.

Do sada je opisano više od 80 različitih heterozigotnih *SGCE* mutacija; u oko 95% slučajeva mutacije se nalaze u egzonima 1 – 7 koji kodiraju za ekstracelularni domen proteina, dok se u preostalih 5% nalaze u egzonu 9. Detektovane mutacije su po tipu *missense*, *nonsense*, mutacije u mestu za iskrajanje egzona, insercije i parcijalne ili potpune delecije.

Iako su promene u *SGCE* genu najčešći poznati genetski uzrok miokloničke distonije, one se detektuju u samo 30% do 40% bolesnika sa tipičnim fenotipom, što govori u prilog genetske heterogenosti ovog oboljenja (Valente *et al.*, 2005; Schule *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2003; Grunewald *et al.*, 2008; Tezenas du Montcel *et al.*, 2006). U nekoliko slučajeva miokloničke distonije opisano je postojanje mutacija u drugim genima. Tako, u jednoj porodici sa miokloničkom distonijom opisana je mutacija u genu za dopaminski receptor D2 (*DRD2*) (Klein *et al.*, 1999), ali je kasnije u istoj porodici pokazano postojanje mutacije i u *SGCE* genu (Klein *et al.*, 2002a). Slično, kod jednog bolesnika sa distonijom ranog početka i mioklonusom, pronađena je delecija 18bp u *TORIA* genu (Leung *et al.*, 2001), ali je nakon analize *SGCE* gena pokazano postojanje još jedne mutacije (Doheny *et al.*, 2002). Patološki značaj pomenutih varijanti u *DRD2* i *TORIA* za sada nije ustanovljen. U jednoj velikoj kanadskoj porodici sa pet generacija i fenotipom klasične miokloničke distonije analiza vezanosti pokazala je visok značaj lokusa 18p11, koji je zatim označen kao lokus *DYT15*. *DRD2* i *SGCE* geni su isključeni kao mogući uzročnici oboljenja kod ove porodice, ali ni sekvenciranje sedam pretpostavljenih gena u *DYT15* regionu nije pokazalo postojanje mutacija (Grimes *et al.*, 2002a; Han *et al.*, 2007).

frakcije iz mozga miševa obogaćene epsilon-sarkoglikanom, ukazujući time da bi epsilon-sarkoglikan mogao imati ulogu sinaptičkoj transmisiji.

Efekte *missense* mutacija na ekspresiju SGCE proteina prvi su proučavali Esapa i saradnici (2007). Pokazano je da se kod wt miševa epsilon-sarkoglikan nalazi na ćelijskoj membrani neurona i mišićnih ćelija, kao i u intraćelijskim inkluzijama i Goldžijevom aparatu kultiviranih hipokampalnih neurona. Sa druge strane, mutirani SGCE je zadržan u endoplazmatičnom retikulumu i ne može se detektovati na površini ćelije. Ovi mutirani proteini se ubikvitiniraju i brzo degraduju u proteazomima. Takođe je pokazano da, kada se zajedno sa mutiranim SGCE proteinom eksprimira i torzin A (protein čija je funkcija poremećena u DYT1), torzin A može da interaguje sa mutiranim SGCE proteinom da bi potpomogao njegovu degradaciju (Esapa *et al.*, 2007). Na osnovu ovih rezultata izneta je pretpostavka da je mioklonička distonija uzrokovana gubitkom funkcije epsilon-sarkoglikana na ćelijskoj membrani. Prema tome, mehanizam koji leži u osnovi ovog oboljenja je haploinsuficijencija (Kinugawa *et al.*, 2009).

Miš koji nema *Sgce* alel očevog porekla (paternalni *Sgce* knock-out miš), služi kao model za miokloničku distoniju. Eksperimenti na ovom modelu su pokazali da kod njega postoji poremećaj u metabolizmu monoamina, gde dolazi do značajnog povećanja nivoa dopamina (DA) i njegovih metabolita, 3,4-dihidroacetatne kiseline (DOPAC) i homovalinske kiseline (HVA) u strijatumu. Na osnovu toga bi DYT11 distonija mogla da se svrsta u kategoriju hiperdopaminergičkih distonija (Yokoi *et al.*, 2006). Iako snižen nivo DA može da dovede do distonije (DYT5a), pokazano je da i njegovo povećanje izaziva distoniju. Tako je upravo L-dopa-indukovana distonija glavni neželjeni efekat kod bolesnika koji su na dugotrajnom tretmanu sa L-dopom (Fahn, 2000). Ubrizgavanje glijalnog neurotrofičkog faktora (GDNF), koji izaziva povećanu proizvodnju DA, u strijatum pacova, isto tako dovodi do distonije (Beck *et al.*, 1996). Takođe, kod hrčka koji je model sistem za paroksizmalnu diskineziju, nivo DA i DOPAC je značajno viši za vreme stresom indukovanih distoničnih napada (Hamann and Richter, 2004). U skladu sa hiperdopaminergičkom teorijom su i rezultati 123I-IBZM SPECT imidžinga koji su pokazali smanjenu dostupnost dopaminskog D2 receptora u strijatumu DYT11 bolesnika, ukazujući na mogući povećani nivo endogenog dopamina (Beukers *et al.*, 2009).

Na istom model sistemu miša pokazano je postojanje abnormalnosti u strukturi jedarne ovojnice u Purkinjeovim ćelijama i u MSN neuronima (eng. *medium spiny neurons*) strijatuma (Yokoi *et al.*, 2012a; 2012b), sličnih onima opisanim u ćelijskom i mišjem modelu za DYT1 (Naismith *et al.*, 2004; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2004; Goodchild *et al.*, 2005). Zanimljivo je da kada je konstruisan uslovni *Sgce* knock-out miš kod koga je paternalni *Sgce* alel izbacivan samo u Purkinje ćelijama ili samo u strijatumu, uočeno je da kod tih miševa postoji deficit u motoričkom učenju, dok mioklonus i promene u jedarnoj ovojnici nisu uočeni. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da gubitak epsilon-sarkoglikana samo u Purkinjeovim ćelijama ili samo u strijatumu nije dovoljan da izazove abnormalnosti u jedarnoj ovojnici ili mioklonus (Yokoi *et al.*, 2012a; 2012b).

1.7. DYT8

1.7.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

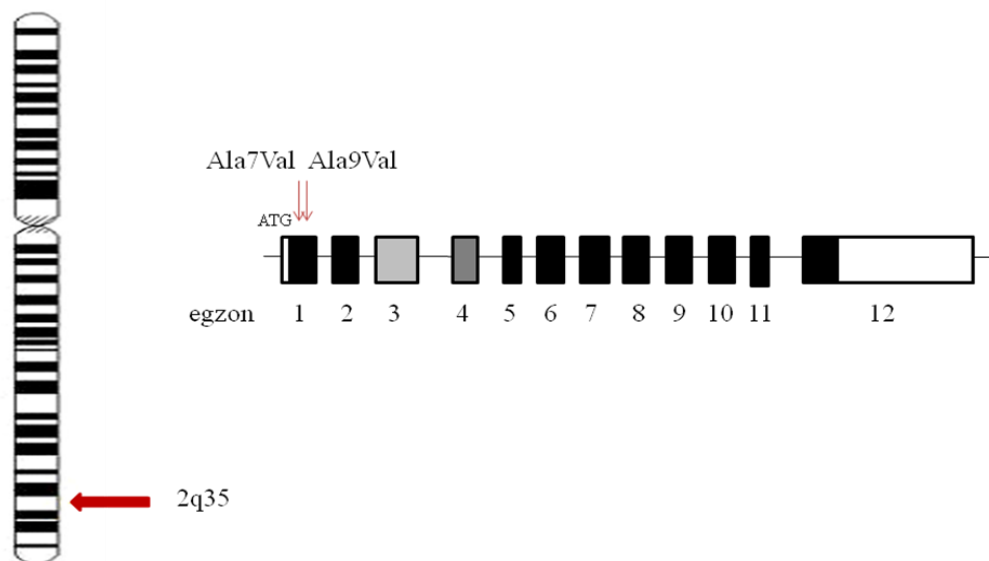
Distonija tip 8 (DYT8), poznata još i pod nazivom paroksizmalna nekinezigena diskinezija (PNKD), se karakteriše napadima distonije, horeje, atetoze i balizma u mirovanju. Ovi napadi mogu trajati od nekoliko sekundi do nekoliko časova i mogu se dešavati od nekoliko puta na dan do nekoliko puta godišnje. Pojava simptoma može biti izazvana alkoholom ili kofeinom ili u manjoj meri nikotinom, uzbuđenjem, zamorom, glađu ili emotivnim stresom (Fink *et al.*, 1997). Prvi simptomi obično započinju u ranom detinjstvu, mada su opisani i slučajevi kasnijeg početka (Bruno *et al.*, 2007).

DYT8 je izuzetno redak tip distonije tako da još uvek ne postoje podaci o njenoj prevalenci. Javlja se sa podjednakom učestalošći kod oba pola (Lee *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2007).

Nasleđivanje DYT8 je autozomno dominantno sa penetrabilnošću većom od 90% (Fink *et al.*, 1997, Jarman *et al.*, 1997b, Tomita *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2004).

1.7.2. Molekularno genetička osnova DYT8

Analizama vezanosti 1996. godine gen za DYT8 je mapiran na hromozomsku poziciju 2q31-36 (Fouad *et al.*, 1996). Radovi nezavisnih istraživačkih grupa potvrdili su vezanost u ovom regionu i suzile ga (Fink *et al.*, 1996; Jarman *et al.*, 1997b; Raskind *et al.*, 1998; Matsuo *et al.*, 1999), ali gen nije identifikovan još nekoliko narednih godina. Tek 2004. godine dve nezavisne grupe istraživača otkrivaju mutacije u *MR-1* genu (regulator miofibrilogeneze tip 1) kod dve, odnosno osam porodica sa paroksizmalnom nekinezigenom diskinezijom (Rainier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004) (Slika 9). Ubrzo nakon toga kod još nekoliko PNKD porodica različitog etničkog porekla pronađene su mutacije u *MR-1* genu (Chen *et al.*, 2005; Hempelmann *et al.*, 2006). Prema važećoj nomenklaturi *MR-1* gen se označava kao *PNKD* gen.



Slika 9. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *PNKD* gena.

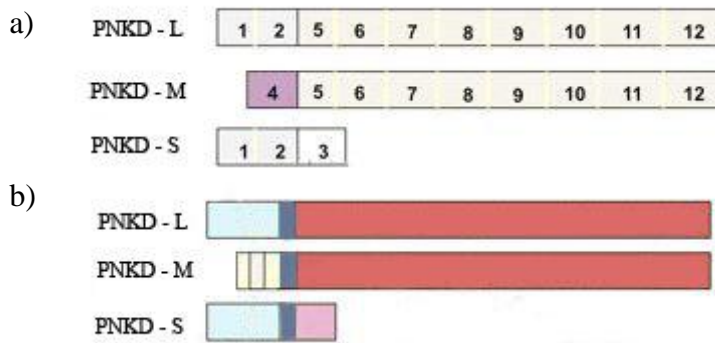
PNKD gen se sastoji od 12 egzona koji se alternativno iskrajaju prilikom obrade primarnog prepisa iRNK (Lee *et al.*, 2004). Interesantno je da su do skora bile opisane samo dve različite mutacije *PNKD* gena: *missense* mutacije p.Ala7Val i p.Ala9Val u egzonu 1. Bolesnici sa mutacijama su poticali iz različitih populacija (Rainier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Stefanova *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2005; Hempelmann *et al.*, 2006; Bruno

et al., 2007; Friedman *et al.*, 2009; Szczaluba *et al.*, 2009; Pons *et al.*, 2012). Analizom haplotipa je isključeno postojanje skorijeg zajedničkom pretka kod nekih od analiziranih porodica, što sugerira da su u pitanju nezavisne rekurentne mutacije (Chen *et al.*, 2005). Nedavno je kod jednog bolesnika pronađena i treća *PNKD* mutacija, lokalizovana takođe u egzonu 1 (p.Ala33Pro). Međutim, iako je *in silico* analiza predvidela da bi ova promena mogla uticati na konformaciju proteina, neophodne su funkcionalne studije koje bi potvrdile da se radi o patogenoj promeni sekvence (Ghezzi *et al.*, 2009).

Treba istaći da osim *PNKD* postoji barem još jedan gen odgovoran za PNK distoniju. Naime, analizama vezanosti u jednoj kanadskoj porodici evropskog porekla (negativnoj na mutacije u *PNKD* genu) identifikovan je novi lokus na hromozomskoj poziciji 2q31. Oboleli iz ove porodice razlikuju se od bolesnika sa *PNKD* mutacijom po tome što kod njih kofein i alkohol ne pokreću napade (Spacey *et al.*, 2006). Bruno i saradnici (2007) su opisali još šest *PNKD* porodica kod čijih članova nisu detektovane *PNKD* mutacije i kod kojih alkohol ne pokreće napade. Međutim, analize vezanosti u cilju identifikacije novih lokusa kod ovih porodica nisu obavljene.

1.7.3. Protein PNKD: struktura, uloga i molekularna patologija

PNKD se sastoji od 12 egzona koji se alternativno koriste i daju tri izoforme proteina. *PNKD-L* izoforma je najduža, sadrži 385 ak, nastaje spajanjem egzona 1, 2, 5-12 i eksprimirana je samo u mozgu. *PNKD-M* izoforma nastaje translacijom egzona 4-12, sadrži 361 ak i široko je eksprimirana sa najvišim nivoom ekspresije u skeletnim mišićima. *PNKD-S* izoforma je najkraća, dugačka je 142 ak, nastaje translacijom egzona 1-3 i takođe je široko eksprimirana. *PNKD-L* i *PNKD-S* izoforme u svojoj sekvenci dele prvih 79 ak na N-terminusu, koje uključuju i sve tri do sada opisane mutacije. Sa druge strane *PNKD-L* i *PNKD-M* izoforme imaju identične C-terminuse koji sadrže β -laktamazni domen sličan istome kod glioksilaze II (Rainier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004) (Slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz tri PNKD cDNK (a) i izoformi PNKD proteina (b); svetlo plavo - N-terminalni domen, sivo - transmembranski domen, crveno - β -laktamazni domen. Adaptirano prema Ghezzi *et al.*, 2009.

Izoforme PNKD proteina imaju specifične subćelijske lokalizacije, ali su eksperimenti na različitim ćelijskim sistemima dali različite rezultate. Lee i saradnici (2004) su radili na HEK293 ćelijama i pokazali da se S izoforma nalazi u citoplazmi i jedru, M izoforma ima specifičnu perinuklearnu lokalizaciju i kolokalizuje sa mitohondrijalnim markerom, dok se L izoforma, specifična za CNS, nalazi na ćelijskoj membrani. Sa druge strane, Ghezzi i saradnici (2009) su radeći na COS7 i HeLa ćelijama pokazali da je više od 90% M izoforme lokalizovano u Goldžijevom aparatu, a ostatak u endoplazmatičnom retikulumu i ćelijskoj membrani, dok su L i S izoforme mitohondrijalni proteini. Zatim su Shen i saradnici (2011) ponovili analize vezane za subćelijsku lokalizaciju L izoforme na COS7 ćelijama i na SH-SY5Y ćelijama koje potiču od neuroblastoma, s obzirom na specifičnu ekspresiju ove izoforme u CNS-u. Dobijeni rezultati su ponovo ukazivali da je L izoforma lokalizovana u ćelijskoj membrani i u kasnim endozomima. Nedavno je potvrđeno da se PNKD-L protein nalazi na membrani, ali nije transmembranski protein već je asociran sa membranom (Lee *et al.*, 2012).

Tačna ćelijska funkcija PNKD proteina još uvek nije poznata. Prisustvo β -laktamaznog domena na C-terminusu proteina sugeriše da PNKD protein pripada enzimskoj superfamiliji glioksalaza, prisutnoj u organizmima od prokariota do primata. Najbliži homolog PNKD proteinu kod čoveka je glioksalaza II koji se još naziva i hidroksiacilglutation hidrolaza (HAGH). HAGH katalizuje drugi enzimski korak u glutacion-zavisnom glioksilaza putu u kome se, uz pomoć redukovano glutaciona, metilglioksal (MG), toksični sporedni produkt glikolize, razlaže do D-mlečne kiseline

(Thornalley, 1993). MG se u značajnoj količini nalazi u kafi i alkoholnim pićima (Hayashi i Shibamoto, 1985; Nagao *et al.*, 1986). β -laktamazni domen PNKD proteina deli 44% identičnosti i 58% sličnosti sa HAGH proteinom, ali PNKD ne katalizuje istu reakciju kao HAGH (Shen *et al.*, 2011).

Pokazano je da wt PNKD-L protein *in vitro* podleže postranslacionom sečenju na N-terminusu i da mutacije sprečavaju ovo sečenje. Takođe je pokazano da je stabilnost PNKD-L proteina koji nosi bilo koju od 3 opisane mutacije smanjena, odnosno da se on brže degraduje. Ovo sugeriše da bi mutacije mogle delovati tako što remete obradu proteina *in vivo*. U prilog ovoj pretpostavci ide nalaz smanjenog nivoa kortikalnog Pnkd-L proteina kod transgenog miša sa mutiranim *Pnkd* genom. Kod Pnkd knockout i mutiranog Pnkd transgenog miša je nađen i značajno niži nivo glutationa u frontalnom korteksu u odnosu na wt miševu pa se pretpostavlja da bi PNKD-L mogao imati ulogu u regeneraciji glutationa u CNS-u (Shen *et al.*, 2011). Glutacion ima ključni značaj u održavanju ćelijskog redoks statusa i zaštiti od oksidativnog stresa (Schulz *et al.*, 2000).

Najskorija istraživanja rađena na mutiranim Pnkd transgenim i Pnkd knockout miševima su ukazala na značaj dopaminske disregulacije u patogenezi bolesti (Lee *et al.*, 2012). Pokazano je da transgeni miševi sa mutiranim *Pnkd* genom imaju snižen nivo ekstraćelijskog dopamina u strijatumu *in vivo*, ali kada se izlože stresu, alkoholu ili kofeinu, kod njih dolazi do većeg oslobađanja dopamina u odnosu na kontrole. Osim niskog nivoa oslobađanja dopamina deficitu u nigrostrijatalnoj neurotransmisiji kod ovih miševa doprinosi i pojačano preuzimanje dopamina. Povećanje preuzimanja dopamina je u skladu sa uočenom povećanom ekspresijom DAT transportera kod ovih miševa u odnosu na wt miševu. Iako su sadržaj dopamina u dopaminergičkim završecima strijatuma i njegova proizvodnja normalni, uočena je povećana ekspresija dopaminskih receptora kod ovih miševa, senzitivnost dopaminskih receptora zbog njegovog niskog bazalnog ekstraćelijskog nivoa je povećana i povećano je oslobađanje strijatalnog dopamina u stresu. Pretpostavlja se da bi pod ovakvim uslovim ekscitacioni dopaminergički signali mogli dovesti do abnormalne neuronalne aktivnosti u bazalnim ganglijama i diskinetičkog fenotipa (Lee *et al.*, 2012).

1.8. DYT18

1.8.1. Fenotip, prevalencija, nasleđivanje

Distonija tip 18 (DYT18), poznata je još i pod nazivom paroksizmalna naporom izazvana distonija (eng. *paroxysmal exercise-induced dystonia*, PED). Kao što naziv ukazuje, DYT18 se karakteriše napadima distoničkih, horeatičkih i balističkih pokreta koji primarno pogađaju gornje i donje ekstremitete (Margari *et al.*, 2000; Münchau *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2008). Ovi napadi su izazvani naporom, mogu trajati od nekoliko minuta do jednog sata; u nekim slučajevima napadi mogu biti indukovani vibriranjem mišića, pasivnim pokretima (Plant *et al.*, 1984), električnom stimulacijom nerava i izlaganjem hladnoći (Bhatia *et al.*, 1997). Učestalost napada varira od jednog napada dnevno do jednog mesečno. Pored osnovnih simptoma, kod bolesnika se mogu javiti i epileptički napadi, migrena, smanjena kognitivna funkcija, zaostajanje u razvoju i impulsivno/agresivno ponašanje. Takođe, opisana je jedna porodica čiji su oboleli članovi pored ostalih simptoma imali i hemolitičku anemiju (Weber *et al.*, 2008). Prvi simptomi obično započinju u detinjstvu, premda godine početka bolesti mogu da variraju između prve i tridesete godine (Unterberger and Trinka 2008).

DYT18 je izuzetno redak tip distonije tako da još uvek ne postoje podaci o njenoj prevalenciji. Pored familijarnih, opisani su i sporadični slučajevi DYT18. Uočeno je da se kod familijarnih slučajeva bolest nešto češće javlja kod ženskog pola (Jankovic and Demirkiran, 2002).

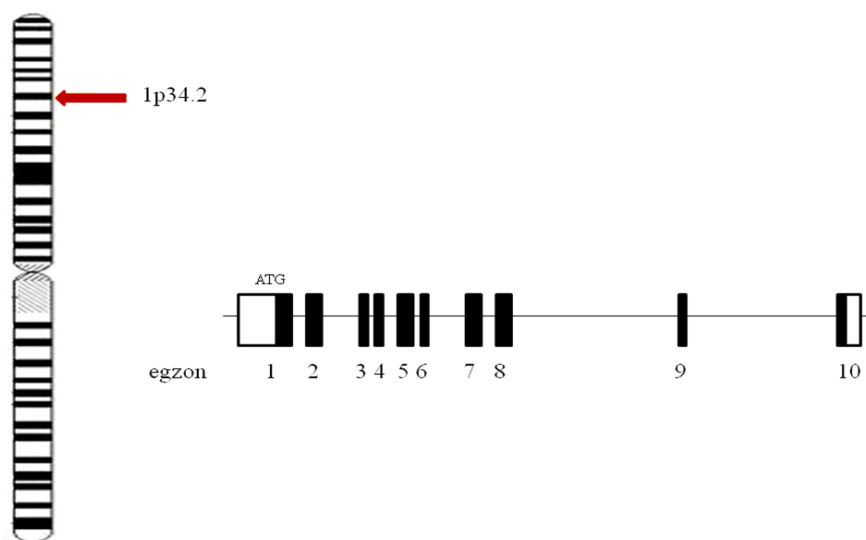
Nasleđivanje DYT18 je autozomno dominantno sa nešto smanjenom penetrabilnošću (Weber *et al.*, 2008).

1.8.2. Molekularno genetička osnova DYT18

Genetska osnova DYT18 distonije je relativno skoro otkrivena. Weber i saradnici (2008) su kod porodice sa istorijom paroksizmalne naporom izazvane distonije u tri

generacije na osnovu kliničkih karakteristika obolelih izabrali gen za glukozni transporter tip 1 (*GLUT1*, odnosno, po novijoj nomenklaturi *SLC2A1*) kao kandidat-gen za analizu i identifikovali malu deleciju u toj i još dve missense mutacije u dve nezavisne porodice. Istovremeno još jedna grupa istraživača je analizom vezanosti u porodici sa PED-om i epilepsijom definisala lokus na p kraku hromozoma 1 i sekvenciranjem *SLC2A1* gena našla mutacije u ovoj i još tri PED porodice (Suls *et al.*, 2008). Postojanje mutacija u *SLC2A1* genu kod bolesnika sa PED-om je ubrzo potvrđeno i u drugim familijarnim i sporadičnim slučajevima (Zorzi *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2009).

SLC2A1 mapira na poziciji 1p34.2 i sastoji se od 10 egzona (Slika 11). Ovaj gen je kloniran i sekvenciran još 1985. godine od strane Mueckler-a i saradnika (1985) i to kao prvi identifikovani član trinaestočlane porodice glukoznih transportera. Prve mutacije u *SLC2A1* su identifikovane kod bolesnika sa sindromom GLUT1 deficijencije (GLUT1-DS) (Seidner *et al.*, 1998). Ovaj sindrom se karakteriše infantilnim epileptičkim napadima rezistentnim na antikonvulzante, usporenim mentalnim i motoričkim razvojem, usporenim rastom glave koji rezultuje stečenom mikrocefalijom kod većine bolesnika, spasticitetom, ataksijom i distonijom i sniženim odnosom nivoa glukoze u cerebrospinoj tečnosti i serumu (DeVivo *et al.*, 2002). Otkriće povezanosti PED i sa *SLC2A1* mutacijama, pored postojeće veze sa GLUT1-DS, predstavljalo je samo početak širenja spektra fenotipova koji su uzrokovani *SLC2A1* mutacijama.



Slika 11. Šematski prikaz hromozomske pozicije i egzon-intron strukture *SLC2A1* gena.

Do danas je opisano više od 150 mutacija u *SLC2A1* genu (www.hgmd.org; The Human Gene Mutation Database). Detektovane su tačkaste mutacije (missense, nonsense i mutacije u mestu za iskrajanje introna), male delecije i insercije, kao i velike insercije i delecije čitavog gena (Seidner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005; Pascual *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2008). Kod dve porodice sa GLUT1-DS opisano je prisustvo homozigotnih mutacija u *SLC2A1* genu (Wang *et al.*, 2000; 2001; Rotstein *et al.*, 2010). U jednoj porodici roditelji su bili srodnici i asimptomatski nosioci mutacije, a u drugoj je majka bila asimptomatski nosilac mutacije, dok je druga mutacija nastala *de novo*. Analize na mišjim modelima su pokazale da su homozigotne mutacije u *SLC2A1* koje uzrokuju potpuno odsustvo GLUT1 inkompatibilne sa preživljavanjem embriona zbog ključne uloge GLUT1 posredovanog transporta glukoze u razviću (Wang *et al.*, 2006). Međutim, kod ovih porodica je pokazano da su mutacije kod asimptomatskih nosilaca imale smanjenu patogenost, odnosno funkcija proteina je zadržana na preko 80% (Rotstein *et al.*, 2010).

Smatra se da je osnovni uzrok variranja težine fenotipa (u spektru simptoma od najtežih u okviru GLUT1-DS do najbenignijih u okviru čiste DYT18 distonije) efekat date mutacije na protein. Tako bi mutacije koje dovode do potpunog gubitka proteina ili do gubitka njegove funkcije rezultovle teškim fenotipom, a one koje bi omogućavale parcijalno funkcionisanje proteina dovodile do blaže kliničke slike. Međutim, s obzirom na opisanu inter- i intrafamilijarnu heterogenosti fenotipa kod nosilaca iste mutacije (Weber *et al.*, 2008; Klepper and Leiendecker, 2007), ovo svakako nije jedini faktor koji određuje fenotip (Schneider *et al.*, 2009).

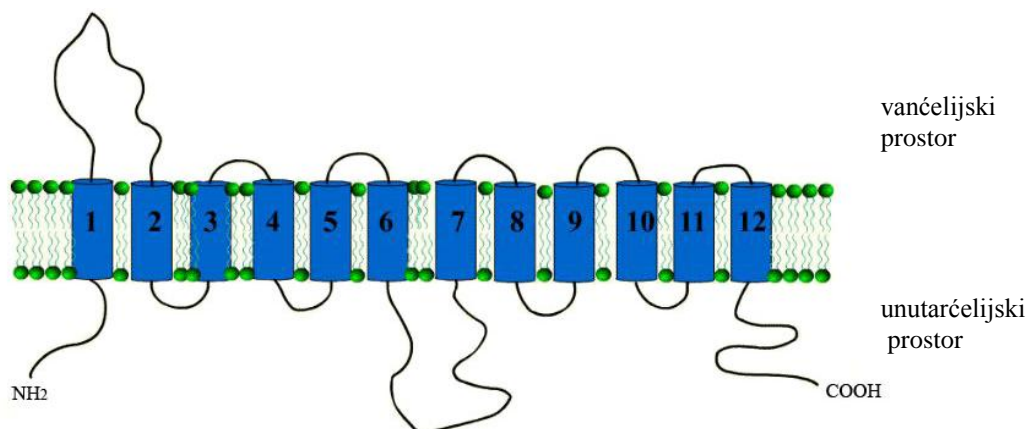
1.8.3. Protein GLUT1: struktura, uloga i molekularna patologija

Aminokiselinska sekvenca prvog glukoznog transportera (GLUT-1) određena je 1985. godine od strane Muecklera i saradnika (1985) na osnovu cDNK molekula dobijenog iz humanih HepG2 hepatoma ćelija. Ovaj protein pripada porodici transporter proteina koji učestvuju u olakšanoj difuziji heksoza, koju čini 14 GLUT proteina koji su kodirani *SLC2A* genima označenim brojevima od 1 do 14 (GLUT-13 označava još i kao mioinozitolni

transporter HMIT1 (Marger i Saier, 1993; Saier *et al.*, 1999; Joost and Thorens, 2001; Thorens and Mueckler, 2010).

GLUT-1 je široko eksprimiran i vrši dvosmeran transport glukoze kroz membrane mnogih normalnih tkiva i tumora (Uldry and Thorens, 2004). Posebno visokok nivo ekspresije GLUT-1 postoji na membrani eritrocita i na vaskularnim endotelijalnim ćelijama krvno-moždane barijere gde predstavlja glavni transporter glukoze u mozak (Vannucci *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2007). Pokazano je da ovaj transporter osim glukoze prepoznaje i galaktozu, glikopeptide, vodu i dihidroaskorbinsku kiselinu (oksidovana forma vitamina C) (Klepper *et al.*, 1998).

GLUT1 sadrži 492 aa i postoji u dve molekularne forme (55kDa i 45 kDa) koje se razlikuju samo u stepenu glikozilacije. Forma od 55 kDa se predominantno nalazi na eritrocitima i endotelijalnim ćelijama malih krvnih sudova mozga. Forma od 45 kDa se nalazi na većini drugih ćelija, uključujući i astrocite. Pretpostavlja se da je forma od 45 kDa odgovorna za bazalni unos glukoze u ova tkiva. Aminokiselinska sekvenca GLUT1 proteina je visoko konzervirana, pa tako postoji 97%-98% identičnosti između sekvenci čoveka, pacova, zeca, miša i svinje (Baldwin *et al.*, 1993). GLUT1 protein je integralni membranski protein sa unutarćelijskim N- i C-terminalnim krajem i 12 transmembranskih domena. Transmembranski domeni se nalaze u formi α -heliksa (H1-H12) i pretpostavlja se da su organizovani u grupe od po 6 heliksa povezane unutarćelijskom petljom između heliksa 6 i 7. Pretpostavljena trodimenzionalna struktura se karakteriše centralno postavljenom porom koja povezuje unutar- i van-ćelijsku sredinu i koju grade heliksi 2, 4, 5, 7, 8 i 10 (Salas-Burgos *et al.*, 2004). Upravo su ovi domeni koji učestvuju u formiranju pore, zajedno sa unutarćelijskom petljom od ključnog značaja za transportnu funkciju proteina (Slika 12).



Slika 12. Struktura GLUT1 proteina, adaptirano sa <http://www.chemgapedia.de>.

Funkcionalne analize efekta PED mutacija vršene su na oocitama *Xenopus*-a i delimično na eritrocitima bolesnika (Weber *et al.*, 2008; Suls *et al.*, 2008). Tada je pokazano da sve analizirane mutacije dovode do značajnog smanjenja unosa glukoze od strane GLUT1, pri čemu ne dolazi do remećenja stabilnosti proteina ili njegove površinske ekspresije.

Smatra se da je osnovi mehanizma kojim mutacije u *SLC2A1* dovode do diskinezija GLUT1 haploinsuficijencija i energetske deficit u bazalnim ganglijama nakon izlaganja naporu (Weber and Lerche, 2009). U prilog ovoj teoriji idu činjenice da su diskinetički napadi reaktivni na akutnu intravensku infuziju glukoze i trajnu ketogenu dijetu, kojom se glukoza kao primarni izvor energije u mozgu zamenjuje sa ketonskim telima, kao i da je upotrebom FDG-PET (eng. [^{18}F] fluorodeoxy-glucose positron emission tomography) metode kod bolesnika uočen poremećen metabolizam glukoze u kortikostrijatalnim putevima (Weber *et al.*, 2008; Suls *et al.*, 2008). Sa druge strane, eksperimenti vršeni na GLUT1-DS mišijem modelu (primenom *antisense* GLUT-1) pokazuju da se nivo dopamina i serotonin, kao i produkata njihovog metabolizma, u korteksu, talamusu i striatumu ne razlikuje u odnosu na kontrolne miševе (Marin Valencia *et al.*, 2012).

Pored direktne veze sa GLUT1-DS i PED, GLUT1 transporter ima značajnu ulogu i na polju biologije kancera. Naime pokazano je da su preuzimanje glukoze i glikolitički metabolizam povišeni u ćelijama kancera u odnosu na normalne ćelije (Young and Anderson, 2008; Ganapathy *et al.*, 2009). U skladu sa ovim pokazano je i da je nivo GLUT1 proteina povišen u skoro svim humanim kancerima (Macheda *et al.*, 2005). Neke

studije su ukazale i da nivo GLUT1 ekspresije koreliše sa specifičnim karakteristikama tumora, odnosno da je GLUT1 ekspresija asocirana sa malignim potencijalom, invazivnošću i lošim ishodom kod kolorektalnog kancera, kancera pluća, želuca i ovarijuma (Younes *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 2001; Haber *et al.*, 1998; Sakashita *et al.*, 2001; Kalir *et al.*, 2002).

2. CILJEVI RADA

1. Utvrđivanje učestalosti i spektra mutacija u genima DYT1, DYT5a, DYT6, DYT8, DYT11 i DYT18 kod bolesnika sa primarnom distonijom u populaciji Srbije.
2. Ispitivanje potencijalnih korelacija između genotipa i fenotipa kod bolesnika sa utvrđenim mutacijama.
3. Utvrđivanje da li je na osnovu dobijenih rezultata moguće formirati šemu za genetsko testiranje distonija u našoj populaciji.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. PACIJENTI I KONTROLE

U ovo ispitivanje uključeno je 346 bolesnika iz hospitalnog registra Klinike za neurologiju KCS koji su registrovani u kompjuterskoj bazi podataka INFOMEDIS pod dijagnozom idiopatske distonije, a koji su hospitalno i ambulantno lečeni u periodu od januara 2000. do decembra 2010. godine i 38 članova porodica. Pet bolesnika i sedam članova porodice uključenih u ovo ispitivanje su upućeni od strane Klinike za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu, dok je jedan bolesnik upućen od strane Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta u Beogradu.

Kod pacijenata kod kojih su detektovane mutacije težina kliničke slike je vrednovana pomoću Burke-Fahn-Marsden skale za distoniju (BFM) (Fahn, 1988). Vrednovanje je vršeno od strane specijalista neurologije. Vrednost od 30 godina uzima se kao granična vrednost ranog početka distonije prema preporukama Evropske federacije neuroloških društava (EFNS).

Kontrolna grupa formirana je regrutovanjem 106 nesrodnih osoba (54 žene i 52 muškarca), starijih od 50 godina, bez neuroloških smetnji.

Svim bolesnicima, uključenim članovima porodice i kontrolama, nakon potpisivanja informisanog pristanka, uzet je uzorak od 10 ml periferne krvi za genetičku analizu. Kao antikoagulans korišćen je EDTA (1,8 mg/ 1 ml krvi). Uzorci su čuvani na -20°C. Iz uzorka krvi je izolovana genomska DNK koja je dalje korišćena za analize *TORIA*, *THAP1*, *GCHI*, *SGCE*, *PNKD* i *SLC2A1* gena odgovarajućim metodama. Ovo ispitivanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu; odluka broj 440/VI-2.

3.2. IZOLOVANJE GENOMSKE DNK IZ LIMFOCITA PERIFERNE KRVI

Genomska DNK je izolovana upotrebom QIAamp DNA mini kita (QIAGEN, Nemačka) po uputstvu proizvođača. QIAamp DNA mini kit je namenjen za brzu izolaciju ukupne DNK (genomska, viralna, mitohondrijalna) iz pune krvi, plazme, seruma, taloga leukocita, kosne srži, drugih telesnih tečnosti, kultivisanih ćelija, tkiva i forenzičkih uzoraka. Nakon izolacije, dobijena DNK je dovoljno kvalitetna da se može koristiti za PCR i Southern blot metodu. Ako se kao početni materijal koristi puna krv, očekivani prinos iz 200 µl krvi je 6 µg ukupne DNK.

Izolacija DNK iz pune krvi podrazumeva da se limfociti periferne krvi prvo liziraju puferom za lizu u prisustvu proteinaze K. Lizat se zatim centrifugiranjem propušta kroz *Mini spin* kolonice pri čemu se DNK vezuje za silikonsku membranu kolonice, a ostale komponente ćelija prolaze kroz nju. Zatim se odgovarajućim puferima vrši dodatno ispiranje DNK od proteina i drugih agenasa koji bi potencijalno mogli da inhibiraju PCR reakciju. Prečišćena DNK se na kraju eluira sa membrane u odgovarajućem puferu ili redestilovanoj vodi.

3.2.1. Procedura izolacije DNK iz limfocita periferne krvi upotrebom QIAamp DNA mini kita

Svi koraci centrifugiranja se izvode na sobnoj temperaturi.

1. Na dno mikrotube od 1,5 ml sipati 20 µl QIAGEN proteinaze ili proteinaze K.
2. Dodati 200 µl periferne krvi, zatim 200 µl AL pufera i pulsno vorteksovati 15 s.
3. Inkubirati uzorak 10 minuta na 56°C.
4. Kratko centrifugirati mikrotubu da se ukloni tečnost sa unutrašnjosti poklopca mikrotube.
5. Dodati 200 µl etanola (96 – 100%) u uzorak i pulsno vorteksovati 15 s, zatim ponovo kratko centrifugirati mikrotubu.
6. Preneti uzorak u QIAamp mini spin kolonicu i centrifugirati kolonicu 1 minut na 8000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, *Eppendorf*, Nemačka), prebaciti kolonicu u čistu kolekcionu tubu od 2 ml.

7. Dodati 500 μ l AW1 pufera u kolonicu, centrifugirati 1 minut na 8000 rpm i zatim prebaciti kolonicu u čistu kolekcionu tubu od 2 ml.
8. Dodati 500 μ l AW2 pufera u kolonicu, centrifugirati 3 minuta na 14000 rpm i zatim prebaciti kolonicu u čistu mikrotubu od 1,5 ml.
9. Dodati 200 μ l AE pufera ili dejonizovane vode u kolonicu, inkubirati 1 minut na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirati 1 minut na 8000 rpm.

3.3. ODREĐIVANJE KVANTITETA I KVALITETA GENOMSKE DNK

Kvalitet i količina izolovane DNK su određivani spektrofotometrijom. Spektrofotometrija služi za kvantitativno određivanje malih količina rastvorenih supstanci i zasniva se na merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Količina apsorbovane svetlosti odgovara koncentraciji ispitivane supstance. Nukleinske kiseline apsorbuju na 260 nm i koncentracija DNK se računa po formuli:

$$C = (A_{260} \times R \times 50 \times OP) / 1000 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

gde je : A_{260} - apsorbancija izmerena na talasnoj dužini od 260 nm,

R - razblaženje,

OP - optički put (dužina puta koju svetlost pređe pri merenju, tj. debljina kivete) (1 cm),

50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) - molarni ekstincioni koeficijent dvolančane DNK na 260 nm i na optičkom putu od 10 mm (apsorbancija 1 ima rastvor čiste dvolančane DNK od 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na 260 nm ako je optički put svetlosti 10 mm).

Čistoća uzorka DNK se na spektrofotometru određuje pomoću apsorbance izmerene na talasnim dužinama od 230, 280 i 340 nm. Na 230 nm apsorbuju fenolatni anjon, tiocijanat i peptidi. Na 280 nm apsorbuju fenol i proteini, dok apsorbancija na 330 nm i više ukazuje na prisustvo čestica u rastvoru koje rasejavaju svetlost u vidljivom spektru (npr. soli). DNK dobrog kvaliteta ima odnos apsorbanci na 260 i 280 nm između 1,8 i 2,0 ($A_{260}/A_{280}=1,8-2,0$), mada je dovoljno da ovaj odnos bude između 1,7 i 2,0. Odnos apsorbanci na 230 i 260 nm treba da bude manji od 0,5 ($A_{230}/A_{260} < 0,5$), a A_{340} treba da bude što bliža nuli.

3.3.1. Procedura određivanja koncentracije DNK na spektrofotometru

Merenja su vršena na spektrofotometru BioPhotometer (*Eppendorf*, Nemačka) u plastičnim kivetama Uvette (*Eppendorf*, Nemačka), sa optičkim putem od 10 mm.

1. Pripremiti 50 µl razblaženja DNK uzorka u dejonizovanoj vodi u odnosu 1:10.
2. Podesiti spektrofotometar na merenje koncentracije DNK uzorka.
3. Setovati apsorbancu rastvarača, odnosno dejonizovane vode, kao „blank“. Ovim će se od ukupne izmerene apsorbance u uzorku oduzeti apsorbancu koja potiče od rastvarača.
4. Uneti vrednost razblaženja u spektrofotometar
5. Izmeriti apsorbancu uzorka
6. Na spektrofotometru se prikazuje koncentraciju uzorka, odnosi apsorbanci A_{260}/A_{280} , A_{230}/A_{260} i vrednost apsorbance A_{340} .

3.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERIZACIJE – PCR

PCR (reakcija lančane polimerizacije, eng. Polymerase Chain Reaction) (Mullis and Faloona 1987; Saiki et al. 1988) je selektivna *in vitro* amplifikacija određenog segmenta DNK molekula. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom (*Taq* polimeraza). Specifičnost PCR-a se ogleda u korišćenju prajmera, oligonukleotidnih sekvenci dužine 14-40 nukleotida, koji hibridizuju sa komplementarnim sekvencama na DNK molekulu i na taj način ograničavaju segment DNK koji se amplifikuje. Dužina amplifikovanog fragmenta je određena rastojanjem sekvenci koje prepoznaju prajmeri. PCR se odvija u 25-40 ponovljenih ciklusa sinteze DNK molekula i na taj način se dobija 10^6 do 10^9 kopija željenog fragmenta. Svaki ciklus se sastoji iz tri koraka: termalna denaturacija, hibridizacija prajmera i ekstenzija-sinteza DNK. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se kompletirala sinteza parcijalno sintetisanih produkata.

PCR reakcije su izvođene u GeneAmp[®] PCR System 9700 ili Veriti (*AppliedBiosystems*, USA) PCR aparatu u 0,2 ml tankozidnim (eng. *thin wall*)

mikrotubama u volumenu od 15 μ l. Sastav reakcionih smeša i finalne koncentracije pojedinih komponenti dati su u Tabeli 2.

Tabela 2. Komponente PCR reakcije i njihova finalna koncentracija u reakcionoj smeši.

Finalna koncentracija	Protokol A	Protokol B	Protokol C	Protokol C1
KOMPONENTE				
10xPCR buffer*	1x Pufer A	1x Pufer B	1x Pufer C	1x Pufer C
25mM MgCl ₂ (<i>Fermentas</i> , Nemačka)	1,5 mM	-	-	-
10 mM dNTPs (<i>Fermentas</i> , Nemačka)	0,2 mM svaki nukleotid	0,2 mM svaki nukleotid	0,2 mM svaki nukleotid	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l
BSA (<i>Sigma</i> , Nemačka)	0,4 μ g/ μ l	-	-	
DMSO (<i>Serva</i> , Nemačka)	-	-	-	3% (v/v)
Glicerol (<i>Serva</i> , Nemačka)	-	7% (v/v)	-	-
Taq polimeraza	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
DNK	30 ng	30 ng	30 ng	30 ng
Dejonizovana voda	po potrebi	po potrebi	po potrebi	po potrebi
Ukupna zapremina	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Finalna koncentracija	Protokol C2	Protokol C3	Protokol D
KOMPONENTE			
10xPCR buffer*	1x Pufer C	1x Pufer C	1x Pufer D
25mM MgCl ₂ (<i>Fermentas</i> , Nemačka)	-	-	-
10 mM dNTPs (<i>Fermentas</i> , Nemačka)	0,2 mM svaki nukleotid	0,2 mM svaki nukleotid	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l	0,4 pmol/ μ l
BSA (<i>Sigma</i> , Nemačka)	0,4 μ g/ μ l	0,4 μ g/ μ l	0,4 μ g/ μ l
DMSO (<i>Serva</i> , Nemačka)	3% (v/v)	-	3% (v/v)
Glicerol (<i>Serva</i> , Nemačka)	-	-	-
Taq polimeraza	0,5 U	0,5 U	0,5 U
DNK	30 ng	30 ng	30 ng
Dejonizovana voda	po potrebi	po potrebi	po potrebi
Ukupna zapremina	15 μ l	15 μ l	15 μ l

* Pufer A = 10x pufer sa KCl (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 na 25°C), 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40; *Fermentas*, Nemačka)

Pufer B = 10x Long PCR pufer (tačan sastav pufera nije dostupan, 15 mM MgCl₂; *Fermentas*, Nemačka)

Pufer C = 10x Dream Taq pufer (tačan sastav pufera nije dostupan, KCl, (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂; *Fermentas*, Nemačka)

Pufer D = 10x pufer KlenTaq LA (400 mM Tricine-KOH (pH 9,2 na 25°C), 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 750 μ g/ml BSA; *Sigma*, USA)

Po Protokolu A pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 5 *TORIA* gena (DYT1). Po Protokolu B pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 1 *GCHI* gena (DYT5a). Po Protokolu C pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 2, 3, 5 i 6 *GCHI* gena (DYT5a), egzona 1 i 2 *PNKD* gena (DYT8), egzona 1-6, 8 - 12, promotora i 3'UTR-a *SGCE* gena (DYT11) i egzona 2-10 *SLC2A1* gena (DYT18). Po Protokolu C1 pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 4 *GCHI* gena (DYT5a) i egzona 1 *SLC2A1* gena (DYT18). Po Protokolu C2 pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 1 *THAP1* gena (DYT6) i egzona 7 *SGCE* gena (DYT11). Po Protokolu C3 pripremana je reakciona smeša za amplifikaciju egzona 2 *THAP1* gena (DYT6), dok je za amplifikaciju egzona 3 *THAP1* gena (DYT6) korišćen Protokol D.

Sekvence prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju kodirajućih i nekodirajućih regiona gena od interesa, date su u Tabelama 3, 4, 5, 6, 7 i 8. Sa F je označen uzvodni, a sa R nizvodni prajmer. Prajmeri su kreirani uz pomoć Primer3 softvera (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju segmenta *TORIA* gena koji sadrži GAG duplikaciju.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
egzon 5	F	ATGTGTATCCGAGTGGAAAT	108 bp
	R	GAAACTCTCTCCTCTTTGG	

Tabela 4. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju 5'UTR-a i kodirajućih regiona *THAP1* gena.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
5' UTR i egzon1	F	AAACACCTGGCCTCAGCCAATA	627 bp
	R	TGTTCCAGGAGCGCGAGAAA	
egzon2	F	ACAACAGAGCAAGACGGCATC	519 bp
	R	AAGGTTCCAGGCACATTTATTC	
egzon3	F	TATTTTATAGCAGAGACAGGGTT	648 bp
	R	TTTAAATGAAACTCCTTTACAGG	

Tabela 5. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju kodirajućih regiona *GCHI* gena.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
egzon 1	F	GGAGTTTAGCCGCAGACCT	505 bp
	R	GAGGCAACTCCGGAAACTT	
egzon 2	F	TTTTAGGGAGGATTAACGTTTCG	248 bp
	R	TTGCTGGGAAACAACAAAGA	
egzon 3	F	TTGTCGTGATAAATTACATAAAAAGTGT	230 bp
	R	CAGCAGATGAGGGCAGGT	
egzon 4	F	AGCCCACTTGCTTCAACAAT	231 bp
	R	CCTGGGTGACAGAGCAAGAC	
egzon 5	F	GCTTCCAGCTGTTTGTGTCA	245 bp
	R	TCAGTTGTGTGGCATCACCT	
egzon 6	F	CCAAACCAGCAGCTGTCTAC	221 bp
	R	CAGTACGATCGGCAACCAAC	

Tabela 6. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju promotora, kodirajućih regiona i 3'UTR regiona *SGCE* gena.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
promotor	F	GTGCCATGCTTTACAAACAGATAAG	376 bp
	R	CAGCTCATGTACCTCTGCAGTTC	
egzon 1	F	CTGATGCTGAACTGGCCAAG	305 bp
	R	AGAGAGGCTGGTGCCCAAAG	
egzon 2	F	GCATGTTGCTTCAGTTTTCC	271 bp
	R	CCTCACAAAGAACATACCAGGTT	
egzon 3	F	AGACAGAATGTTTTGATTGAAAC	355 bp
	R	ACCACCATCAGGTAACCTTAG	
egzon 4	F	TTCTCATTGCCAGAGAAGG	339 bp
	R	TCAGTTATATTAGGTATGTGGC	
egzon 5	F	CTTCATTAAGATATGCATGC	306 bp
	R	ATAAGTTTGATAAGATCACCG	
egzon 6	F	TAAATCCTGCTTTAAGGTGG	336 bp
	R	TTATTCCTAAAAGCAGTTCAG	
egzon 7	F	AAGAATGCTTTAGTGTATCCAG	349 bp
	R	TTGTTATCTTAGCAGGATCTC	
egzon 8	F	GACAATGTCAGCATTTCAC	309 bp
	R	GTTTTAGTTTCTACCCCTCCT	
egzon 9	F	CAAATTGATGACCCATCAGGC	296 bp
	R	CATGCATATTAATAATTATGGCTC	
egzon 10	F	TGTAGCCTAGTGGCCACATTT	445 bp
	R	AGCCAACCTCATGACTTCTAG	
egzon 11	F	CTGGGGTCATAGTTTACCCG	250 bp
	R	ATTTGGTGAAGATAAAGCTTC	

egzon 12	F	GATGGAAACTTTCTCCTTGCC	231 bp
	R	CAACATGCATAACATATGCCAG	
3'UTR	F	TGCTCAAAATCTAAAAGTATCCAT	372 bp
	R	ATTCACCAGTCATTAGGCTTCA	

Tabela 7. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju segmenta *PNKD* gena koji sadrže do sada opisane mutacije.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
egzon1	F	GCCCCTTACGCAAACACTACAA	192 bp
	R	GGCTGGACGTGAAAGAAAAG	
egzon2	F	CCGCTTGCTTTCTTCTCATC	286 bp
	R	TAAGTCCTGCCCTCCCCTAC	

Tabela 8. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju kodirajućih regiona *SLC2A1* gena.

		Sekvenca prajmera	Dužina produkta
egzon 1	F	AGGCAAGAGGTAGCAACAGC	284 bp
	R	AGGAGTCTGCGCCTTTGTT	
egzon 2	F	TGCCAAGAGTCAGGCAAGAT	241 bp
	R	GGTGTCCATAAGCCAACGAT	
egzon 3	F	CTCACCCAGGCTGCATCT	296 bp
	R	CCCTGGAACAGGCAGATAAG	
egzon 4	F	CACTGGCCTGACCTGTGAC	363 bp
	R	AGAGAAACTCTGCCCTGCTG	
egzon 5	F	AAGGGGGTCAGGGCAGAG	282 bp
	R	AAGGTGAGGGTGGCTCAGA	
egzon 6	F	ACTCTGAGCCACCCTCACC	328 bp
	R	GGCAGAGGCGTATCTGTTGT	
egzon 7	F	CCCACATCCACTGCTACAGA	204 bp
	R	GGGGCCAGTAAGCAAAGACT	
egzon 8	F	GTGGGTTCAGAAGGGCACTA	237 bp
	R	GGGCTGAGACAGGCATTTT	
egzon 9	F	CTTCCTGCCTTCTCGCATAG	333 bp
	R	AGAGACAGTGGGGGTTCTCA	
egzon 10	F	CCAAGTGTGTCTGTGTGTCTTTC	300 bp
	R	TCATCCAGCTGCCTGTGC	

PCR reakcije se izvode po programima koji su dati u Tabeli 9, 10 i 11.

Tabela 9. Program za amplifikaciju fragmenata *TORIA*, *THAP1* i *GCHI* gena.

	<i>TORIA</i> egzon 5; <i>THAP1</i> egzoni 1 i 2; <i>GCHI</i> egzon 1 i 4	
Inicijalna denaturacija	95°C 5 min	
Denaturacija	95°C 30 s	35 ciklusa
Hibridizacija	56-61°C * 30 s	
Elongacija	72°C 45 s	
Finalna elongacija	72°C 10 min	

* Temperatura hibridizacije iznosi 56 °C za egzon 1 *GCHI* gena, 58 °C za egzon 2 *THAP1* gena, 60 °C za egzon 5 *TORIA* i egzon 1 *THAP1* gena i 61 °C za egzon 4 *GCHI* gena.

Tabela 10. Program za amplifikaciju egzona 3 *THAP1* gena.

	<i>THAP1</i> egzon 3	
Inicijalna denaturacija	94°C 1 min	
Denaturacija	94°C 30 s	5 ciklusa
Hibridizacija	61°C 30 s	
Elongacija	68°C 40 s	
Denaturacija	94°C 30 s	25 ciklusa
Hibridizacija	58°C 30 s	
Elongacija	68°C 40 s	
Finalna elongacija	68°C 3 min	

Tabela 11. *Touchdown* PCR programi za amplifikaciju fragmenata *GCHI*, *THAP1*, *PNKD*, *SGCE* i *SLC2A1* gena.

	<i>GCHI</i> egzoni 2, 3, 5; <i>SGCE</i> egzoni 4, 5, 6, 7, 11		<i>GCHI</i> egzon 6; <i>SGCE</i> egzoni 1, 2, 3, 8, 9, 10, 12, promotor, 3'UTR; <i>PNKD</i> egzoni 1 i 2; <i>SLC2A1</i> svi egzoni	
Inicijalna denaturacija	94°C 5 min		94°C 5 min	
Denaturacija	94°C 30 s	10 ciklusa	94°C 30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	60°C 30 s		65°C 30 s	
Elongacija	72°C 45 s		72°C 45 s	
Denaturacija	94°C 30 s	20 ciklusa	94°C 30 s	20 ciklusa
Hibridizacija	60°C 30 s*		65°C 30 s*	
Elongacija	72°C 60 s		72°C 60 s	
Denaturacija	94°C 30 s	10 ciklusa	94°C 30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	50°C 30 s		55°C 30 s	
Elongacija	72°C 45 s		72°C 45 s	
Finalna elongacija	72°C 10 min		72°C 10 min	

* temperatura hibridizacije se snižava za 0,5°C u svakom narednom ciklusu – *touchdown* PCR

Nakon završetka PCR-a uzorci se čuvaju na 4°C do analize.

3.4.1. Alel-specifičan PCR

Alel-specifičan PCR (AS-PCR) je PCR metod koji je adaptiran za brzu detekciju malih promena u DNK sekvenci, kao što su tačkaste mutacije, male insercije ili male delecije. Ovom metodom se vrši selektivna amplifikacija jednog od mogućih alela čije se prisustvo detektuje.

DNK polimeraza koja vrši sintezu PCR produkta može da se veže za matricu i započne sintezu samo ako je 3' kraj prajmera potpuno komplementarno sparen sa matricom. Selektivnost AS-PCR-a se postiže upravo zahvaljujući ovom svojstvu polimeraze. Jedan prajmer se dizajnira tako da se, kada se on veže za matricu, na samom 3' kraju prajmera ili u njegovoj blizini nalazi baza koja se razlikuje između alela. PCR reakcija se izvodi pod striktnim uslovima pa će se sinteza produkta vršiti samo sa alela gde je prajmer u potpunosti komplementarno sparen sa matricom. Istovremeno se u PCR reakciji nalazi i prajmer koji će dati kontrolni produkt različite dužine u odnosu na produkt koji potiče sa alel specifičnog prajmera.

AS-PCR je korišćen za određivanje prisustva tačkaste mutacije c.68C>T (p.P23L) u egzonu 1 *GCHI* gena. Korišćeni su prajmeri (P23F i P23R) koji se vezuju uzvodno i nizvodno od mutacije i daju produkt od 307 bp. Osim ovog para prajmera, u reakciju se dodaje i prajmer (P23Ft) koji je komplementaran samo sa sekvencom koja sadrži pomenutu mutaciju (T alel) i sa P23R prajmerom daje produkt veličine 190 bp. Kao nezavisna kontrolna reakcija za svaki uzorak služio je PCR u kome su korišćeni isti P23F i P23R prajmeri, ali je umesto P23Ft prajmera korišćen P23Fc prajmer kojim se amplifikuje *wt* alel.

Sekvence prajmera koji su korišćeni za detekciju c.68C>T mutacije su:

P23F: 5'-GGAGTTT TAGCCGCAGACCT-3'

P23R: 5'-GCTCAGGATGGACGAGTAGG-3'

P23Ft: 5'-GTGCAGCAATGGGTTTCCT-3'

P23Fc: 5'-GTGCAGCAATGGGTTCCC-3'

Reakciona smeša se priprema u 0,2 ml tankozidnim (eng. *thin wall*) mikrotubama u volumenu od 15 μ l po protokolu C1 datom u tabeli 2., pri čemu su finalne koncentracije alel specifičnih prajmera (P23Ft, odnosno P23Fc) bile 0,4 pmol/ μ l. PCR reakcije se izvode po *Touchdown* PCR programu sa početnom temperaturom od 65°C (Tabela 11).

3.5. ELEKTROFOREZA NA AGAROZNOM GELU

Provera uspešnosti i kvaliteta PCR-a vrši se elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Vizuelizacija PCR produkata se vrši dodavanjem etidijum-bromida (EtBr) u gel. EtBr interkalira u molekul DNK i ima sposobnost da apsorbuje svetlost na nižim talasnim dužinama ($\lambda=302$ nm i $\lambda=366$ nm) a reemituje (fluorescira) na višim talasnim dužinama ($\lambda=590$ nm, narandžasto-crvena boja u vidljivom spektru). Kada se gel izloži UV svetlu talasne dužine $\lambda=254$ nm, ovu svetlost apsorbuje DNK molekul, prenosi je na interkalirani EtBr koji fluorescira, DNK uzorci postaju vidljivi (narandžasti). U polju jednosmerne struje fragmenti DNK u agaroznom gelu putuju u funkciji svoje dužine, pa kraći fragmenti putovati brže kroz gel i na gelu će se videti kao niža traka u odnosu na onu koju daju duži fragmenti DNK. Veličina PCR produkta se procenjuje poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina. Kvalitet PCR-a se ocenjuje kao dobar kada se na gelu uočava očekivani broj traka koje su jasne i imaju očekivanu dužinu.

3.5.1. Procedura pripreme agaroznog gela

1. 2% rastvor agaroze (w/v) u 0,5xTBE puferu (45mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8.0) zagrejati do ključanja;
2. Dodati EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5 μ g/ml i ohladiti skuvani gel do 40 °C;
3. Ohlađen gel naliti u kadicu za elektroforezu i ostaviti da polimeriše.

3.5.2. Procedura pripreme uzoraka i elektroforeza

1. PCR produkt, kao i marker (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000bp, *Fermentas*, Nemačka), pomešati sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenolplavo (w/v), 30% glicerol (v/v)) u odnosu 5:1 i naneti na gel;
2. Elektroforezu voziti u 0,5xTBE puferu na konstantnom naponu od 100V u sistemu za elektroforezu (*HE 33 Mini Submarine*, *GE Healthcare*, Sweden);
3. Gel izložiti UV svetlu ($\lambda=254$ nm) na transiluminatoru (UV Transilluminator, *HVD life sciences*, Austrija) i odrediti kvalitet PCR-a.

3.6. ELEKTROFOREZA NA DENATURISUĆEM POLIAKRILAMIDNOM GELU (PAGE)

Za razdvajanje alela koji se u dužini razlikuju samo nekoliko bp korišćena je elektroforeza na 7% denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Akrilamid je monomer koji u prisustvu slobodnih radikala koje obezbeđuje APS (amonijumpersulfat), a koje stabilizuje TEMED (tetrametiletilendiamin), polimeriše u duge lance. Uključivanjem bisakrilamida u reakciju, lanci se umrežavaju i formira se gel. Karakteristike gela se mogu značajno promeniti variranjem procenta akrilamida i bisakrilamida. Tako se dobijaju gelovi različite poroznosti koji omogućavaju razdvajanje fragmenata različite dužine. Na razdvajanje traka utiču i voltaža na kojoj se vrši elektroforeza kao i vreme putovanja traka. Fragmenti DNK u PAGE gelu putuju u funkciji svoje dužine, pa će kraći fragmenti putovati brže kroz gel i na gelu će se videti kao niža traka u odnosu na onu koju daju duži fragmenti DNK. Dužina amplifikovanih fragmenata se utvrđuje upoređivanjem položaja (visine) traka PCR produkta uzorka, sa položajem (visinom) trake kontrolnog amplifikata čija je dužina poznata ili poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina. Vizuelizacija DNK vrši se uobičajeno bojenjem srebrom. Ovaj gel ima dovoljnu rezoluciju da jasno razdvoji DNK fragmente koji se razlikuju za po 1 bp.

Elektroforeza na 7% denaturišućem poliakrilamidnom gelu je korišćena za razdvajanje mutiranog i *wt* alela *TORIA* gena. *Wt* alel je dugačak 108 bp, dok mutirani alel nosi deleciju od 3 bp i ima detektuje se kao dodatne niža traka na gelu.

3.6.1. Procedura pripreme denaturišućeg poliakrilamidnog gela

1. Napraviti 35 ml rastvora za 7 % denaturišući PAGE gel:

Akrilamid (<i>GE Healthcare</i> , USA)	2,33 g
Bis-akrilamid (<i>BioRad</i> , USA)	0,12 g
Urea (<i>Serva</i> , Nemačka)	14,7 g
5 X TBE	3,5 ml
Dejonizovana voda	~17,5 ml
10% APS* (<i>Serva</i> , Nemačka)	280 µl
TEMED* (<i>Serva</i> , Nemačka)	17,5 µl

*Poslednje dve komponente (APS i TEMED) dodati neposredno pre nalivanja gela, a pre njihovog dodavanja gel profiltrirati.

2. Pažljivo uliti pripremljeni rastvor između staklenih ploča, postaviti češalj za formiranje bunarića i ostaviti najmanje 2 sata da akrilamid polimerizuje.

3. Nakon polimerisanja sklopiti sistem za elektroforezu (SE600, *GE Healthcare*, USA). Isprati bunariće 0,5xTBE puferom kako bi se uklonila precipitirana urea i otkinuti komadići gela.

4. Elektroforezu bez uzoraka na gelu vršiti oko 30 minuta na konstantnoj snazi od 25 W što doprinosi boljoj polimerizaciji i ravnomernijem zagrevanju gela do temperature od 45 do 50 °C (PowerPac HV 5000, *BioRad*, USA).

3.6.2. Procedura pripreme uzoraka za elektroforezu i elektroforeza

1. U mikrotube (0,2 ml) sipati po 5 µl PCR produkata i 5 µl pufera za nalivanje uzoraka (95% formamid, 0,1% bromfenol plavo, 0,1% ksilencijanol i 1mM NaOH). U jednu

mikrotubu sipati 2 μ l markera za veličinu (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000bp, *Fermentas*, Nemačka).

2. Pripremljene uzorke denaturisati 7 minuta u vodenom kupatilu na 100 °C, a zatim ostaviti 5 minuta na ledu pre nanošenja na gel.
3. Naneti uzorke i marker u bunariće gela.
4. Elektroforezu vršiti na konstantnom naponu od 25 W u 0,5xTBE puferu.
5. Zaustaviti elektroforezu nakon vremena potrebnog da se DNK fragmenti nađu u donjoj trećini gela. Potrebno vreme se procenjuje na osnovu migracije boja. (Na 7% denaturišućem poliakrilamidnom gelu bromfenolplavo putuje kao jednolančani DNK fragment od oko 22 bp, a ksilencijanol kao fragment od oko 85 bp. Vreme koje protekne od izlaska bromfenolplavog sa gela do izlaska ksilencijanola odgovara razlici u dužini fragmenata od 63 bp i uzima se kao vremenska jedinica.)

3.6.3. Procedura bojenja gela srebrom

1. Fiksacija DNK u gelu: potopiti gel 20 minuta u 10% etanol, a zatim 3 minuta u 1% azotnu kiselinu. Isprati gel 3 puta po 2 minuta u destilovanoj vodi.
2. Impregnacija DNK srebrom: potopiti gel 3 minuta u rastvor srebronitrata (1g/l Ag-nitrata; 1,5 ml/l 37% formaldehida). Isprati gel 10 sekundi destilovanoj vodi.
3. Vizuelizacija DNK impregnirane srebrom: potopiti gel u hladan razvijlač (30 g/l bezvodnog Na-karbonata; 3 ml/l 37 % formaldehida; 0,5ml/l 0,4% Na-tiosulfata) dok se ne pojave jasne trake DNK fragmenata. Prekinuti razvijlanje odlivanjem razvijlača i potapanjem gela 10 minuta u 7 % sirćetnu kiselinu.

3.7. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je automatizovan proces u kome se elektroforeza vrši kroz vrlo tanke kapilare ispunjenu polimerom, koji ima ulogu analognu ulozi gela u klasičnoj gel elektroforezi. Ovom metodom mogu da se razdvoje fragmenti koji se razlikuju u dužini

samo za 1bp. Aparat na kome se kapilarna elektroforeza izvodi naziva se automatski DNK sekvenator. Prilikom elektroforeze kraći fragmenti putuju brže i prvi stižu do kraja kapilare gde se nalazi prozor za detekciju. Fragmenti koji se razdvajaju su obeleženi fluorescentnim bojama, pa kada stignu do prozora za detekciju, gde nailaze na laserski zrak, boja kojim je fragment obeležen se ekscituje i pri vraćanju iz ekscitovanog u nepobuđeno stanje emituje svetlost talasne dužine karakteristične baš za tu boju. Emitovana svetlost se detektuje CCD kamerom (eng. *charge-coupled device* - CCD), a redosled javljanja signala, boja od koje signal potiče i intenzitet signala se pamte u softveru za prikupljanje signala.

Kapilarna elektroforeza je našla najširu primenu u DNK sekvenciranju i fragmentnoj analizi. DNK sekvenciranjem se određuje tačan nukleotidni sastav neke sekvence, dok se u fragmentnoj analizi vrši određivanje dužine razdvajanih fragmenata njihovim poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina. Prilikom fragmentne analize visina i površina signala dobijenih za svaki analizirani fragment su proporcionalni količini analiziranog fragmenta u uzorku, što se koristi za relativnu kvantifikaciju u MLPA metodi.

3.7.1. Sekvenciranje uzoraka

Termin DNK sekvenciranje podrazumeva nekoliko metoda i tehnologija koje se koriste u cilju utvrđivanja redosleda nukleotidnih baza (adenin, guanin, citozin i timin) u molekulu DNK. Najšire primenjivani metod je *Dye-terminator* sekvenciranje koji se zasniva na Sangerovoj metodi sekvenciranja.

Sekvenciranje po Sangeru podrazumeva izvođenje četiri nezavisne PCR reakcije, sve četiri sadrže DNK matricu, prajmer, DNK polimerazu i smešu deoksiribonukleotid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), ali i po jedan od dideoksiribonukleotid trifosfata (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP). Ugradnjom ddNTP-a se zaustavlja reakcija polimerizacije, pa će se na kraju u svakoj reakciji nalaziti smeša fragmenata različitih dužina koji se svi završavaju istom bazom. Ovi fragmenti se zatim razdvajaju na denaturišućem poliakrilamidnom gelu (svaka od 4 reakcije posebno) i zatim se na osnovu relativne pozicije traka na gelu čita DNK sekvenca (od dna ka vrhu gela).

3.7.1.2. Reakcija sekvenciranja (*Cycle sequencing* reakcija)

Reakcija sekvenciranja pripremana je upotrebom *BigDye Terminator Ready Reaction* kita (*Applied Biosystems*, USA). Kao matrica za ovu reakciju dodaje se prečišćeni PCR produkt čiju sekvencu treba odrediti, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji. Protokol za pripremu reakcije sekvenciranja *BigDye Terminator Ready Reaction* kitom dat je u Tabeli 12.

Tabela 12. Protokol za pripremu reakcije sekvenciranja.

KOMPONENTE	KOLIČINA
<i>Ready Reaction Premix v3.1 (2,5x)</i>	0,8 μ l
<i>Big Dye Sequencing Buffer (5x)</i>	2 μ l
Prajmer (10 pmol/ μ l)	2 μ l
PCR produkt	*
Dejonizovana voda	do 10 μ l

* Količina PCR produkta koja se dodaje je 3-10 ng za PCR produkte od 200-500 bp i 10-40 ng za PCR produkte od 500-1000 bp.

PCR reakcije se izvode u GeneAmp[®] PCR System 9700 ili Veriti (*Applied Biosystems*, USA) PCR mašini po programu koji se sastoji od inicijalne denaturacije 1 min na 96°C i 25 ciklusa amplifikacije. Svaki ciklus amplifikacije se sastoji od denaturacije 10 s na 96°C, hibridizacije 5 s na 50°C i elongacije 4 min na 60°C. Nakon završetka amplifikacije uzorci se čuvaju na 4°C.

3.7.1.3. Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja etanol/Na-acetat precipitacijom

Pre analize produkata reakcije sekvenciranja na automatskom sekvenatoru oni se prečišćavaju od ostataka fluorescentno obeleženih ddNTP-ova. Ovim se sprečava interferiranje fluorescentnog signala sa neugrađenih ddNTP-ova sa onim koji potiče sa sekvence ciljnog DNK molekula.

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani etanol/Na-acetat precipitacijom. U prisustvu soli i etanola DNK fragmenti precipitiraju iz vodenog rastvora dok u supernatantu

ostaju neugrađeni ddNTP-ovi, koji se uklanjaju. Preostali talog prečišćenih obeleženih DNK fragmenata rastvara se u dejonizovanom formamidu, i denaturiše. Time se omogućava da DNK fragmenti ostanu u jednolančanoj linearnoj formi, što je neophodno da bi se tokom elektroforeze fragmenti razdvajali prema dužini.

1. U 10 µl produkta reakcije sekvenciranja dodati 10 µl dejonizovane vode, 2 µl 3M Na-acetata i 50 µl 99% etanola. Sve promešati izvrtanjem tubice i inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Centrifugirati uzorak 15 minuta na 13000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, *Eppendorf*, Nemačka) i nakon toga odvaditi supernatant.
3. Dodati 70 µl 70% etanola, centrifugirati uzorak 10 minuta na 13000 rpm i nakon toga odvaditi supernatant.
4. Osušiti precipitat 2 minuta na 90 °C.
5. Dodati 20 µl dejonizovanog formamida (HiDi Formamide, *AppliedBiosystems*, USA), vorteksovati i zatim denaturisati 2 minuta na 95 °C.
6. Čuvati uzorke na ledu do puštanja na automatski sekvenator.

3.7.1.4. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja

Elektroforeza prečišćenih produkata reakcije sekvenciranja vršena je na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*AppliedBiosystems*, USA). Prikupljanje „sirovih“ podataka (eng. *Raw data*) sekvenci kao i kontrola celog procesa automatskog sekvenciranja vrši se uz pomoć 310 Data Collection softvera (*AppliedBiosystems*, USA)..

Elektroforeza je vršena na 15kV i 50°C (*Run module Seq POP6 Rapid 1ml E.md4*), a uslovi vezani za injektiranje uzorka i dužina elektroforeze za pojedine fragmente dati su u Tabeli 13. Za elektroforezu je korišćen polimer POP6 (*AppliedBiosystems*, USA) i kapilara od 47 cm.

Tabela 13. Uslovi injektiranja uzorka i dužina elektroforeze na automatskom sekvenatoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Egzoni	Injekciono vreme (s)	Injekciona voltaža (kV)	Trajanje elektroforeze (min)
<i>GCHI</i> , svi egzoni	20	1.5	38
<i>THAPI</i> , egzon 1	25	2	42
<i>THAPI</i> , egzon 2	12	2	39
<i>THAPI</i> , egzon 3	20	2	42
<i>PNKD</i> , svi egzoni	30	2	28
<i>SGCE</i> , svi egzoni	20	1,5	38
<i>SLC2A1</i> , svi egzoni	20	1,5	32

3.7.1.5. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem

Sirovi podaci prikupljeni 310 Data collection softverom tokom kapilarne elektroforeze obrađuju se u Sequencing Analysis v5.3.1 softveru (*AppliedBiosystems*, USA). Ovako dobijene sekvence se analiziraju, odnosno porede se sa *wt* sekvencama koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>). Poređenje je vršeno pomoću Sequencher 4.10.1 Demo softvera (*Gene Codes Corporation*, USA).

Za sve detektovane promene u sekvenci se proverava da li su opisane u nekoj od baza podataka i da li postoji opisan njihov patološki značaj. Dve najveće baze podataka koje su korišćene su dbSNP v135 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i HGMD (eng. *The Human Gene Mutation Database*, <http://www.hgmd.org>). Osim ovih, korišćene su i baze podataka specifične za određene gene (<http://www.dmd.nl>; <http://umd.be>; <http://www.biopku.org>).

Potencijalni patološki značaj detektovanih promena je predviđan i *in silico*, korišćenjem MutationTaster softvera (<http://www.mutationtaster.org>). Ovim programom se predviđa da li je testirana promena sekvence mutacija koja dovodi do oboljevanja ili benigni polimorfizam. Za svako predviđanje dobija se i p vrednost (nije isto što i p vrednost iz statističkih testova) koja govori o verovatnoći predikcije, tj. što je p vrednost bliža jedinici to je predikcija „sigurnija“. Osim toga, program vrši i analizu konzerviranosti aminokiselina pogođenih promenom i to tako što poredi humanu sekvencu sa homologim sekvencama kod deset vrsta životinja (od vinske mušice do čimpanze).

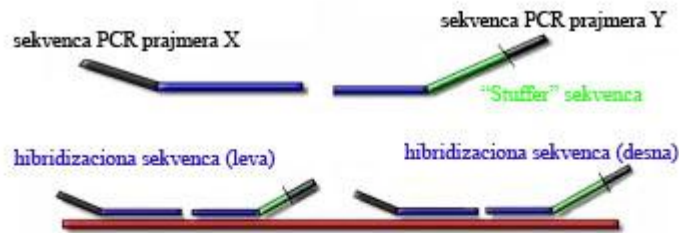
3.7.2.. MLPA (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

MLPA metoda je nastala modifikacijom multipleks PCR metode. U multipleks PCR-u se u jednoj reakcionoj smeši koristi više pari prajmera kojima će se amplifikovati željeni broj fragmenata DNK. Ključno je da ampliconi budu različite dužine, kako bi se mogli međusobno razlikovati prilikom analize.

Kod MLPA se upotrebom proba specifičnih za analizirane regione i samo jednog para prajmera amplifikuje do 50 različitih DNK fragmenata (Schouten et al 2002). Reakcija se izvodi tako što se prvo vrši denaturacija DNK matrice i hibridizacija proba. Svaka proba se sastoji iz dva oligonukleotida koji će na matrici hibridizovati jedan neposredno do drugog. Samo ako su se oba oligonukleotida hibridizovala, u sledećem koraku izvršiće se njihova uspešna ligacija i time se formirati kompletna proba koja će zatim biti amplifikovana PCR reakcijom. Parovi oligonukleotida su dizajnirani tako da osim sekvence koja će hibridizovati sa matricom jedan sadrži i univerzalnu sekvencu koju prepoznaje uzvodni prajmer, a drugi sadrži univerzalnu sekvencu koju prepoznaje nizvodni prajmer i „stuffer“ sekvencu čija se dužina razlikuje između proba za različite regione, pa se tako nakon PCR-a dobijaju fragmenti različitih dužina. Uzvodni prajmer koji se koristi za PCR amplifikaciju je fluorescentno obeležen, pa su i PCR produkti fluorescentno obeleženi, što omogućava njihovu analizu upotrebom kapilarne elektroforeze (Slika 14). Nakon kapilarne elektroforeze, softverski se određuju intenziteti pojedinih signala kod testiranog uzorka i porede se sa intenzitetima odgovarajućih signala dobijenih kod kontrolnih uzoraka koji su istovremeno analizirani. Kao rezultat dobija se relativna količina svakog amplicona u uzorku.

Najšira primena MLPA metode je za detekciju delecija i duplikacija, ali se koristi i za analizu DNK metilacije, detekciju ciljanih tačkastih mutacija (uključujući i polimorfizme), kao i za relativnu kvantifikaciju iRNK.

1. Denaturacija i hibridizacija



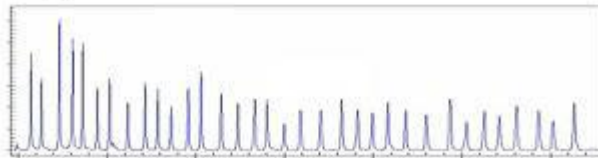
2. Ligacija



3. PCR sa univerzalnim prajmerima X i Y eksponecijalna amplifikacija samo ligiranih proba



4. Fragmentna analiza



Slika 14. Šematski prikaz koraka u MLPA metodi. Adaptirano sa web sajta www.mlpa.com.

3.7.2.1. Procedura pripreme MLPA reakcije

Sve reakcije su pripremane korišćenjem SALSA MLPA P099- C1 (GCH1-TH-SGCE) kita (MRC-Holland, Holandija).

Denaturacija:

1. U mikrotubama od 0,2 ml pripremiti razblaženja genomske DNK u dejonizovanoj vodi za testirane i kontrolne uzorke tako da se u ukupnoj zapremini od 5 μ l nalazi 200 ng DNK.

2. Inkubirati uzorke u PCR aparatu 5 minuta na 98°C i zatim ih ohladiti na 25°C.

Hibridizacija:

3. Pripremiti hibridizacioni miks (za svaki uzorak: 1,5 µl MLPA pufera + 1,5 µl proba miksa; promešati).
4. Nakon denaturacije dodati u svaki uzorak po 3 µl hibridizacionog miksa, promešati i inkubirati uzorke u PCR aparatu 1 minut na 95°C i zatim 16-20 sati na 60°C.

Ligacija:

5. Pripremiti ligacioni miks (za svaki uzorak: 25 µl dejonizovane vode + 3 µl Ligase pufera A + 3 µl Ligase pufera B + 1 µl Ligase-65 enzima; promešati).
6. Pauzirati PCR aparat na 54°C.
7. Kada temperatura uzoraka bude 54°C dodati po 32 µl ligacionog miksa u svaki uzorak i promešati.
8. Nastaviti program na PCR aparatu: 15 minuta na 54°C (ligacija), 5 minuta na 98°C (inaktiviranje enzima) i zatim pauzirati PCR aparat na 20°C.

PCR reakcija

9. Pripremiti PCR miks (za svaki uzorak: 7,5 µl dejonizovane vode + 2 µl SALSA PCR prajmer miksa + 0,5 µl SALSA polimeraze; promešati)
 10. Na sobnoj temperaturi dodati po 10 µl PCR miksa u svaki uzorak i promešati.
 11. Nastaviti program na PCR aparatu: 35 ciklusa: 30 s na 95°C, 30 s na 60°C, 60 s na 72°C; zatim inkubirati 20 minuta na 72°C, pa pauzirati na 15°C.
- Uzorci se mogu čuvati do 7 dana na 4°C, u mraku.

3.7.2.2. Procedura pripreme MLPA uzoraka za kapilarnu elektroforezu

Neposredno pre analize PCR produkata MLPA reakcije na automatskom sekvenatoru oni se razblažuju i denurišu.

1. Za svaki uzorak napraviti sledeću smešu: 0.75 µl PCR reakcije + 0.75 µl dejonizovane vode + 0.5 µl markera za veličinu (GeneScan™ - 500 LIZ, *AppliedBiosystems*, USA) + 13.5 µl dejonizovanog formamida (HiDi Formamide, *AppliedBiosystems*, USA).
2. Inkubirati ovako pripremljene uzorke 2 minuta na 80°C i zatim brzo ohladiti na 4°C i tako čuvati do puštanja na sekvenator.

3.7.2.3. Kapilarna elektroforeza MLPA produkata i analiza rezultata

Kapilarna elektroforeza denaturisanih PCR produkata MLPA reakcije vršena je na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*AppliedBiosystems*, USA). Injekciona voltaža je 1,6 kV, a injekciono vreme 15 s. Elektroforeza je vršena na 15kV i 60°C, korišćen je polimer POP4 (*AppliedBiosystems*, USA) i kapilara od 47 cm.

Prikupljanje „sirovih“ podataka (eng. Raw data) kao i kontrola celog procesa elektroforeze vrši se uz pomoć 310 Data Collection softvera (*AppliedBiosystems*, USA). „Sirovi“ podaci se dalje obrađuju u GeneMapper v4.0 softveru (*AppliedBiosystems*, USA). Ovim se dobijaju podaci o dužinama fragmenata, površini i visini signala za svaki fragment u analiziranom uzorku. Podaci se dalje analiziraju u programu Coffalyzer v9.4 (*MRC-Holland*, Holandija) , kojim se određuje relativna količina svakog amplikona u analiziranom uzorku.

3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

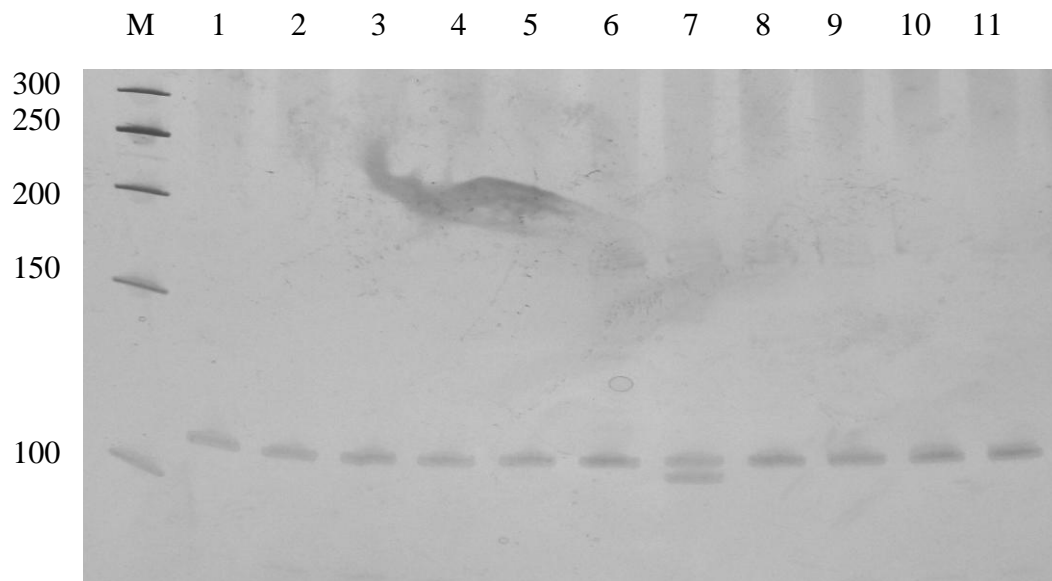
Za testiranje značajnosti razlike u učestalosti pojedinih polimorfizama korišćeni su χ^2 test i Fišerov egzaktni test verovatnoće (ukoliko je učestalost pojedinih polimorfizama bila manja od pet po grupi).

4. REZULTATI

U ovo ispitivanje uključeno je ukupno 397 osoba, među kojima je bilo 352 bolesnika sa primarnom distonijom i 45 osoba koje su srodnici obolelih. Sedam srodnika je imalo simptome distonije, dok su ostali bili asimptomatski. Među ispitivanim osobama bilo je 226 žena i 171 muškarac srednjih godina starosti 47 ± 17 godina (opseg: 3-81 godina). Srednje godine pojave prvih simptoma su bile $36 \pm 18,3$ godina (opseg: 1-77 godina), sa srednjim trajanjem distonije od $11,3 \pm 10,6$ godina (opseg: 2 meseca - 50 godina). Od ukupno 359 osoba sa simptomima distonije za njih 339 je bio dostupan podatak o godinama pojave prvih simptoma i 136 bolesnika (40,1%) je imalo rani početak simptoma, odnosno u 30. godini ili ranije. Podaci o distribuciji distonije bili su dostupni za 331 bolesnika. Među njima su 193 pacijenta imala fokalnu, 10 multifokalnu, 77 segmentnu, 1 hemidistoniju i 50 generalizovanu distoniju. Ukupno 44 bolesnika su imala simptome miokloničke distonije, a njih 10 simptome paroksizmalne distonije.

4.1. DETEKCIJA GAG DELECIJE U *TORIA/DYT1* GENU

Svi regrutovani bolesnici (352) i članovi porodica (45), ukupno njih 397, testirani su na prisustvo DYT1 mutacije, tj. GAG delecije u *TORIA/DYT1* genu (Slika 15). Takođe, s obzirom da je DYT1 najčešći tip distonije, i svi kontrolni uzorci (106) testirani su na prisustvo GAG delecije. Kod ukupno 17 osoba detektovano je prisustvo GAG delecije u *TORIA/DYT1* genu (Tabela 14). Osam osoba su bili bolesnici, dok su preostalih 9 bili članovi porodica obolelih. Među članovima porodica samo jedna osoba imala je ispoljene znake distonije, dok je preostalih 8 bilo bez simptoma. Detaljniji podaci o pacijentima sa mutacijom, za koje su podaci bili dostupni, nalaze se u Tabeli 15. Ni kod jednog od kontrolnih uzoraka nije pronađena GAG delecija u *TORIA/DYT1* genu.



Slika 15. Primer denaturišućeg poliakrilamidnog gela na kome se određuje prisustvo GAG delecije u *TORIA/DYT1* genu. M - DNK standard za veličinu (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000bp, *Fermentas*, Nemačka), veličine u bp su date pored slike. U koloni 7 nalazi se uzorak koji nosi deleciju.

Tabela 14. Mutacija c.907_909delGAG u *TORIA* genu.

Nukleotidna promena	Pozicija	Broj porodica u kojima je detektovana mutacija	Ukupan broj nosilaca mutacije	Broj obolelih
c.907_909delGAG	egzon 5	8	17	9

Tabela 15. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa GAG delecijom u *TOR1A* genu.

Bolesnik	1	2	3	4	5	6	7	8
Pol	M	F	M	M	M	F	F	F
Starost (godine)	28	34	62	33	41	18	30	73
Pojava prvih simptoma (godine)	16	21	14	24	10	11	11	31
Porodična istorija	neg	neg	neg	neg	poz	poz	neg	neg
Mesto početka prvih simptoma	Ruka	D ruka L noga	D ruka D noga	D noga	Ruka	D noga	D ruka	D i L ruka
Klasifikacija distonije	F	M	G	G	F	G	S	G
BFM skor	6	5.5	/	9	2	31	13	/

neg - negativan, poz - pozitivan, D - desno, L- levo, F - fokalna, M - multifokalna, G - generalizovana, S - segmentna, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju

Kod DYT1 negativnih bolesnika vršena je analiza preostalih gena u zavisnosti od relevantnih kliničkih podataka.

4.2. ANALIZA SEKVENCE *THAPI*/DYT6 GENA

Kod ukupno 315 bolesnika i 13 članova porodica vršeno je direktno sekvenciranje egzona 1-3 *THAPI* gena uključujući i 5'UTR region. U kodirajućim regionima *THAPI* gena pronađene su 4 različite promene kod 5 bolesnika (Tabela 16). Tri promene su bile supstitucije, a jedna je bila duplikacija 24 bp. Promene c.62C>G i c.109_132dupl do sada nisu opisane u literaturi. Iste promene detektovane su i kod 5 od 9 testiranih srodnika ovih pacijenata. Niko od srodnika koji su nosili neku od nađenih promena nije ispoljavao simptome distonije. Nijedna od detektovanih promena kodirajuće sekvence nije pronađena u kontrolnoj populaciji.

Tabela 16. Detektovane promene u kodirajućim regionima *THAPI* gena.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj porodica u kojima je detektovana mutacija	Ukupan broj nosilaca mutacije	Broj obolelih
c.62C>G	patogena; >90%	egzon 1	2	5	2
c.85C>T	patogena; >99%	egzon 2	1	1	1
c.109_132dupl	nije primenljivo*	egzon 2	1	3	1
c.496G>T	benigna; >50%	egzon 3	1	1	1

*MutationTaster ne može da vrši predikcije za insercije/delecije veće od 12bp.

Osim promena u kodirajućim regionima *THAPI* gena, detektovane su i 4 promene u nekodirajućim regionima gena. Tri od ove četiri promene su detektovane i u kontrolnoj populaciji, dok je jedna promena detektovana samo kod 2 nesrodna bolesnika (Tabela 17). Učestalosti navedenih promena u populaciji pacijenata nisu se značajno razlikovale od učestalosti u kontrolnoj populaciji ($p > 0.05$ za svaku od tri navedene varijacije).

Tabela 17. Detektovane promene u nekodirajućim regionima *THAPI* gena i njihova učestalost u kod bolesnika i u kontrolnoj populaciji.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Učestalost kod bolesnika, aleli	Učestalost kod kontrola, aleli
c.-237_-236GA>TT	nije primenljivo*	5'UTR	TT=15/656 GA=639/656	2/212 210/212
c.-220C>T	patogena; >80%	5'UTR	T=2/656 C=652/656	0/212 212/212
c.71+126T>C	benigna; >70%	intron1	C=40/656 T=614/656	12/212 200/212
c.268-87A>G	benigna; >70%	intron2	C=35/656 T=619/656	11/212 201/212

* ova promena se nalazi izvan *THAPI* sekvence koja postoji u bazi MutationTaster softvera.

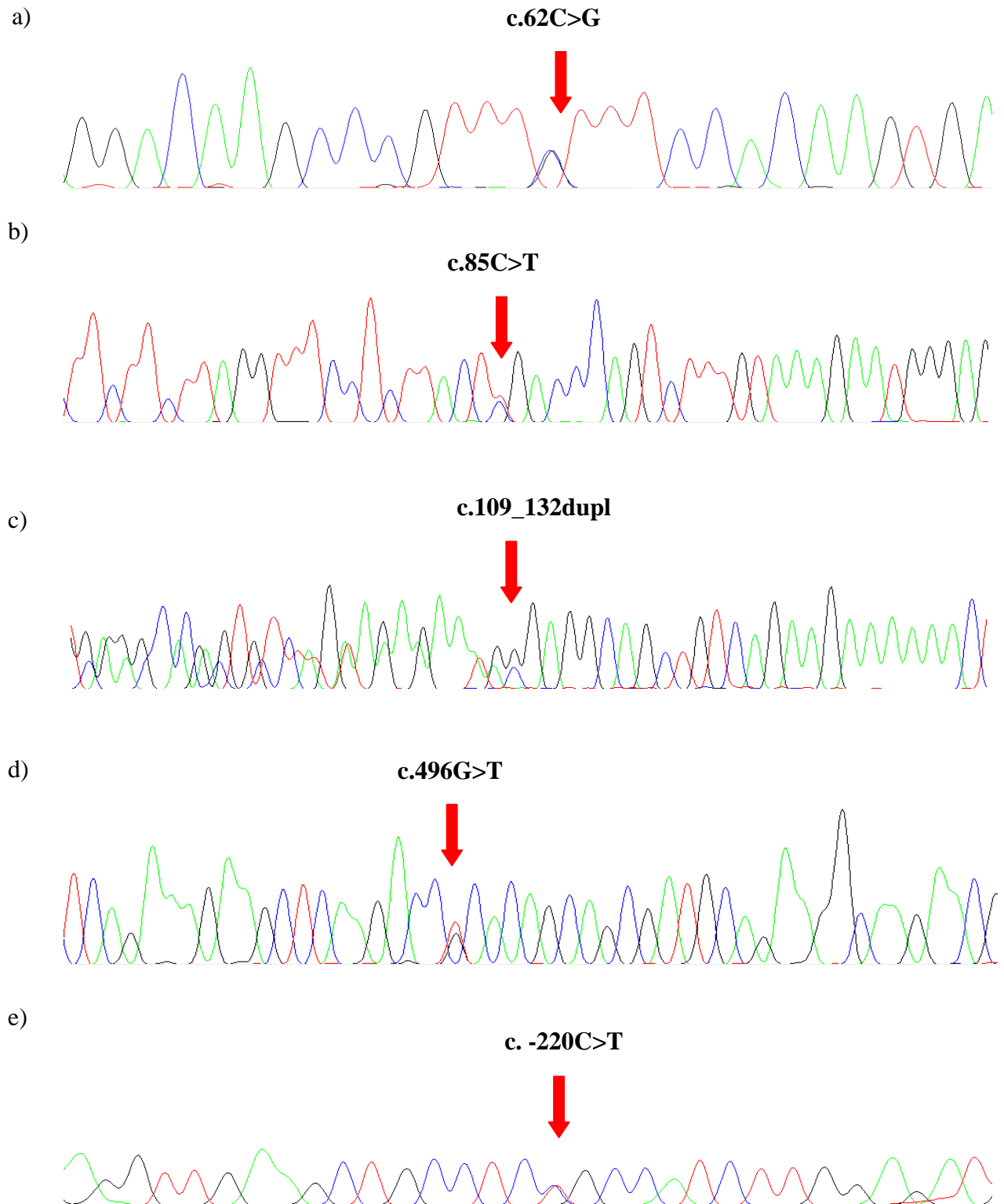
Za sve detektovane promene u sekvenci vršena je predikcija patogenosti MutationTaster softverom. Rezultati su dati u Tabelama 16 i 17. Detaljniji podaci o

bolesnicima sa patogenim promenama u sekvenci nalaze se u Tabeli 18, dok je prikaz elektroferograma dat na Slici 16.

Tabela 18. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenama u kodirajućim ili nekodirajućim regionima *THAP1* gena.

Bolesnik	1	2	3	4	5	6	7
Nukleotidna promena	c.62C>G	c.62C>G	c.85C>T	c.109_132dup	c.496G>T	c.-220C>T	c.-220C>T
Pol	m	ž	m	ž	m	m	m
Starost (godine)	25	28	40	38	24	26	50
Pojava prvih simptoma (godine)	12	7	36	12	7	26	41
Porodična istorija	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Mesto početka prvih simptoma	vrat	GE	larinks	vrat	GE	vrat GE	larinks
Klasifikacija distonije	G	G	S	G	M	S	F
BFM skor	11	4	6	36	18	2.5	6

neg - negativan, GE - gornji ekstremiteti, F - fokalna, M - multifokalna, G - generalizovana, S - segmentna, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju



Slika 16. Elektroferogrami na kojima se vide nukleotidne promene u sekvenci *THAP1* gena: a) c.62C>G, egzon 1, b) c.85C>T, egzon 2, c) c.109_132dupl, egzon 2, d) c.496G>T, egzon 3, e) c.-220C>T, 5'UTR.

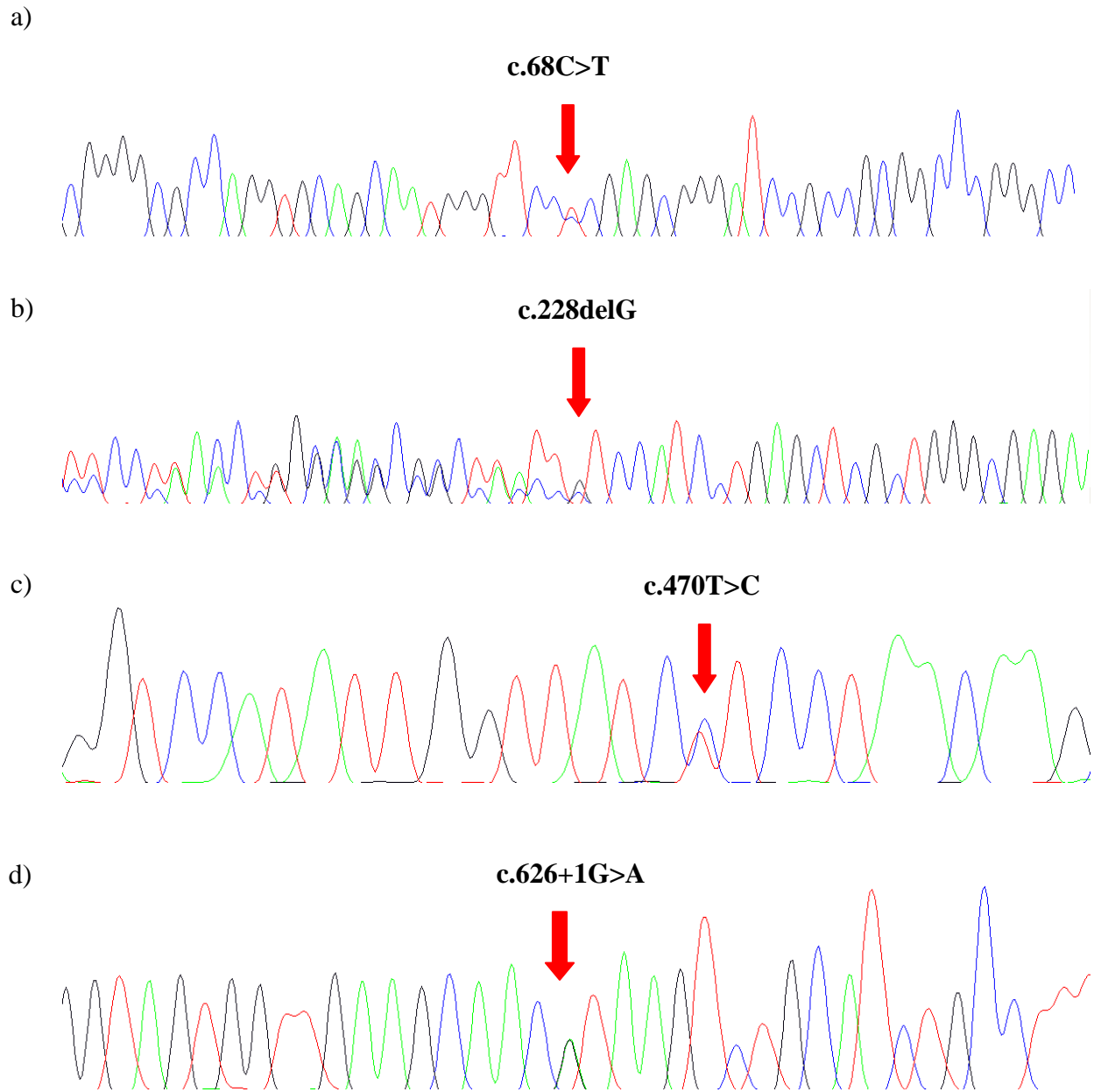
4.3. ANALIZA SEKVENCE *GCHI*/DYT5a GENA

Direktno sekvenciranje *GCHI* gena izvršeno je kod ukupno 32 bolesnika i 9 članova porodica, a kod 29 pacijenata rađena je i detekcija duplikacija i delecija MLPA metodom. Promene u sekvenci su pronađene kod 5 bolesnika i kod 5 od 9 testiranih članova porodica. Četiri od 5 srodnika kod kojih su detektovane promene u sekvenci imalo je simptome distonije (Tabela 19). U kodirajućim regionima *GCHI* gena pronađene su dve supstitucije, jedna delecija od 1 bp (Slika 17) i jedna delecija prvog egzona koja je uključivala i region ispred prvog egzona (Slika 18). Delecija c.228delG i supstitucija c.470T>C do sada nisu opisane u literaturi. U nekodirajućim delovima sekvence pronađena je jedna supstitucija u mestu za iskrajanje introna (Slika 17). Detaljniji podaci o bolesnicima sa mutacijom, za koje su podaci bili dostupni, nalaze se u Tabeli 20.

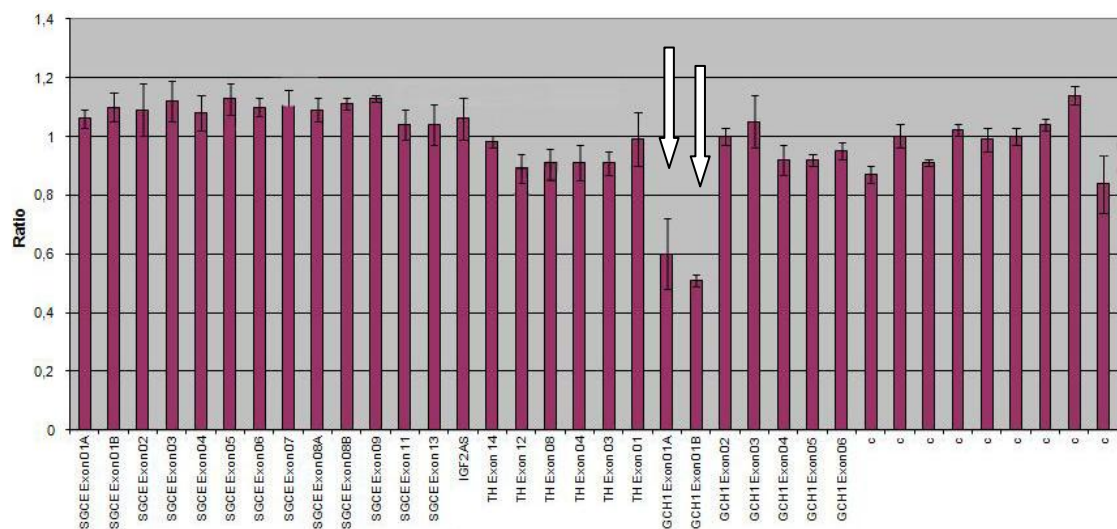
Tabela 19. Detektovane promene u kodirajućim i nekodirajućim regionima *GCHI* gena.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj porodica u kojima je detektovana mutacija	Ukupan broj nosilaca mutacije	Broj obolelih
delecija egzona 1	nije primenljivo*	egzon 1 i uzvodna sekvenca	1	1	1
c.68C>T	benigna; >99%	egzon 1	1	1	1
c.228delG	patogena; 100%	egzon 1	1	4	3
c.470T>C	patogena; >99%	egzon 3	1	3	3
c.626+1G>A	patogena; >99%	intron 5	1	1	1

* MutationTaster ne može da vrši predikcije za insercije/delecije veće od 12bp.



Slika 17. Elektroferogrami na kojima se vide nukleotidne promene u sekvenci *GCHI* gena: a) c.68C>T, egzon 1, b) c.228delG, egzon 1, c) c.470T>C, egzon 3, d) c.626+1G>A, intron 5.



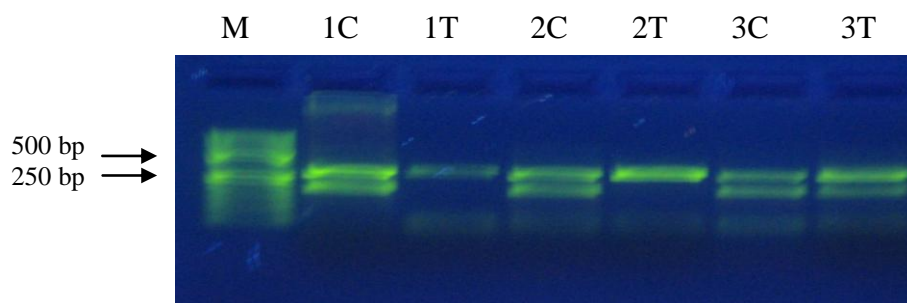
Slika 18. Primer MLPA histograma na kome je prikazan broj kopija određenih regiona *SGCE*, *TH1* i *GCH1* gena u odnosu na kontrolni uzorak, gde se prisustvo 2 kopije svakog alela označava vrednošću 1. Stubići označeni strelicom ukazuju na prisustvo delecije kod analiziranog bolesnika.

Tabela 20. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenama u kodirajućim regionima *GCH1* gena.

Bolesnik	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nukleotidna promena	egzon 1 del	c.68C>T	c.228delG	c.228delG	c.228delG	c.470T>C	c.470T>C	c.470T>C	c.626+1G>A
Pol	ž	ž	m	ž	ž	ž	ž	ž	m
Starost (godine)	17	36	11	16	57	41	41	17	10
Pojava prvih simptoma (godine)	detinjstvo	30	7	10	detinjstvo	12	13	13	7
Porodična istorija	neg	neg	poz	poz	poz	poz	poz	poz	neg
Mesto početka prvih simptoma	noga?	L ruka	L noga	D noga	L stopalo	D stopalo	L i D noga	L noga	L i D noga
Klasifikacija distonije	G	G	G	F	F	G	G	F	G
BFM skor	/	19	/	/	/	/	/	/	/

neg - negativan, poz - pozitivan, D - desno, L- levo, F - fokalna, G - generalizovana, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju

Supstitucija detektovana u egzonu 1 (c.68C>T) nije sa sigurnošću determinisana kao mutacija u literaturi, pa je zato, alel specifičnim PCR-om, određivana njena učestalost u kontrolnoj populaciji. Ni u jednom od 101 testiranog kontrolnog uzorka nije detektovano prisustvo ove supstitucije (Slika 19).



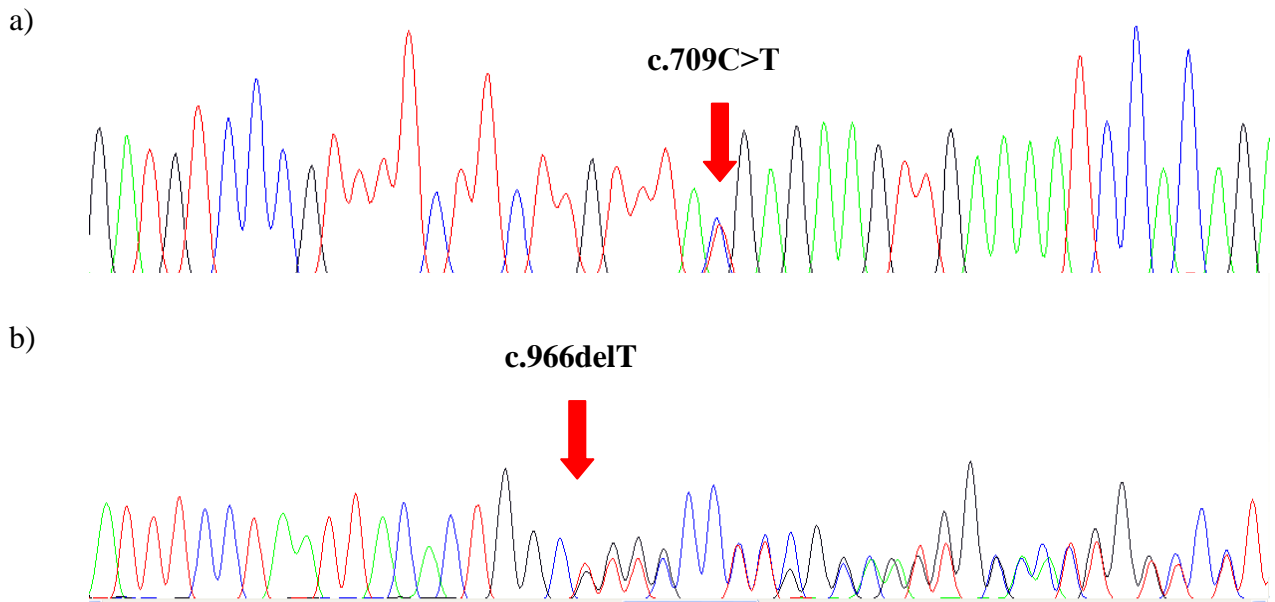
Slika 19. Primer agaroznog gela na kome se alel specifičnim PCR-om određuje prisustvo c.68C>T supstitucije. M - DNK standard za veličinu (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000bp, *Fermentas*, Nemačka). U kolonama označenim sa C su AS-PCR produkti koji detektuju prisustvo C alela u uzorcima; u kolonama označenim sa T su AS-PCR produkti koji detektuju prisustvo T alela. T alel je prisutan samo u kontrolnom uzorku 3.

4.4. ANALIZA SEKVENCE *SGCE*/DYT11 GENA

Direktno sekvenciranje promotora i egzona 1-12 *SGCE* gena, uključujući i 3'UTR region, izvršeno je kod ukupno 44 bolesnika i jednog člana porodice, a kod 38 pacijenata i jednog člana porodice rađena je i detekcija duplikacija i delecija MLPA metodom. U kodirajućim regionima pronađena je jedna supstitucija i jedna delecija od 1 bp (Tabela 21, Slika 20). Detaljniji podaci koji su bili dostupni o bolesnicima sa mutacijom nalaze se u Tabeli 22.

Tabela 21. Detektovane promene u kodirajućim regionima *SGCE* gena.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj porodica u kojima je detektovana mutacija	Ukupan broj nosilaca mutacije	Broj obolelih
c.709C>T	patogena; >99%	egzon 6	1	1	1
c.966delT	patogena; 100%	egzon 7	1	1	1



Slika 20. Elektroferogrami na kojima se vide nukleotidne promene u sekvenci *SGCE* gena: a) c.709C>T, egzon 6, b) c.966delT, egzon 7.

Tabela 22. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenama u kodirajućim regionima *SGCE* gena.

Bolesnik	1	2
Nukleotidna promena	c.709C>T	c.966delT
Pol	ž	ž
Starost (godine)	3	/
Pojava prvih simptoma (godine)	1	9
Porodična istorija	neg	poz
Mesto početka prvih simptoma	D noga	vrat
Klasifikacija distonije	G	/
BFM skor	18	/

neg - negativan, poz - pozitivan, D - desno, G - generalizovana, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju

U egzonu 10, koji se alternativno iskraja, detektovane su tri supstitucije koje su već opisane kao polimorfizmi u bazama podataka (dbSNP v135 i <http://www.dmd.nl>) (Tabela 23). U nekodirajućim regionima takođe su detektovane varijacije u sekvenci koje su već opisane kao polimorfizmi u bazi podataka (dbSNP v135) (Tabela 23).

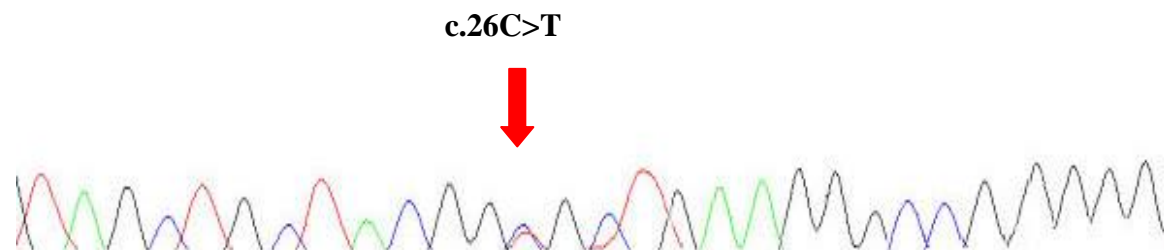
Ni kod jednog bolesnika nisu detektovane duplikacije ili delecije.

Tabela 23. Promene detektovane u kodirajućim i nekodirajućim regionima *SGCE* gena, koje su u bazama podataka opisane kao polimorfizmi. Ukupno je analizirano 90 alela.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj alela u kojima je detektovana supstitucija
c.390+64insGT	benigna; >70%	intron 3	48
c.391-43A>C	benigna; >70%	intron 3	14
c.1294A>C	benigna; >99%	egzon 10	73
c.1295G>A	benigna; >99%	egzon 10	4
c.1297G>A	benigna; >99%	egzon 10	2
c.*101A>G	benigna; >70%	3'UTR	2

4.5. DETEKCIJA c.20C>T, c.26C>T i c.97G>C MUTACIJA U *PNKD*/DYT8 GENU

Kod 10 bolesnika vršeno je direktno sekvenciranje egzona 1 i 2 *PNKD* gena. Kod jednog pacijenta pokazano je postojanje c.26C>T mutacije (Slika 21). Mutacije c.20C>T i c.97G>C nisu pronađene ni kod jednog analiziranog bolesnika. Detaljniji podaci o pacijentu sa mutacijom nalaze se u Tabeli 24.



Slika 21. Elektroferogram na kome se vidi c.26C>T nukleotidna promena u sekvenci *PNKD* gena.

Tabela 24. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenom u sekvenci *PNKD* gena.

Bolesnik	1
Nukleotidna promena	c.26C>T
Pol	m
Starost (godine)	54
Pojava prvih simptoma (godine)	5
Porodična istorija	poz
Prvi simptom	paroksizmalni grčevi ruku i nogu
Klasifikacija distonije	paroksizmalna distonija
BFM skor	/

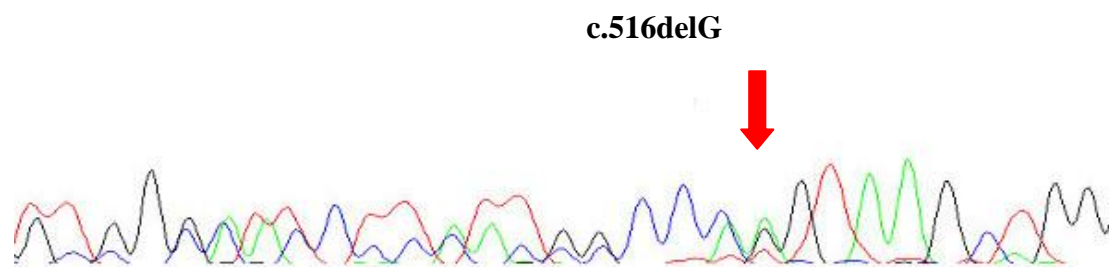
poz - pozitivan, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju

4.6. ANALIZA SEKVENCE *SLC2A1/DYT18* GENA

Direktno sekvenciranje egzona 1-10 *SLC2A1* gena izvršeno je kod ukupno 9 bolesnika i dva člana porodice. Kod jednog pacijenta pronađena je delecija od 1bp na granici između egzona i introna 4 koja dovodi do narušavanja konsenzus sekvence donorskog mesta za iskrajanje introna 4 (Tabela 25, Slika 22). Ova delecija nije pronađena kod roditelja bolesnika i do sada nije opisana u literaturi. Detaljniji podaci o pacijentu sa mutacijom nalaze se u Tabeli 26.

Tabela 25. Detektovane promene u kodirajućim/nekodirajućim regionima *SLC2A1* gena.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj porodica u kojima je detektovana mutacija	Ukupan broj nosilaca mutacije	Broj obolelih
c.516delG	patogena; 100%	egzon 4	1	1	1



Slika 22. Elektroferogram na kome se vidi c.516delG nukleotidna promena u sekvenci *SLC2A1* gena.

Tabela 26. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenom u sekvenci *SLC2A1* gena.

Bolesnik	1
Nukleotidna promena	c.516delG
Pol	m
Starost (godine)	31
Pojava prvih simptoma (godine)	4
Porodična istorija	neg
Prvi simptom	Nagli padovi
Klasifikacija distonije	G
BFM skor	29

neg - negativan, G - generalizovana, BFM- Burke-Fahn-Marsden skala za distoniju

U kodirajućim regionima *SLC2A1* gena detektovano je pet supstitucija koje ne dovode do promene aminokiselinske sekvence proteina, dok je u nekodirajućim regionima pronađena jedna jedna supstitucija u intronu 5 (Tabela 27).

Tabela 27. Sinonimne mutacije u kodirajućim i promene u nekodirajućim regionima *SLC2A1* gena, koje su u bazama podataka opisane kao polimorfizmi.

Nukleotidna promena	MutationTaster	Pozicija	Broj alela u kojima je detektovana supstitucija
c.27G>A	benigna; >70%	egzon 2	1
c.45C>T	benigna; >70%	egzon 2	2
c.399C>T	benigna; >70%	egzon 4	2
c.588G>A	benigna; >70%	egzon 5	2
c.679+7G>C	benigna; >70%	intron 5	1
c.1065A>G	benigna; >70%	egzon 8	1

5. DISKUSIJA

Do sada je identifikovano ukupno jedanaest gena u kojima mutacije mogu da dovedu do pojave primarne distonije. U ovoj studiji vršeno je testiranje bolesnika na prisustvo mutacija u šest gena za koje dosadašnji podaci u literaturi ukazuju da su najčešći uzročnici distonije. Svih šest analiziranih monogenских distonija se nasleđuju autozomno dominantno, pri čemu su dve forme distonije svrstavaju u čiste distonije (*TOR1A/DYT1* i *THAP1/DYT6*), dve pripadaju distonija-plus sindromima (*GCH1/DYT5a* i *SGCE/DYT11*) i dve pripadaju paroksizmalnim distonijama (*PNKD/MR-1/DYT8* i *SLC2A1/DYT18*).

5.1. DYT1

Testiranje na prisustvo karakteristične DYT1 mutacije (c.904_906delGAG; p.Glu302del), izvršeno je kod ukupno 397 bolesnika sa primarnom distonijom (226 žena i 171 muškarac) i 45 članova porodica. Kod 8 pacijenata (2%) pronađena je DYT1 mutacija. Ako se uzmu u obzir samo bolesnici sa ranim početkom bolesti (početak bolesti pre 30. godine života), ova učestalost raste na 5,9 %, što je nešto manje nego što je procenjeno u literaturi (16% to 53% bolesnika ne jevrejskog porekla sa ranim početkom bolesti) (Risch *et al.*, 1995; Bressman *et al.*, 1994; Valente *et al.*, 1998; Ikeuchi *et al.*, 1999; Bressman *et al.*, 2000; Zorzi *et al.*, 2002). Ova razlika može da se objasni širokim inkluzionim kriterijumom koji je primenjen pri regrutovanju pacijenata.

Od analiziranih 23 članova porodica bolesnika sa mutacijom detektovano je 9 nosilaca mutacije, od kojih je jedna osoba imala i simptome distonije. Od ukupno 9 obolelih, 5 bolesnika ima generalizovanu distoniju, 2 fokalnu distoniju (grafospazam) i po jedan bolesnik multifokalnu i segmentnu distoniju. Kod sedam pacijenata početak prvih simptoma je bio pre 30. godine, kod jednog bolesnika posle 30. godine, dok za jednog pacijenta nisu dostupni podaci. Samo u jednom slučaju postoji pozitivna porodična istorija bolesti, što je u skladu sa pokazanom smanjenom penetrabilnošću DYT1 mutacije.

U studiji Bressman i saradnika (2000) zapaženo je da se kod DYT1 distonije kasniji početak simptoma može susresti obično kod srodnika obolelih i da kod članova porodice sa

kasnijim početkom bolesti postoji tendencija da se distonija ispolji kao distonija ruke i to u formi grafospazma. U našoj studiji je postojao samo jedan bolesnik sa pozitivnom porodičnom istorijom, pri čemu je oboleli roditelj imao grafospazam kao jedini simptom, ali za razliku od opažanja Bressman i saradnika, početak simptoma kod ovog bolesnika bio je u detinjstvu. Takođe, u istoj studiji je navedeno da se specifičnost testiranja na DYT1 povećava, naročito u slučaju populacije Aškenazi Jevreja, ukoliko se primeni kriterijum početka simptoma na nekom od ekstremiteta pre 24. godine, ili zahvaćenost dva ili više ekstremiteta. Sedam od devet bolesnika sa mutacijom u našoj studiji imalo je početak bolesti pre 24. godine i zahvaćenost jednog ili dva ekstremiteta. Jedan pacijent je imao početak u 31. godini, ali dva zahvaćena ekstremiteta, dok za jednog bolesnika nisu bili dostupni podaci o prvim simptomima bolesti.

5.2. DYT6

Učestalost mutacija u kodirajućim regionima *THAP1* gena u ovoj studiji iznosi 1,5 % (5/328), što odgovara učestalosti koja je dobijena u drugim studijama (Djarmati *et al.*, 2009; Houlden *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010). Ovi podaci ukazuju da su mutacije u *THAP1* genu ipak manje učestale od mutacija u *TOR1A* genu, koje su najčešći uzrok primarne distonije.

5.2.1. Promene u kodirajućim regionim

THAP1 protein se karakteriše N-terminalnim THAP domenom (ak 1-81) koji ima DNK-vezujuća svojstva, prolin bogatim regionom (ak 90-110) i signalom za jedarnu lokalizaciju (NLS) (ak 146-162) koji se nalazi u okviru većeg coiled-coil domena (Clouaire *et al.*, 2005; Bessiere *et al.*, 2008). Više od 60% do sada opisanih mutacija u *THAP1* genu nalazi se u THAP domenu. U našoj studiji tri od četiri identifikovane mutacije nalazile su se u THAP domenu.

Transverzija c.62C>G u egzonu 1 *THAP1* gena na proteinskom nivou dovodi do zamene serina na poziciji 21 cisteinom (p.Ser21Cys) i do sada nije opisana u literaturi. Ova promena je detektovana kod dva sporadična slučaja generalizovane distonije ranog početka sa blagim tokom bolesti (Bolesnik 1 i Bolesnik 2; Tabela 18), kod asimptomatskih majki oba pacijenta i kod asimptomatske sestre prvog pacijenta. Za razliku od Bolesnika 1, kod koga su cervikalni i brahijalni region najviše zahvaćeni distonijom, kod Bolesnika 2 distonija je bila najizraženija na donjim ekstremitetima. Osim toga, kod Bolesnika 2 simptomi distonije su se značajno pogoršali nakon porođaja, što ide u prilog “second hit” hipoteze (Breakefield *et al.*, 2008). Iako ova dva bolesnika negiraju međusobno srodstvo, treba istaći da oboje potiču iz istog regiona Srbije. *In silico* analiza pomoću MutationTaster softvera predvidela je da je p.Ser21Cys promena patogena sa verovatnoćom većom od 90%. U prilog patogenosti ove mutacije ide i podatak da je u studiji Bressman i saradnika (2009), kod porodice sa dva obolela člana, opisana mutacija koja pogađa istu aminokiselinsku reziduu (p.Ser21Thr). Takođe, pokazano je da p.Ser21Thr mutacija u THAP domenu dovodi do narušavanja THAP1/*TORIA* interakcije *in vivo* (Gavarini *et al.*, 2010). Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da je p.Ser21Cys promena verovatno patogena.

U *THAP1* genu detektovana je još jedna promena u sekvenci koja do sada nije opisana u literaturi. U egzonu 2 kod jednog bolesnika i kod dva asimptomatska člana porodice pronađena je duplikacija c.109_132dup (p.Glu37_Asn44dup) (Bolesnik 4; Tabela 18). Kod ovog pacijenta distonija je počela u detinjstvu, prvi simptom je bio tortikolis, zatim se javila spazmodična disfonija, a vremenom je došlo do prelaska distonije u generalizovanu formu. Navedena duplikacija, bez promene okvira čitanja, dovodi do insercije 8 aminokiselina u THAP DNK vezujućem domenu THAP1 proteina. Rezidue koje su duplicirane učestvuju u formiranju strukture petlja (L2: Phe25-Lys32)-heliks (H1: Cys33-Val40)-petlja (L3: Arg41-Ser51) (Bessiere *et al.*, 2008). H1 α -heliks ima ključnu ulogu u održavanju trodimenzionalne strukture THAP domena (Clouaire *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2011), ukazujući da je moguće da bi duplikacija p.Glu37_Asn44dup mogla biti patogena.

Promena u sekvenci THAP1 gena c.85C>T (p.Arg29Ter) takođe je detektovana u egzonu 2 i dovodi do prevremene terminacije sinteze proteina. Ova promena je detektovana

kod bolesnika sa segmentnom, cerviko-laringealnom distonijom sa kasnim početkom (Bolesnik 3; Tabela 18). Ista ova promena je detektovana u porodici sa pozitivnom istorijom distonije u tri generacije (Bressman *et al.*, 2009). Osim toga, na istoj rezidui prijavljene su još dve različite missense mutacije (Bressman *et al.*, 2009, Paisan-Ruiz *et al.*, 2009). Četiri nezavisna mutaciona događaja na rezidui 29, opisana u različitim populacijama, ukazuju na to da bi se ova pozicija mogla smatrati potencijalnim mutacionim „hotspot“ mestom. Predikcija patogenosti MutationTaster softverom predviđa da je varijacija p.Arg29Ter patogena sa verovatnoćom većom od 99%, što sa gorenavedenim podacima ide u prilog zaključka da je p.Arg29Ter promena vrlo verovatno patogena.

Četvrta promena koja je detektovana u kodirajućem regionu *THAP1* gena je tranzicija c.496G>T (p.Ala166Ser) u egzonu 3 i koja pogađa coiled-coil domen THAP1 proteina. Bolesnik kod koga je pronađena ova promena ima multifokalnu distoniju ranog početka koja zahvata obe ruke, bez promena u govoru (Bolesnik 5; Tabela 18). Treba napomenuti da kod ovog pacijenta postoje i mioklonički trzaji na obe ruke, zbog čega je testiran na prisustvo mutacija u *SGCE* genu. Mutacije u *SGCE* genu nisu detektovane ni direktnim sekvenciranjem ni MLPA metodom. Mutacija na istoj poziciji (c.496G>A (p.Ala166Thr)) je pronađena u studiji Xiao i saradnika (2010) kod bolesnika sa početkom bolesti u 66. godini života kod koga je, za razliku od našeg pacijenta, u kliničkoj slici opisana samo laringealna distonija. *In silico* analiza MutationTaster softverom predvidela je da je p.Ala166Ser promena benigna sa vrovatnoćom većom od 50%. Međutim, pokazano je da je coiled-coil domen važan za auto-dimerizaciju THAP1 proteina, pri čemu je 13 aminokiselina na pozicijama od 154 do 166 ključno za ovaj proces (Sengel *et al.*, 2011). Uzevši u obzir ove navedene podatke, p.Ala166Ser promena se može smatrati kao moguće patogena.

5.2.2. Promene u nekodirajućim regionima

Osim promena u kodirajućim regionima *THAP1* gena, i u nekodirajućim regionima su detektovane 4 nukleotidne promene. Tri od ove četiri promene su već opisane u literaturi (c.-237_-236GA>TT, c.71+126T>C, c.268-87A>G) (Djarmati *et al.*, 2009; Houlden *et al.*,

2010; Kamm *et al.*, 2011) i njihove učestalosti u populaciji bolesnika nisu se značajno razlikovale od učestalosti u kontrolnoj populaciji ($p > 0.05$ za svaku od tri navedene varijacije). Najviše polemike se vodilo oko značaja -237_-236GA>TT supstitucije, pošto je u prvoj studiji gde je detektovana (Djarmati *et al.*, 2009) postojala statistički značajna veća učestalosti ove promene kod bolesnika u odnosu na kontrolnu populaciju. S obzirom da ova promena pogađa prva dva nukleotida iRNK moglo bi se pretpostaviti da utiče na regulaciju transkripcije ili efikasnost translacije ili da utiče na stabilnost iRNK. Međutim, kasnije je većina studija pokazala (Groen *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Lohman *et al.*, 2012) da frekvencija jeste veća kod bolesnika u odnosu na kontrole, ali nije statistički značajna. Predikcija MutationTaster softverom nije bila moguća za -237_-236GA>TT supstituciju, pošto se nalazi izvan *THAPI* sekvence koja postoji u bazi softvera. Za c.71+126T>C i c.268-87A>G supstitucije predikcija je dala verovatnoću veću od 70% da se radi o benignom polimorfizmu.

U 5'UTR regionu *THAPI* gena pronađena je i jedna, do sada u literaturi neopisana, supstitucija (c.-220C>T). Ova promena je detektovana kod dva nesrodna bolesnika. Prvi bolesnik ima segmentnu distoniju ranog početka (Bolesnik 6; Tabela 18), dok se kod drugog pacijenta javila fokalna spazmodična disfonija kasnog početka (Bolesnik 7; Tabela 18). *In silico* analiza MutationTaster softverom je predvidela sa verovatnoćom većom od 80% da se radi o patogenoj promeni. Međutim, da bi se potencijalni patogeni efekat ove tranzicije definitivno dokazao neophodne su funkcionalne analize.

5.2.3. Genotip-fenotip korelacije

U literaturi do sada nije pokazano postojanje konzistentne korelacije između genotipa i fenotipa kod bolesnika sa DYT6 mutacijom (Fuchs *et al.*, 2009; Bressman *et al.*, 2009; Djarmati *et al.*, 2009; Bonetti *et al.*, 2009; Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Houlden *et al.*, 2010; De Carvalho Aguiar *et al.*, 2010; Clot *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Zittel *et al.*, 2010; Groen *et al.*, 2010; Söhn *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010; Jech *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011), pa tako pacijenti koji nose istu mutaciju mogu da se razlikuju u godinama početka bolesti i/ili anatomskoj distribuciji simptoma. Godine pojave prvih simptoma kod

bolesnika opisanih u ovoj studiji koji su imali promene u kodirajućim regionima *THAP1* sekvence su bile između 7 i 36 godina (srednja vrednost: 14,8 godina). Ako se uključe i pacijenti sa promenom u 5'UTR regionu za koju je softverski dobijena predikcija da je patogena (c.-220C>T), ovaj opseg je od 7 do 41 godine (srednja vrednost: 20,1 godina). Navedene vrednosti su u skladu sa podacima iz literature.

Prema dostupnim podacima, rani početak simptoma kod DYT6 bolesnika je izgleda povezan sa mutacijama u N-terminalnom THAP domenu i C-terminalnoj NLS sekvenci, dok je kasni početak u vezi sa mutacijama u C-terminalnom domenu, izuzev NLS sekvence (Fuchs *et al.*, 2009; Bressman *et al.*, 2009; Djarmati *et al.*, 2009; Bonetti *et al.*, 2009; Paisan-Ruiz *et al.*, 2009; Houlden *et al.*, 2010; De Carvalho Aguiar *et al.*, 2010; Clot *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Zittel *et al.*, 2010; Groen *et al.*, 2010; Sohn *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010; Jech *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011). Međutim, u prilog nepostojanja jasne genotip-fenotip korelacije, u ovoj studiji je detektovana mutacija u THAP domenu kod bolesnika sa kasnim početkom (Bolesnik 3; Tabela 18), kao i mutacija u C-terminalnom domenu van NLS sekvence kod pacijenta sa ranim početkom bolesti (Bolesnik 5; Tabela 18). Sa druge strane, u skladu drugim studijama (Bressman *et al.*, 2009; Djarmati *et al.*, 2009; Bonetti *et al.*, 2009; Houlden *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Sohn *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010; Blanchard *et al.*, 2011) prvi simptomi distonije su zahvatili gornje ekstremitete kod 2 bolesnika, cervikalni region kod 2 bolesnika, kranijalni region kod 2 bolesnika i gornje ekstremitete i vrat istovremeno kod jednog pacijenta. Distonija se generalizovala kod 3 bolesnika sa ranim početkom bolesti (Bolesnici 1, 2 i 4; Tabela 18). Problemi sa govorom su postojali kod 3 pacijenta, što je u skladu sa tezom da, iako su laringealna distonija ili problemi sa govorom česti kod DYT6 bolesnika, oni nisu obavezan deo DYT6 fenotipa (Bressman *et al.*, 2009; Djarmati *et al.*, 2009; Bonetti *et al.*, 2009).

5.3. DYT5a

Učestalost mutacija u *GCHI* genu u ovoj studiji iznosi 28,1% (9/32). U literaturi, mutacije u *GCHI* genu su detektovane kod 20% - 87% bolesnika u zavisnosti od rigoroznosti primenjenog inkluzionog kriterijuma (Segawa *et al.*, 2003; Ichinose *et al.*,

1994; Furukawa, 2003; Furukawa and Kish, 1999; Steinberger *et al.*, 2000). Detektovano je pet različitih mutacija, pri čemu su mutacije po tipu bile: missense mutacije, mala delecija, velika delecija i splice site mutacija, što reflektuje različit spektar tipova mutacija u *GCHI* genu koji je opisan u literaturi.

5.3.1. Promene u kodirajućim regionim

Do sada je u *GCHI* genu opisano više od 150 mutacija koje se nalaze duž svih 6 egzona uključujući i mesta za iskrajanje egzona. Pri čemu, nešto više od 7% opisanih mutacija su velike delecije koje obuhvataju cele egzone, više egzona ili čitav *GCHI* gen (www.hgmd.org).

Velika delecija koja je obuhvatila prvi egzon i region ispred prvog egzona detektovana je kod sporadičnog bolesnika sa ranim početkom bolesti i generalizovanom distonijom (Bolesnik 1, Tabela 20). Delecija prvog egzona je već opisivana kod pacijenata sa DRD distonijom. Klein i saradnici (2002b) su opisali bolesnika kod koga je bio deletiran samo prvi egzon (početak bolesti u 6. godini na donjim ekstremitetima) i jednog bolesnika sa delecijom od egzona 1 do 3 (početak bolesti u 8. godini, stopalo). Hagenah i saradnici (2005) su opisali dve porodice sa gubitkom prvog egzona, pri čemu je u jednoj postojao gubitak egzona od 1 do 4, a u drugoj svih šest egzona. Oba bolesnika imala su rani početak bolesti (12 g. i 5 g.) sa početkom na gornjim i donjim, odnosno samo na donjim ekstremitetima. U našoj studiji delecija je detektovana MLPA metodom, pri čemu je delecija uočena na dve probe. Prva proba se nalazila na poziciji c.-337_ -361, a druga na poziciji c.187_ 211 u egzonu 1, tako da je obuhvaćen i proksimalni promotorski region *GCHI* gena. MutationTaster softverom nije moguće analizirati delecije/insercije veće od 12 bp, ali s obzirom na poziciju ove delecije, može se zaključiti da je narušena transkripcija/translacija ovog alela i da se vrlo verovatno radi o patogenoj promeni koja dovodi do haploinsuficijencije *GCHI* proteina.

U prvom egzonu detektovana je i mala delecija od 1 bp (c.228delG), koja do sada nije opisana u literaturi. Promena je detektovana kod pacijenta sa ranim početkom bolesti (Bolesnik 3, Tabela 20), kod sestre, majke i bake po majci bolesnika. Od članova porodice

kod kojih je detektovana mutacija, simptome distonije imali su sestra (Bolesnik 4, Tabela 20) i baka (Bolesnik 5, Tabela 20) probanda. Ova delecija dovodi do promene okvira čitanja i do formiranja prevremenog STOP kodona na poziciji 79 (p.Ser77Profs*3). Odnosno, proteinski produkt sa mutiranog alela je dugačak samo 79 amino kiselina i nedostajeće mu kompaktni C-terminalni domen proteina (95-217 ak) koji sadrži regione ključne za oligomerizaciju i katalitičku aktivnost GCH1 proteina (Nar *et al.*, 1995; Auerbach *et al.*, 2000). Slična promena u sekvenci, gde dolazi do terminacije sinteze proteina na poziciji 75, opisana je u porodici sa dva obolela člana (Steinberg *et al.*, 2000). Predikcija patogenosti MutationTaster softverom predviđa da je varijacija p.Ser76Serfs*3 patogena sa verovatnoćom od 100%, što sa gorenavedenim podacima ide u prilog zaključka da je vrlo verovatno da se radi o patogenoj promeni sekvence.

Još jedna promena detektovana u prvom egzonu *GCH1* gena je tranzicija c.68C>T koja na proteinskom nivou dovodi do zamene prolina na poziciji 23 leucinom (p.Pro23Leu). Bolesnik kod koga je detektovana ova promena ima generalizovanu distoniju sa početkom prvih simptoma u 30. godini. Ova promena je do sada u literaturi opisana u deset porodica (Jarman *et al.*, 1997a; de la Fuente-Fernandez 1997; Steinberger *et al.*, 2000; Scola *et al.*, 2007; Zirn *et al.*, 2008b; Clot *et al.*, 2009), od toga su u 7 slučajeva bolesnici imali status kombinovanog heterozigota, odnosno pored p.Pro23Leu mutacije nosili su i još jednu mutaciju u *GCH1* genu. Učestalost ove mutacije u kontrolnoj populaciji bila je 0/200 hromozoma (Zirn *et al.*, 2008b) 1/210 hromozoma (Jarman *et al.*, 1997), odnosno 1/174 hromozoma (Clot *et al.*, 2009). U projektu „1000 Genomes“ (dbSNP v135) detektovano je 5/2178 hromozoma koji su nosili c.68C>T supstituciju. U našoj studiji ni kod jednog od 202 analizira kontrolna hromozoma nije detektovana navedena supstitucija, ali nije postojala statistička značajnost u učestalosti ove supstitucije između grupe bolesnika i kontrolne grupe ($p > 0.05$). *In silico* analiza PolyPhen softverom (Clot *et al.*, 2009) predviđa da se radi o benignoj promeni. Takođe, MutationTaster softverom je predviđeno da se sa verovatnoćom većom od 99% radi o benignom polimorfizmu. Svakako, potrebne su funkcionalne analize da bi se sa sigurnošću utvrdilo da li se ovde radi o retkom polimorfizmu, o promeni koja, s obzirom na veliki broj opisanih kombinovanih heterozigota, u konjukciji sa drugim mutacijama dovodi do oboljevanja ili o potencijalnom

predisponirajućem faktoru koji u sadejstvu sa nekim drugim genetskim ili negenetskim faktorima može da dovede do oboljenja.

U egzonu 3 *GCHI* gena detektovana je tranzicija c.470T>C u koja, koja takođe nije opisana u literaturi, a na proteinskom nivou dovodi do zamene leucina na poziciji 157 prolinom (p.Leu157Pro). Ova promena je detektovana kod tri bolesnika iz jedne porodice (Bolesnici 6, 7 i 8, Tabela 20). Sva tri pacijenta su imala rani početak bolesti, pri čemu se kod dva bolesnika radi o generalizovanoj distoniji, dok je kod jednog distonija fokalna. Asimptomatski članovi porodice nisu bili dostupni za analizu. *In silico* analiza pomoću MutationTaster softvera predvidela je da je p.Leu157Pro promena patogena sa verovatnoćom većom od 99%. Uzevši u obzir i da je Leu157 konzervisana rezidua koja se nalazi između dve striktno konzervisane rezidue (Tyr156 i Pro158) koje su od aktivnog mesta proteina udaljene manje od 10Å^o (Auerbach *et al.*, 2000), kao i osobenost prolina da u proteinskom lancu formira oštre zaokrete, odnosno da njegovo umetanje u lanac najčešće dovodi do strukturne promene proteina, može se zaključiti da je vrlo verovatno da je promena p.Leu157Pro patogena.

5.3.2. Promene u nekodirajućim regionima

Pored opisanih promena u kodirajućim regionima *GCHI* gena, i u nekodirajućim regionima detektovana je jedna nukleotidna promena. Tranzicija c.626+1G>A pogađa prvi nukleotid introna 5 *GCHI* gena i narušava sekvencu donorskog mesta za iskrajanje introna. Navedena promena opisana je kod bolesnika sa generalizovanom distonijom i ranim početkom bolesti (Bolesnik 7, Tabela 20). U literaturi je ova promena opisana kod još ukupno tri pacijenta. Prvi opisani bolesnik je imao početak simptoma u 11. godini života, na stopalu (Hirano *et al.*, 1998). Ova grupa autora je pokazala da opisana mutacija dovodi do formiranja iRNK bez egzona 5. Protein koji se sintetiše je dugačak 180 ak, s tim što je aminokiselinska sekvenca posle mesta spajanja egzona 4 i 6 izmenjena. Kada je mutirani protein eksprimiran u COS-7 ćelijama, utvrđeno je da on nema enzimsku aktivnost. U literaturi su prijavljena još dva bolesnika sa istom mutacijom (početak simptoma u 3. godini i početak simptoma u 4.godini sa distonijom stopala) (Skrygan *et al.*, 2001; Ohta *et*

al., 2006), pri čemu je kod njih, kao dokaz patogenosti uočene promene, pokazana niska koncentracija neopterina i biopterina u kulturi fibroblasta, odnosno u cerebrospinalnoj tečnosti. Ovo je praktično i *in vivo* pokazalo da ova mutacija značajno narušava funkciju GCH1 enzima. Predikcija patogenosti MutationTaster softverom predviđa da je supstitucija c.626+1G>A patogena sa verovatnoćom većom od 99%, što sa gorenavedenim podacima iz funkcionalne studije i biohemijske analize, ide u prilog zaključka da se radi o patogenoj promeni.

5.3.3. Genotip-fenotip korelacije

Za distoniju DYT5a do sada u literaturi, kao ni za distoniju DYT6, nije pokazano postojanje konzistentne korelacije između genotipa i fenotipa. Tačnije, opisuje se postojanje široke inter- i intrafamilijarne varijabilnosti u ekspresiji kod nosilaca mutacija u *GCH1* genu (Nygaard *et al.*, 1993a; Bandmann *et al.*, 1998; Steinberger *et al.*, 1998; Tassin *et al.*, 2000; Grimes *et al.*, 2002b; Klein *et al.*, 2002b; Uncini *et al.* 2004; Furukawa *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Trender-Gerhard *et al.*, 2009; Ling *et al.* 2011).

Godine pojave prvih simptoma kod bolesnika opisanih u ovoj studiji koji su imali promene u *GCH1* genu za koje se može tvrditi da su patogene, su bile između 7 i 13 godina (srednja vrednost: 10,3 godina), pri čemu za dva pacijenta ne postoji podatak o tačnim godinama početka bolesti, nego je navedeno da je početak bio u ranom detinjstvu. Ako se uključi i bolesnik sa promenom p.Pro23Leu, za koje se ne može sa sigurnošću tvrditi da je patogena, ovaj opseg je od 7 do 30 godine (srednja vrednost: 13,1 godina). Navedene vrednosti su u skladu sa podacima iz literature. Takođe, u skladu sa podacima iz literature, svi bolesnici sa mutacijom u *GCH1* genu su imali rani početak bolesti i kod 6 od 9 pacijenata distonija se generalizovala. Kao što je do sada opisivano u literaturi (Clot *et al.*, 2009), i u našoj studiji bolesnici sa *GCH1* mutacijama su imali tipičnu kliničku sliku čiste distonije, početkom na donjim ekstremitetima (svi osim jednog) i sa odličnim odgovorom na male doze L-dopa. Među bolesnicima sa mutacijom bilo je 6 osoba ženskog pola (ako se uključi i bolesnik sa promenom p.Pro23Leu, bilo je 7 osoba ženskog pola) i 2 osobe muškog pola, što je u skladu sa podacima da je u DYT5a distoniji penetrabilnost oko 2,5

puta veća kod žena nego kod muškaraca (Furukawa *et al.*, 1998; Segawa *et al.*, 2003). Intrafamilijarna varijabilnost u kliničkoj slici DYT5a može se sagledati na primeru porodice sa c.228delG mutacijom, gde se distonija javila sa ranim početkom kod svih obolelih, ali kod Bolesnika 3 radilo se o generalizovanoj distoniji, kod Bolesnika 4 o fokalnoj distoniji noge, dok je kod Bolesnika 5 distonija bila fokalna i zahvatala je samo stopalo (Tabela 20). Ova porodica, gde su 3 od 4 člana sa mutacijom obolela, je primer i visoke penetrabilnosti DYT5a mutacije koja se opisuje u literaturi (Steinberger *et al.*, 1998).

U ovoj studiji 3 bolesnika su bili sporadični slučajevi međutim, pošto ostali članovi porodice nisu bili dostupni za analizu, nije bilo moguće utvrditi da li se ovde radilo o *de novo* mutacijama ili samo o smanjenoj penetrabilnosti mutacije.

5.4. DYT11

U ovoj studiji učestalost mutacija u kodirajućim regionima *SGCE* gena iznosi 4,4% (2/45), što je dosta manje od učestalosti očekivane na osnovu podataka dobijenih iz drugih studija. Naime, mutacije ili delecije u *SGCE* genu se detektuju u 26% do 40% bolesnika sa tipičnim fenotipom (Valente *et al.*, 2005; Schüle *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2003; Grünwald *et al.*, 2008; Tezenas du Montcel *et al.*, 2006). Ova smanjena učestalost mutacija može se objasniti pre svega širokim inkluzionim kriterijumom, ali sa druge strane treba imati na umu i verovatnu genetsku heterogenost ovog oboljenja.

5.4.1. Promene u kodirajućim regionima

Epsilon-sarkoglikan se karakteriše N-terminalnom hidrofobnom signalnom sekvencom (1-46 ak), zatim sledi ekstracelularni domen (47-316 ak), pa hidrofobni transmembranski region (317-339 ak) i na kraju C-terminalni intracelularni domen (339-437 ak) (www.dmd.nl). U oko 95% slučajeva opisane mutacije se nalaze u egzonima 1 – 7 koji kodiraju za ekstracelularni domen proteina, dok se u preostalih 5% nalaze u egzonu 9. Opisivane mutacije su po tipu: tačkaste mutacije, male delecije/insercije i velike delecije

(parcijalne ili delecije čitavog gena). U našoj studiji detektovana je jedna tačkasta mutacija i jedna mala delecija, pri čemu su obe pogadale ekstracelularni domenu proteina. Velike delecije nisu detektovane.

Tranzicija c.709C>T u egzonu 6 *SGCE* gena na proteinskom nivou dovodi do zamene arginina na poziciji 237 STOP kodonom (p.Arg237Ter), odnosno dovodi do prevremene terminacije sinteze proteina. Ova promena je detektovana kod sporadičnog slučaja miokloničke distonije ranog početka (Bolesnik 1, Tabela 22). Roditelji bolesnika bili su asimptomatski, ali ni oni niti iko drugi od članova porodice nije bio dostupan za analizu, tako da nije bilo moguće utvrditi da li se radi o *de novo* mutaciji. U literaturi je promena p.Arg237Ter već opisana kod bolesnika sa mioklonusom, distonijom i povoljnim odgovorom na alkohol. Početak bolesti je bio vrlo rano, naime, majka je još u trudnoći opisala neuobičajene trzaje fetusa (Grünwald *et al.*, 2008). *In silico* analiza pomoću MutationTaster softvera predvidela je da je p.Arg237Ter promena patogena sa verovatnoćom većom od 99%, što sa gorenavedenim podacima iz literature ide u prilog zaključka da je p.Arg237Ter promena vrlo verovatno patogena.

Druga promena detektovana u kodirajućim regionima *SGCE* gena je delecija 1 bp u egzonu 7, c.966delT, koja na proteinskom nivou dovodi do promene okvira čitanja i formiranja prevremenog STOP kodona na poziciji 333 (p.Val323Cysfs*11). Ova promena detektovana je kod bolesnika koji je imao rani početak bolesti, laterokolis i miokloničke simptome na gornjim ekstremitetima i glavi, i koji koji potiče iz porodice u kojoj kod još 5 članova postoji klinička slika miokloničke distonije (Bolesnik 2, Tabela 22). Ova porodica je u sklopu saradnje sa laboratorijama u inostranstvu već prikazna u literaturi (Schüle *et al.*, 2004). U okviru ove studije bolesnik je bio uključen u grupu pacijenata sa miokloničkom distonijom, pa je u ovoj studiji samo potvrđeno postojanje već detektovane mutacije. Osim ovog bolesnika, u literaturi ne postoje opisani drugi slučajevi sa istom mutacijom. Analiza MutationTaster softverom predvidela je da se sa verovatnoćom od 100% radi o patogenoj mutaciji. Uzevši u obzir pozitivnu porodičnu istoriju i softversku predikciju, može se zaključiti da je promena (p.Val323Cysfs*11) vrlo verovatno patogena.

U egzonu 10, koji se alternativno iskraja, detektovane su tri supstitucije koje su već opisane kao polimorfizmi u literaturi (c.1294 A>C, c.1295G>A, c.1297 G>A) (Tezenas *et al.*, 2006) i u bazama podataka (dbSNP v135 i <http://www.dmd.nl>). Osim toga, i predikcija

MutationTaster softverom je dala verovatnoću veću od 99% da se radi o benignim promenama.

5.4.2. Promene u nekodirajućim regionima

Osim promena u kodirajućim regionima *SGCE* gena, detektovane su i 3 nukleotidne promene u nekodirajućim regionima. Dve promene se nalaze u intronu 3 (c.390+64insGT i c.391-43A>C), a jedna se nalazi u 3'UTR regionu (c.*101A>G). Promena c.390+64insGT nije opisana u bazi podataka (dbSNP v135), dok su preostale dve promene opisane kao polimorfizmi. MutationTaster softverom je dobijeno, za svaku od navedenih promena, da je verovatnoća da se radi o benignim promenama veća od 70%.

5.4.3. Genotip-fenotip korelacije

Kod bolesnika sa mutacijama u *SGCE* genu nije opisano postojanje korelacije između genotipa i fenotipa, osim kod bolesnika sa velikim delecijama koje obuhvataju i susedne gene, pa nedostatak funkcije tih gena dovodi do sličnog fenotipa. Za tri različite *SGCE* missense mutacije je pokazano da mutirani proteini podležu poliubikvitinaciji i da se brzo degraduju u proteazomima, odnosno da ni ne stižu do ćelijske membrane gde bi normalno trebalo da se nalaze (Esapa *et al.*, 2007). Ovo ukazuje da (skoro) sve mutacije u *SGCE* genu imaju za posledicu potpuni gubitak funkcije proteina, pa zato i nije iznenađujuće da ne postoji genotip - fenotip korelacija za mutacije u *SGCE* genu.

Skoro 80% mutacija u *SGCE* genu dovodi do prevremene terminacije sinteze proteina pre ili u okviru *SGCE* transmembranskog domena proteina. Jedna mutacija identifikovana u ovoj studiji uzrokuje formiranje prevremenog STOP kodona pre *SGCE* transmembranskog domena (p.Arg237Ter), a druga u transmembranskom domenu.

U skladu sa podacima iz literature (sumirano u Grünwald *et al.*, 2008) kod oba bolesnika opisana u ovoj studiji prvi simptomi su počeli u detinjstvu (2 godine, odnosno 9 godina) i imaju kliničku sliku tipičnu za distoniju DYT11.

Pokazano je da *SGCE* gen podleže maternalnom imprintingu sa retkim slučajevima izuzetka (Müller *et al.*, 2002; Grabowski *et al.*, 2003). Međutim, u našoj studiji ni kod jednog bolesnika ni roditelji ni drugi članovi porodice nisu bili dostupni za analizu, tako da nije bilo moguće analizirati šemu nasleđivanja mutacija.

5.5. DYT8

U literaturi do sada su opisane samo tri mutacije, sve u *PNKD* genu, koje se dovode u vezu sa distonijom DYT8 (c.20C>T, c.26C>T i c.97G>C). Stoga je u našoj studiji vršena ciljana detekcija ovih mutacija i kod 1 od 10 testiranih bolesnika (10%) pronađena je mutacija.

5.5.1. Promene u kodirajućim regionima

Supstitucija c.26C>T (p. Ala9Val) za koju se predviđa da narušava strukturu N-terminalnog α heliksa PNKD proteina (Rainier *et al.*, 2004) pronađena je kod bolesnika sa početom prvih simptoma u ranom detinjstvu i kliničkom slikom tipičnom za distoniju DYT8 (epizode distonije su se javljale 2-3 puta nedeljno i trajale 1-2h). Među članovima porodice, prema navodima bolesnika, ima još barem 5 članova sa simptomima distonije DYT8, ali oni nisu bili dostupni za analizu. Ova mutacija je opisana još u nekoliko porodica različitog porekla (Rainier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Bruno *et al.*, 2007). Među opisanim obolelim članovi nisu uočene značajne razlike u fenotipu. Jedan bolesnik sa p.Ala9Val mutacijom opisan u literaturi (Djarmati *et al.*, 2005) bio je iz Srbije, ali nije utvrđeno da li postoji zajednički predak između tog i bolesnika opisanog u ovoj studiji ili je mutacija u ovim porodicama nezavisno nastala.

5.5.2. Genotip-fenotip korelacije

Bolesnik kod koga je detektovana p.Ala9Val mutacija ima tipičnu kliničku sliku distonije DYT8. Pošto niko od članova porodice nije bio dostupan za analizu, nije bilo moguće proučiti eventualnu intrafamilijarnu varijabilnost fenotipa, kao ni penetrabilnost mutacije.

Svakako, do sadašnji podaci u literaturi pokazuju da nema značajne razlike u fenotipu ni kod bolesnika sa istom ni sa različitim mutacijama u *PNKD* genu (Rainier *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Bruno *et al.*, 2007; Ghezzi *et al.*, 2009).

5.6. DYT18

Analizom svih 10 kodirajućih egzona *SLC2A1* gena, kao i sekvenci introna neposredno uz egzone, kod 1 bolesnika od ukupno 9 analiziranih (11%) otkrivena je mutacija.

5.6.1. Promene u kodirajućim regionima

Na granici između egzona i introna 4 detektovana je delecija od 1 bp (c.516delG) koja dovodi do narušavanja konsenzus sekvence donorskog mesta za iskrajanje introna 4 i koja do sada nije opisana u literaturi. Ova promena je pronađena kod sporadičnog bolesnika sa ranim početkom bolesti i karakterističnim epizodama distonije posle napora. Pošto kod roditelja bolesnika nije detektovana navedena promena, može se reći da se radi o *de novo* mutaciji. Analizom MutationTaster softverom za ovu promenu je predviđeno da se radi o patogenoj promeni sa verovatnoćom od 100%. Uzevši u obzir rezultate softverske predikcije i činjenicu da ova mutacija svakako narušava strukturu H5 transmembranskog domena koji učestvuje u formiranju proteinske pore (Salas-Burgos *et al.*, 2004) i od ključnog je značaja za transportnu funkciju proteina, može se zaključiti da se vrlo verovatno radi o patogenoj promeni.

U kodirajućim regionima *SLC2A1* gena detektovano je i pet supstitucija koje ne dovode do promene aminokiselinske sekvence proteina. to su: c.27G>A (p.Thr9Thr) i c.45C>T (p.Ala15Ala) u egzonu 2, c.399C>T (p.Cys133Cys) u egzonu 4, c.588G>A (p.Pro196Pro) u egzonu 5 i c.1065A>G (p.Leu355Leu) u egzonu 8. Sve ove promene su u bazi podataka (dbSNP v135) označene kao polimorfizmi i MutationTaster softver je za svaku predvideo da se radi o benignoj promeni sa verovatnoćom većom od 70%.

5.6.2. Promene u nekodirajućim regionima

U nekodirajućim regionima *SLC2A1* gena pronađena je jedna supstitucija u intronu 5, c.679+7G>C. Analiza MutationTaster softverom je dala predikciju da se radi o polimorfizmu sekvence sa verovatnoćom većom od 70%. Ova promena je i u bazi podataka (dbSNP v135) označena kao polimorfizam, pri čemu se kod čoveka osim G i C alela na ovoj poziciji može javiti i T alel.

5.6.3. Genotip-fenotip korelacije

Mutacije u *SLC2A1* genu pokazuju visok stepen fenotipske varijabilnosti. Naime, osim paroksizmalne distonije izazvane naporom *SLC2A1* mutacije mogu da uzrokuju i sindrom deficijencije glukoznog transportera (GLUT1-DS), koji je prvi i bio povezan sa mutacijama u ovom genu. Fenotip bolesnika može da varira od najtežeg kod GLUT1-DS do najbenignijeg u okviru čiste DYT18 distonije. Smatra se da je osnovni uzrok variranja težine fenotipa efekat date mutacije na protein. Tako bi mutacije koje dovode do potpunog gubitka proteina ili do gubitka njegove funkcije rezultovle teškim fenotipom, a one koje bi omogućavale parcijalno funkcionisanje proteina dovodile do blaže kliničke slike. Međutim, osim ovog upečatljivog variranja kliničke slike između dva sindroma za različite mutacije, opisana je i inter- i intrafamilijarnu heterogenosti fenotipa kod nosilaca iste mutacije (Weber *et al.*, 2008; Klepper and Leiendecker, 2007), tako da svakako osim efekta mutacije na protein postoje i drugi faktori koji određuju fenotip (Schneider *et al.*, 2009).

5.7. ŠEMA ZA GENETSKO TESTIRANJE

Do sada je okarakterisano najmanje dvadeset monogenских distonija (lokusi DYT 1–DYT21; gde je DYT14=DYT5a (Wider *et al.*, 2008) i DYT9=DYT18 (Weber *et al.*, 2011)), od kojih je za jedanaest identifikovan i gen koji je odgovoran za pojavu bolesti (*TOR1A/DYT1*, *GCH1/DYT5a*, *THAP1/DYT6*, *PNKD/MR-1/DYT8*, *PRRT2/DYT10*, *SGCE/DYT11*, *ATPIA3/DYT12*, *SLC2A1/DYT18*, *TH/DYT5b* i *PRKRA/DYT16*, *TAF1/DYT3*) (Brüggemann and Klein 2010; Norgren *et al.*, 2011). Osim toga, nedavno su u literaturi opisana još dva gena koji bi mogli biti povezani sa distonijom. Mutacija u *GLUDI* genu je pronađena kod bolesnika sa generalizovanom distonijom (Miyamoto *et al.*, 2012), dok su mutacije u *CIZ1* genu pronađene kod bolesnika sa primarnom cervikalnom distonijom (Xiao *et al.*, 2012). Bez obzira na otkriće ovako velikog broja gena vezanih za distoniju, kod najvećeg broja pacijenata genetska osnova oboljenja ostaje nepoznata.

U savremenoj kliničkoj praksi postoji potreba za brzom i ekonomičnom procedurom genetske dijagnostike. U tom smislu često se prave šeme dijagnostičkih procedura, barem za češće tipove distonija. Na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da se u našoj populaciji može primeniti šema predložena od strane Müller-a (Müller, 2009) sa manjim izmenama (Slika 23). Nakon prvog koraka, gde se na osnovu kliničke procene fenotipa razdvajaju čiste distonije od distonija-plus sindroma i paroksizmalnih distonija, svi bolesnici sa čistom distonijom bi trebalo da se testiraju na prisustvo GAG delecije u *TOR1A* genu, pošto je distonija DYT1 najčešći tip monogenских čistih distonija. Testiranje na DYT1 je posebno indikativno ako bolesnik ima rani početak bolesti, početak simptoma na ekstremitetima i brzu generalizaciju simptoma. Druga po učestalosti monogenška čista distonija je distonija DYT6, tako da ako je bolesnik negativan na DYT1, sledeći korak bi trebalo da bude sekvenciranje kodirajućih regiona *THAP1* gena. Ukoliko su kod bolesnika prvi simptomi počeli u kranio-cervikalnom regionu ili na gornjim ekstremitetima, predlaže se da se prvo izvrši testiranje na distoniju DYT6. Na osnovu rezultata Xiao i saradnika (Xiao *et al.*, 2012), može se predložiti da se kod pacijenata sa cervikalnom distonijom kasnog početka, nakon testiranja na DYT1 i DYT6, vrši testiranje na prisustvo mutacija u *CIZ1* genu. Značaj mutacija u *GLUDI* genu kod bolesnika sa generalizovanom distonijom

trebalo bi da još se potvrdi na većem broju pacijenata, pošto je do sada opisan samo jedan bolesnik sa *GLUD1* mutacijom i distonijom.

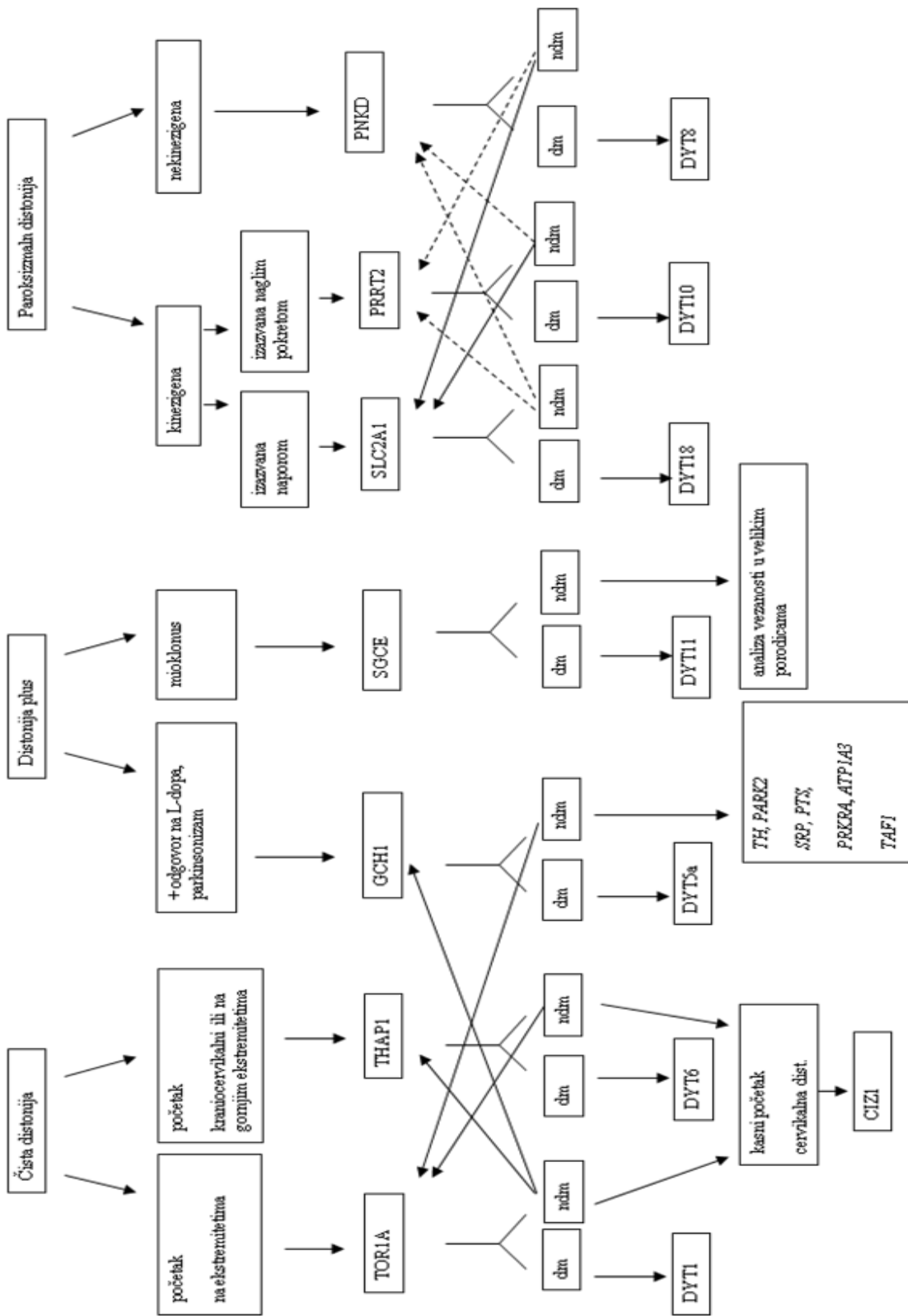
Distonija DYT5a je verovatno najčešći distonija-plus sindrom. Testiranje na DYT5a se predlaže kod svih bolesnika sa distonijom i brzim terapijskim odgovorom na niske doze L-dopa, naročito ako se radi o bolesnicima sa ranim početkom bolesti. Osim sekvenciranja kodirajućih regiona u rutinsko testiranje bi trebalo uključiti i detekciju velikih delecija/duplikacija (Klein *et al.*, 2002b; Hagenah *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2006). Zbog fenotipske heterogenosti, testiranje na DYT5a treba razmoriti i kod bolesnika sa kasnim početkom fokalne distonije (Steinberger *et al.*, 1999) i kod bolesnika sa parkinsonizmom. Kod pacijenata negativnih na DYT5a mutacije, treba razmotriti testiranje na neke gene u kojima su kod malog broja bolesnika opisane mutacije: *TH* gen (recesivna forma DRD-a), *PARK2* gen (juvenilni parkinsonizam), *SRP* gen (težak fenotip DRD-a), *PTS* gen (hiperfenilalaninemija), *PRKRA* gen (DYT16, recesivni distonija-parkinsonizam), *ATPIA3* gen (distonija-parkinsonizam brzog početka) ili *TAF1* gen (DYT3, X-vezani recesivni distonija-parkinsonizam kod bolesnika filipinskog porekla).

Kod bolesnika sa miokloničkom distonijom responsivnom na alkohol trebalo bi izvršiti testiranje na prisustvo mutacija u SGCE genu, pri čemu se predlaže da osim sekvenciranja kodirajućih egzona deo rutinske dijagnostike bude i detekcija velikih delecija/duplikacija (Grünewald *et al.*, 2008). Takođe, zbog verovatne genske heterogenosti kod miokloničke distonije, predlaže se da se kod velikih porodica negativnih na DYT11 radi analiza vezanosti i to sa ciljem detekcije novih lokusa vezanih za miokloničku distoniju.

Svakako treba napomenuti da fenotip i kod čistih i kod distonija-plus sindrom može dramatično da varira. Postoje slučajevi gde su bolesnici imali kliničku sliku DRD distonije testirani su na GCH1 mutacije, a na kraju se ispostavilo da su pozitivni na DYT1 mutaciju (Müller, 2009). Takođe, opisana porodica gde je kod obolelih sa kliničkom slikom miokloničke distonije pronađena mutacija u *GCHI* genu (Leuzzi *et al.*, 2002).

Kod paroksizmalnih distonija prvo se vrši klinička diferencijacija na kinezigene i nekinezigene forme. Kod kinezigenih formi trebalo bi izvršiti testiranje na prisustvo mutacija u *SLC2A1* genu (DYT18), naročito ako su epizode distonije izazvane izlaganjem naporu i ako kod bolesnika postoje epileptični napadi, migrena, smanjene kognitivne

funkcije, usporenog razvoja i/ili impulsivno/agresivno ponašanje. Ukoliko se distonične epizode izazvane naglim pokretom trebalo bi izvršiti testiranje na prisustvo mutacija u *PRRT2* genu (DYT10). Kod bolesnika sa nekinezigenom paroksizmalnom distonijom vrši se ciljana detekcija mutacija u *PNKD* genu (DYT8). S obzirom na izraženu varijabilnost u ekspresiji *SLC2A1* mutacija, predlaže se da se svi bolesnici negativni na DYT8 ili DYT10 testiraju na DYT18.



Slika 23. Predlog dijagnostičke procedura za primarne distonije; dm= detektovana mutacija; ndm= nije detektovana mutacija; Adaptirano na osnovu šeme Mueller, 2009

6. ZAKLJUČCI RADA

1. - Optimizovane su metode za detekciju mutacija u genima *TORIA* (DYT1), *THAP1* (DYT6), *GCH1* (DYT5a), *SGCE* (DYT11), *PNKD* (DYT8) i *SLC2A1* (DYT18). Formirana je banka uzoraka krvi i DNK od 352 bolesnika iz Srbije sa primarnom distonijom i 45 srodnika obolelih. Sedam srodnika je imalo simptome distonije, dok su ostali bili asimptomatski.

- Kod ukupno 42 osobe detektivno je ukupno 14 različitih mutacija u analiziranim genima. Pri tom je mutacija c.907_909delGAG u *TORIA* genu detektovana kod 17 osoba (9 bolesnika i 8 asimptomatskih članova porodica), u *THAP1* genu je detektovano 5 različitih mutacija (c. -220C>T u 5'UTR regionu, c.62C>G u egzonu1, c.85C>T i c.109_132dupl u egzonu 2, c.496G>T u egzonu 3) kod 12 osoba (7 bolesnika i 5 asimptomatskih srodnika), u *GCH1* genu su detektovane 4 različite mutacije (delecija egzona 1, c.228delG u egzonu 1, c.470T>C u egzonu 3, c.626+1G>A u intronu 5) kod 9 osoba (8 bolesnika i 1 asimptomatski član porodice), u *SGCE* genu su detektovane 2 različite mutacije (c.709C>T u egzonu 6, c.966delT u egzonu 7) kod 2 bolesnika. U *PNKD* i *SLC2A1* genu detektovana je po jedna mutacija (c.26C>T u egzonu 1 *PNKD*, c.516delG u egzonu 4 *SLC2A1*). Učestalosti mutacija nisu odstupale od učestalosti očekivanih na osnovu dosadašnjih podataka u literaturi.

- Od ukupnog broja detektovanih mutacija njih 6 (c. -220C>T, c.62C>G i c.109_132dupl u *THAP1* genu, c.228delG i c.470T>C u *GCH1* genu, c.516delG u *SLC2A1* genu) do sada nije opisano u literaturi.

2. - Fenotipska prezentacija kod svih bolesnika sa mutacijom je odgovarala spektru kliničkih manifestacija koji se opisuje u literaturi za odgovarajuće tipove distonije.

3. - Formirana je šema za genetsko testiranje primarnih distonija u našoj populaciji. Prema ovoj šemi prvi korak u analizi treba da bude testiranje: a) na DYT1, kod bolesnika

sa čistom distonijom i ranim početkom bolesti, b) na DYT6, kod bolesnika sa početkom simptoma na kranio cervikalnom regionu ili gornjim ekstremitetima, c) na DYT5a, kod svih bolesnika sa distonijom i povoljnim odgovorom na L-dopa, d) na DYT11, kod bolesnika sa mioklonizmima i povoljnim odgovorom na alkohol, e) na DYT8, kod bolesnika sa paroksizmalnom nekinezigenom distonijom, f) na DYT18, u slučaju da se radi o paroksizmalnoj naporom izazvanoj distoniji ili g) na DYT10, u slučaju kinezigene forme paroksizmalne distonije izazvane naglim pokretom. S obzirom na izraženu fenotipsku varijabilnost kod distonija, nakon negativnih rezultata testiranja u prvom koraku, predlaže se da se u drugom koraku vrši testiranje na prisustvo mutacija u genima koji izazivaju isti tip distonije, a u slučaju dopa reaktivne distonije i na gene odgovorne za pojavu čiste distonije.

7. LITERATURA

Abeling NG, Duran M, Bakker HD, Stroomer L, Thöny B, Blau N, et al. Poll-The BT. Sepiapterin reductase deficiency an autosomal recessive DOPA-responsive dystonia. *Mol Genet Metab* 2006; 89: 116–20.

Almasy L, Bressman SB, Raymond D, Kramer PL, Greene PE, Heiman GA, et al. Idiopathic torsion dystonia linked to chromosome 8 in two Mennonite families. *Ann Neurol* 1997; 42: 670–73.

Asmus F, Devlin A, Munz M, Zimprich A, Gasser T, Chinnery PF. Clinical differentiation of genetically proven benign hereditary chorea and myoclonus-dystonia. *Mov Disord* 2007; 22: 2104–9.

Asmus F, Gasser T. Dystonia-plus syndromes. *Eur J Neurol* 2010; 17 Suppl 1:37-45.

Asmus F, Gasser T. Inherited myoclonus-dystonia. *Adv Neurol* 2004; 94: 113–9.

Atai NA, Ryan SD, Kothary R, Breakefield XO, Nery FC. Untethering the nuclear envelope and cytoskeleton: biologically distinct dystonias arising from a common cellular dysfunction. *Int J Cell Biol*. 2012; 2012:63421.

Auerbach G, Herrmann A, Bracher A, Bader G, Gutlich M, Fischer M, et al. Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13567–72

Augood SJ, Keller-McGandy CE, Siriani A, Hewett J, Ramesh V, Sapp E, et al. Distribution and ultrastructural localization of torsinA immunoreactivity in the human brain. *Brain Res* 2003; 986: 12–21.

Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ., Breakefield XO, Penney Jr JB, Standaert DG. Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann. Neurol* 1999; 46: 761–69.

Augood SJ, Penney Jr JB, Friberg IK, Breakefield XO, Young AB, Ozelius Lj, et al. Expression of the early-onset torsion dystonia gene (DYT1) in human brain. *Ann. Neurol* 1998; 43: 669–73.

Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1154: 17–49.

Bandmann O, Nygaard TG, Surtees R, Marsden CD, Wood NW, Harding AE. Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 403–6.

Bandmann O, Valente EM, Holmans P, Surtees RA, Walters JH, Wevers RA, et al. Dopa-responsive dystonia: a clinical and molecular genetic study. *Ann Neurol* 1998; 44: 649–56.

Barraquer L. Contribució n al estú dio de la atetosis. *Gaceta Medica Catalana* 1897; 20: 385–91.

Barraquer-Bordas L, Gimenez-Roldan S. Idiopathic torsion dystonia as described by Barraquer-Roviralta. *Adv Neurol* 1988; 50: 665–6.

Barros LF, Bittner CX, Loaiza A, Porras OH. A quantitative overview of glucose dynamics in the gliovascular unit. *Glia* 2007; 55: 1222–37.

Beck KD, Irwin I, Valverde J, Brennan TJ, Langston JW, Hefti F. GDNF induces a dystonia-like state in neonatal rats and stimulates dopamine and serotonin synthesis. *Neuron* 1996; 16: 665–73.

Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 1006–16.

Bessiè re D, Lacroix C, Campagne S, Ecochard V, Guillet V, Mourey L, et al. Structure-function analysis of the THAP zinc finger of THAP1, a large C2CH DNA-binding module linked to Rb/E2F pathways. *J Biol Chem* 2008; 283: 4352–63.

Beukers RJ, Booij J, Weisscher N, Zijlstra F, van Amelsvoort TA, Tijssen MA. Reduced striatal D2 receptor binding in myoclonus-dystonia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36: 269–74.

Bhatia KP, Soland VL, Bhatt MH, Quinn NP, Marsden CD. Paroxysmal exercise-induced dystonia: eight new sporadic cases and a review of the literature. *Mov Disord* 1997; 12:1007–12.

Blanchard A, Ea V, Roubertie A, Martin M, Coquart C, Claustres M, et al. DYT6 dystonia: review of the literature and creation of the UMD Locus-Specific Database (LSDB) for mutations in the THAP1 gene. *Hum Mutat* 2011; 32: 1213–24.

Blau N, Ichinose H, Nagatsu T, Heizmann CW, Zacchello F, Burlina AB. A missense mutation in a patient with guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency missed in the newborn screening program. *J Pediatr* 1995; 126: 401–5.

Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 269–77.

Bonetti M, Barzaghi C, Brancati F, Ferraris A, Bellacchio E, Giovanetti A, et al. Mutation screening of the DYT6/THAP1 gene in Italy. *Mov Disord* 2009; 24: 2424–27.

Breakefield XO, Blood AJ, Li Y, Hallett M, Hanson PI, Standaert DG. The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 222–34.

Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Risch N, Burke RE, Greene PE, et al. Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol* 1989; 26: 612–20.

Bressman S, deLeon D, Kramer P, Ozelius L, Brin M, Greene P, et al. Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol*. 1994; 36:771–7.

Bressman SB, Raymond D, Fuchs T, Heiman GA, Ozelius LJ, Saunders-Pullman R. Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol* 2009; 8: 441–46.

Bressman SB, Raymond D, Wendt K, Saunders-Pullman R, de Leon D, Fahn S, et al. Diagnostic criteria for dystonia in DYT1 families. *Neurology* 2002; 59: 1780–2.

Bressman SB, Sabatti C, Raymond D, de Leon D, Klein C, Kramer PL, et al. The DYT1 phenotype and guidelines for diagnostic testing. *Neurology*. 2000;54:1746–52.

Brüggemann N, Klein C. Genetics of primary torsion dystonia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010 May; 10: 199-206.

Brüggemann N, Spiegler J, Hellenbroich Y, Opladen T, Schneider SA, Stephani U, et al. Beneficial Prenatal Levodopa Therapy in Autosomal Recessive Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase 1 Deficiency. *Arch Neurol* 2012; 69: 1071-5.

Bruno M, Lee H, Auburger G, Friedman A, Nielsen J, Lang A, et al. Genotype-phenotype correlation of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *Neurology* 2007; 68: 1782–9.

Butler AG, Duffey PO, Hawthorne MR, Barnes MP. An epidemiologic survey of dystonia within the entire population of northeast England over the past nine years. *Adv Neurol*. 2004; 94: 95-9.

Calakos N, Patel VD, Gottron M, Wang G, Tran-Viet KN, Brewington D, et al. Functional evidence implicating a novel TOR1A mutation in idiopathic, late-onset focal dystonia. *J Med Genet.* 2010; 47: 646-50.

Callan A, Bunning S, Jones O, High S, Swanton E. Biosynthesis of the dystonia-associated AAA+ ATPase torsinA at the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2007; 401: 607–12.

Campagne S, Saurel O, Gervais V, Milon A. Structural determinants of specific DNA-recognition by the THAP zinc finger. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 3466-76.

Cayrol C, Lacroix C, Mathe C, Ecochard V, Ceribelli M, Loreau E, et al. The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood* 2007; 109: 584-94.

Chan P, Gonzalez-Maeso J, Ruf F, Bishop D, Hof P, Sealfon S. Epsilon-sarcoglycan immunoreactivity and mRNA expression in mouse brain. *J Comp Neurol* 2005; 482:50–73.

Chen DH, Matsushita M, Rainier S, Meaney B, Tisch L, Feleke A, et al. Presence of alanine-to-valine substitutions in myofibrillogenesis regulator 1 in paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia: confirmation in 2 kindreds. *Arch Neurol* 2005; 62: 597– 600.

Cheng FB, Wan XH, Feng JC, Wang L, Yang YM, Cui LY. Clinical and genetic evaluation of DYT1 and DYT6 primary dystonia in China. *Eur J Neurol* 2010; 18: 497–503.

Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, Roze E, Castelnau P, Chabrol B, et al. Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia. *Brain.* 2009; 132: 1753–63.

Clouaire T, Roussigne M, Ecochard V, Mathe C, Amalric F, Girard JP. The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence-specific DNA-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 6907-12.

Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 2006; 172: 41–53.

De Carvalho Aguiar P, Fuchs T, Borges V, Lamar KM, Silva SM, Ferraz HB, et al. Screening of Brazilian families with primary dystonia reveals a novel THAP1 mutation and a de novo TOR1A GAG deletion. *Mov Disord* 2010; 25: 2854–2857.

De la Fuente-Fernández R. Mutations in GTP-cyclohydrolase I gene and vitiligo. *Lancet* 1997; 350: 640.

De Vivo DC, Leary L, Wang D. Glucose transporter 1 deficiency syndrome and other glycolytic defects. *J Child Neurol* 2002; 17(Suppl. 3): 3S15–3S23.

Dickens NJ, Beatson S, Ponting CP. Cadherin-like domains in alpha-dystroglycan, alpha/epsilon-sarcoglycan and yeast and bacterial proteins. *Curr Biol* 2002; 12: R197–9.

Djarmati A, Schneider SA, Lohmann K, Winkler S, Pawlack H, Hagenah J, et al. Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol* 2009; 8: 447–52.

Djarmati A, Svetel M, Momcilovic D, Kostic V, Klein C. Significance of recurrent mutations in the myofibrillogenesis regulator 1 gene. *Arch Neurol* 2005; 62:1641.

Doheny D, Danisi F, Smith C, Morrison C, Velickovic M, De Leon D, et al. Clinical findings of a myoclonus-dystonia family with two distinct mutations. *Neurology* 2002; 59: 1244–6.

Dron M, Meritet JF, Dandoy-Dron F, Meyniel JP, Maury C, Tovey MG. Molecular cloning of ADIR, a novel interferon responsive gene encoding a protein related to the torsins. *Genomics*; 2002. 79: 315–25.

Duan W, Zhang Z, Gash DM, Mattson MP. Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 587–97.

Esapa CT, Waite A, Locke M, Benson MA, Kraus M, Mcilhinney RA, et al. SGCE missense mutations that cause myoclonus-dystonia syndrome impair epsilon-sarcoglycan trafficking to the plasma membrane: modulation by ubiquitination and torsinA. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 327–42.

Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997; 272: 32534-8. Erratum in: *J Biol Chem* 1998; 273: 19922.

Fahn S, Bressman SB, Marsden CD. Classification of dystonia. *Adv Neurol*. 1998; 78:1-10.

Fahn S, Jankovic J. *Principles and Practice of Movement Disorders*. Philadelphia: Elsevier; 2007.

Fahn S, Marsden CD, Calne DB: Classification and investigation of dystonia. In Marsden CD, Fahn S (eds): *Movement Disorders*, vol2. London, Butterworths, 1987, pp 332–58.

Fahn S. Concepts and classification of dystonia. *Adv Neurol* 1988; 50: 1-8.

Fahn S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol* 2000; 47: S2–9;

Ferrari-Toninelli G, Paccioretti S, Francisconi S, Uberti D, Memo M. TorsinA negatively controls neurite outgrowth of SH-SY5Y human neuronal cell line. *Brain Res* 2004; 1012: 75–81.

Fink JK, Hedera P, Mathay JG, Albin RL. Paroxysmal dystonic choreoathetosis linked to chromosome 2q: clinical analysis and proposed pathophysiology. *Neurology* 1997; 49: 177–83.

Fink JK, Rainer S, Wilkowski J, Jones SM, Kume A, Hedera P, et al. Paroxysmal dystonic choreoathetosis: tight linkage to chromosome 2q. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 140–5.

Flatau E, Sterling W. Progressiver Torsionspasms bei Kindern. *Gesamte Neurol Psychiatr* 1911; 7: 586–612.

Foncke EM, Gerrits MC, van Ruissen F, Baas F, Hedrich K, Tijssen CC, et al. Distal myoclonus and late onset in a large Dutch family with myoclonus-dystonia. *Neurology* 2006; 67: 1677–80.

Fouad GT, Servidei S, Durcan S, Bertini E, Ptáček LJ. A gene for familial paroxysmal dyskinesia (FPD1) maps to chromosome 2q. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 135–9.

Friedman A, Zakrzewska-Pniewska B, Domitrz I, Lee HY, Ptacek L, Kwiecinski H. Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia caused by the mutation of MR-1 in a large Polish kindred. *Eur Neurol* 2009; 61: 39-41.

Fuchs T, Gavarini S, Saunders-Pullman R, Raymond D, Ehrlich ME, Bressman SB, et al. Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet* 2009; 41: 286–88.

Furukawa Y, Graf WD, Wong H, Shimadzu M, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia simulating spastic paraplegia due to tyrosine hydroxylase (TH) gene mutations. *Neurology* 2001; 56: 260–3.

Furukawa Y, Guttman M, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia. In: Frucht SJ and Fahn S, eds. *Current Clinical Neurology: Movement Disorder Emergencies: Diagnosis and Treatment*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 209-29.

Furukawa Y, Guttman M, Sparagana SP, Trugman JM, Hyland K, Wyatt P, et al. Dopa-responsive dystonia due to a large deletion in the GTP cyclohydrolase I gene. *Ann Neurol* 2000; 47: 517–20.

Furukawa Y, Kapatos G, Haycock JW, Worsley J, Wong H, Kish SJ, et al. Brain biopterin and tyrosine hydroxylase in asymptomatic dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* 2002; 51: 637-41.

Furukawa Y, Kish S, Bebin EM, Jacobson RD, Fryburg JS, Wilson WG, et al. Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Ann Neuro* 1998b; 44: 10-6.

Furukawa Y, Kish SJ. Dopa-responsive dystonia: recent advances and remaining issues to be addressed. *Mov Disord* 1999; 14: 709-15.

Furukawa Y, Lang AE, Trugman JM, Bird TD, Hunter A, Sadeh M, et al. Gender-related penetrance and de novo GTP-cyclohydrolase I gene mutations in dopa-responsive dystonia. *Neurology* 1998a; 50: 1015-20.

Furukawa Y, Nygaard TG, Gutlich M, Rajput AH, Pifl C, Distefano L, et al. Striatal biopterin and tyrosine hydroxylase protein reduction in dopa-responsive dystonia. *Neurology* 1999; 53: 1032-41.

Furukawa Y. Genetics and biochemistry of dopa-responsive dystonia: significance of striatal tyrosine hydroxylase protein loss. *Adv Neurol* 2003; 91: 401-10.

Furukawa Y. Update on dopa-responsive dystonia: locus heterogeneity and biochemical features. *Adv Neurol* 2004; 94: 127-38.

Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 2009; 121: 29-40.

Gasser T. Inherited myoclonus-dystonia syndrome. *Adv Neurol* 1998; 78: 325-34.

Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard JP, et al. Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol* 2010; 68: 549-53.

Geyer HL, Bressman SB. The diagnosis of dystonia. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 780-90.

Ghezzi D, Viscomi C, Ferlini A, Gualandi F, Mereghetti P, DeGrandis D, et al. Paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia is caused by mutations of the MR-1 mitochondrial targeting sequence. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1058-64.

Giles LM, Li L, Chin LS. Printor, a novel torsinA-interacting protein implicated in dystonia pathogenesis. *J Biol Chem* 2009; 284: 21765-75.

Girard JP, Amalric F, Roussigne M, Clouaire T. Novel death associated proteins, and THAP1 and PAR4 pathway in apoptosis control. 2010. United States, Patent version number 20100021482.

Golderer G, Werner ER, Heufler C, Strohmaier W, Grobner P, Werner-Felmayer G. GTP cyclohydrolase I mRNA: novel splice variants in the slime mould *Physarum polycephalum* and in human monocytes (THP-1) indicate conservation of mRNA processing. *Biochem J* 2001; 355: 499–507.

Gonzalez-Alegre P, Bode N, Davidson BL, Paulson HL. Silencing primary dystonia: lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *J Neurosci* 2005; 25:10502–10509.

Gonzalez-Alegre P, Paulson HL. Aberrant cellular behavior of mutant torsinA implicates nuclear envelope dysfunction in DYT1 dystonia. *J Neurosci* 2004; 24: 2593–601.

Goodchild RE, Dauer WT. Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 2004; 101: 847–52.

Goodchild RE, Dauer WT. The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *J Cell Biol* 2005; 168: 855–62.

Goodchild RE, Kim CE, Dauer WT. Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron* 2005; 48: 923–32.

Gordon KL, Gonzalez-Alegre P. Consequences of the DYT1 mutation on torsinA oligomerization and degradation. *Neuroscience*. 2008;157:588-95.

Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer V, Asmus F, Gasser T, et al. The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11: 138–44.

Granata A, Koo SJ, Haucke V, Schiavo G, Warner TT. CSN complex controls the stability of selected synaptic proteins via a torsinA-dependent process. *EMBO J* 2011; 30:181–93.

Granata A, Schiavo G, Warner TT. TorsinA and dystonia: from nuclear envelope to synapse. *J Neurochem* 2009;109:1596-609.

Granata A, Watson R, Collinson LM, Schiavo G, Warner TT. The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem* 2008; 283: 7568–79.

Grimes DA, Barclay CL, Duff J, Furukawa Y, Lang AE. Phenocopies in a large GCHI mutation positive family with dopa responsive dystonia: confusing the picture? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002b; 72: 801–4.

Grimes DA, Han F, Lang AE, St George-Hyssop P, Racacho L, Bulman DE. A novel locus for inherited myoclonus-dystonia on 18p11. *Neurology* 2002a; 59: 1183–6.

Groen JL, Ritz K, Contarino MF, van de Warrenburg BP, Aramideh M, Foncke EM, et al. DYT6 dystonia: response to deep brain stimulation. *Mov Disord* 2010; 25 : 2420–27.

Groen JL, Yildirim E, Ritz K, Baas F, van Hilten JJ, van der Meulen FW, et al. THAP1 mutations are infrequent in spasmodic dysphonia. *Mov Disord* 2011;26:1952-4.

Grundmann K, Laubis-Herrmann U, Bauer I, Dressler D, Vollmer-Haase J, Bauer P, et al. Frequency and phenotypic variability of the GAG deletion of the DYT1 gene in an unselected group of patients with dystonia. *Arch Neurol* 2003; 60: 1266–70.

Grünwald A, Djarmati A, Lohmann-Hedrich K, Farrell K, Zeller JA, Allert N, et al. Myoclonus-dystonia: significance of large SGCE deletions. *Human Mutat* 2008; 29: 331–2.

Guetlich M, Jaeger E, Rucknaegel KP, Werner T, Roedl W, Ziegler I, et al. Human GTP cyclohydrolase I: only one out of three cDNA isoforms gives rise to the active enzyme. *Biochem J* 1994; 302: 215-21.

Guettard E, Portnoi MF, Lohmann-Hedrich K, Keren B, Rossignol S, Winkler S, et al. Myoclonus-dystonia due to maternal uniparental disomy. *Arch Neurol* 2008; 65: 1380–5.

Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, et al. Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med* 1998; 4: 957–62.

Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, et al GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 1998; 83: 34–40.

Hagenah J, Saunders-Pullman R, Hedrich K, Kabakci K, Habermann K, Wiegers K, et al. High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCHI screening. *Neurology* 2005; 64: 908–11.

Hamann M and Richter A. Striatal increase of extracellular dopamine levels during dystonic episodes in a genetic model of paroxysmal dyskinesia. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 78–84.

Han F, Lang AE, Racacho L, Bulman DE, Grimes DA. Mutations in the epsilon-sarcoglycan gene found to be uncommon in seven myoclonus-dystonia families. *Neurology* 2003; 61: 244–

Han F, Racacho L, Lang AE, Bulman DE, Grimes DA. Refinement of the DYT15 locus in myoclonus dystonia. *Mov Disord* 2007; 22: 888–92.

Hanihara T, Inoue K, Kawanishi C, Sugiyama N, Miyakawa T, Onishi H, et al. 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: a clinical and molecular study. *Mov Disord* 1997; 12: 408–11.

Hanson PI, Whiteheart SW. AAA+ proteins: Have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 519–29.

Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, et al. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3738–51.

Harada T, Kagamiyama H, Hatakeyama K. Feedback regulation mechanisms for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science* 1993; 260: 1507–10.

Hayashi T, Shibamoto T. Analysis of methylglyoxal in foods and beverages. *J Agric Food Chem* 1985; 33: 1090–3.

Hempelmann A, Kumar S, Muralitharan S, Sander T. Myofibrillogenesis regulator 1 gene (MR-1) mutation in an Omani family with paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *Neurosci Lett* 2006; 402: 118–20.

Herz E: Dystonia. I. Historical review: Analysis of dystonic symptoms and physiologic mechanisms involved. *Arch Neurol Psychiatr* 1944a; 51: 305–18.

Herz E: Dystonia. II. Clinical classification. *Arch Neurol Psychiatr* 1944b; 51: 319–55.

Herz E: Dystonia. III. Pathology and conclusions. *Arch Neurol Psychiatr* 1944c; 52: 20–6.

Hesslinger C, Kremmer E, Hultner L, Ueffing M, Ziegler I. Phosphorylation of GTP cyclohydrolase I and modulation of its activity in rodent mast cells. GTP cyclohydrolase I hyperphosphorylation is coupled to high affinity IgE receptor signaling and involves protein kinase C. *J Biol Chem* 1998; 273: 21616–22.

Hewett J, Ziefer P, Bergeron D, Naismith T, Boston H, Slater D, et al. TorsinA in PC12 cells: localization in the endoplasmic reticulum and response to stress. *J Neurosci Res* 2003; 72: 158–68.

Hewett JW, Gonzalez-Agosti C, Slater D, Ziefer P, Li S, Bergeron D, et al. Mutant torsinA, responsible for early-onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1403–13.

Hewett JW, Nery FC, Niland B, Ge P, Tan P, Hadwiger P, et al. SiRNA knockdown of mutant torsinA restores processing through secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1436–45.

Hewett JW, Tannous B, Niland BP, Nery FC, Zeng J, Li Y, et al. Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7271–76.

Hewett JW, Zeng J, Niland BP, Bragg DC, Breakefield XO. Dystonia-causing mutant torsinA inhibits cell adhesion and neurite extension through interference with cytoskeletal dynamics. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 98–111.

Hirano M, Imaiso Y, Ueno S. Differential splicing of the GTP cyclohydrolase I RNA in dopa-responsive dystonia. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 316-19.

Hirano M, Ueno S. Mutant GTP cyclohydrolase I in autosomal dominant dystonia and recessive hyperphenylalaninemia. *Neurology* 1999; 52: 182-4.

Hirano M, Yanagihara T, Ueno S. Dominant negative effect of GTP cyclohydrolase I mutations in dopa-responsive hereditary progressive dystonia. *Ann Neurol* 1998; 44:365-71.

Hirayama K, Kapatos, G. Human Nigrostriatal Dopamine Neurons Express Low Levels of GTP Cyclohydrolase I mRNA. In: *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, Proceedings of the 12th International Symposium on Pteridines and Folates 2001*; 291-295 Milstien S, Kapatos G, Levine RA, Shane B eds, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London.

Horvath GA, Stockler-Ipsiroglu SG, Salvarinova-Zivkovic R, Lillquist YP, Connolly M, Hyland K, et al. Autosomal recessive GTP cyclohydrolase I deficiency without hyperphenylalaninemia: evidence of a phenotypic continuum between dominant and recessive forms. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 127-31.

Houlden H, Schneider SA, Paudel R, Melchers A, Schwingenschuh P, Edwards M, et al. THAP1 mutations (DYT6) are an additional cause of earlyonset dystonia. *Neurology* 2010; 74: 846-50.

<http://www.dmd.nl>

Hwu WL, Wang PJ, Hsiao KJ, Wang TR, Chiou YW, Lee YM. Dopa-responsive dystonia induced by a recessive GTP cyclohydrolase I mutation. *Hum Genet.* 1999; 105: 226-30.

Ichinose H, Ohye T, Matsuda Y, Hori T, Blau N, Burlina A, et al. Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes: mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J Biol Chem* 1995; 270: 10062-71.

Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat. Genet.* 1994; 8: 236-42.

Ikeuchi T, Shimohata T, Nakano R, Koide R, Takano H, Tsuji S. A case of primary torsion dystonia in Japan with the 3-bp (GAG) deletion in the DYT1 gene with a unique clinical presentation. *Neurogenetics.* 1999; 2: 189–90.

Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Ozawa E. A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 3091–100.

Iyer LM, Leippe DD, Koonin EV, Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* 2004; 146: 11–31.

Jankovic J, Demirkiran M. Classification of paroxysmal dyskinesias and ataxias. In: Fahn, S. (ed.) *Myoclonus and Paroxysmal Dyskinesias, Advances in Neurology* 2002. Vol 89. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 387–400.

Jarman PR, Bandmann O, Marsden CD, Wood NW. GTP cyclohydrolase I mutations in patients with dystonia responsive to anticholinergic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997a; 63: 304–8.

Jarman PR, Davis MB, Hodgson SV, Marsden CD, Wood NW. Paroxysmal dystonic choreoathetosis. Genetic linkage studies in a British family. *Brain* 1997b; 120: 2125–30.

Jech R, Bares M, Krepelova A, Urgosik D, Havrankova P, Ruzicka E. DYT 6 – a novel THAP1 mutation with excellent effect on pallidal DBS. *Mov Disord* 2011; 26: 924–5.

Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol* 2001; 18: 247–56.

Jungwirth MT, Kumar D, Jeong DY, Goodchild RE. The nuclear envelope localization of DYT1 dystonia torsinA- Δ E requires the SUN1 LINC complex component. *BMC Cell Biology* 2011, vol. 12, article 24.

Kabakci K, Hedrich K, Leung JC, Mitterer M, Vieregge P, Lencer R, et al. Mutations in DYT1: extension of the phenotypic and mutational spectrum. *Neurology*. 2004; 62: 395–400.

Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Erogullari A, Uflacker N, Braunholz D, et al. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol* 2010; 68: 554-9.

Kakazu Y, Koh JY, Ho KW, Gonzalez-Alegre P, Harata NC. Synaptic vesicle recycling is enhanced by torsinA that harbors the DYT1 dystonia mutation. *Synapse* 2012;66: 453-64.

Kalir T, Wang BY, Goldfischer M, Haber RS, Reder I, Demopoulos R, et al. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, borderline and malignant ovarian epithelia. *Cancer* 2002; 94: 1078–82.

Kamm C, Boston H, Hewett J, Wilbur J, Corey DP, Hanson PI, et al. The early onset dystonia protein torsinA interacts with kinesin light chain 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 19882–92.

Kamm C, Fischer H, Garavaglia B, Kullmann S, Sharma M, Schrader C, et al. Susceptibility to DYT1 dystonia in European patients is modified by the D216H polymorphism. *Neurology* 2008; 70: 2261–2.

Kamm C, Uflacker N, Asmus F, Schrader C, Wolters A, Wittstock M, et al. No evidence for THAP1/DYT6 variants as disease modifiers in DYT1 dystonia. *Mov Disord* 2011; 26: 2136-7.

Kapatos G, Chandran N, Kfoury N. The Ups and Downs of GTP Cyclohydrolase I: A Neuroscience Point of View. In: *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, Proceedings of the 14th International Symposium on Pteridines and Folates* 2009; 11-17; Parrak V, Fuchs D eds., International Society of Pteridinology

Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer* 2001; 92: 634–41.

Kim CE, Perez A, Perkins G, Ellisman MH, Dauer WT. A molecular mechanism underlying the neural-specific defect in torsinA mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:9861-6.

Kinugawa K, Vidailhet M, Clot F, Apartis E, Grabli D, Roze E. Myoclonus-dystonia: an update. *Mov Disord* 2009; 24: 479–89.

Klein C, Brin MF, de Leon D, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Bressman SB, et al. De novo mutations (GAG deletion) in the DYT1 gene in two non-Jewish patients with early-onset dystonia. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1133-6.

Klein C, Brin MF, Kramer P, Sena-Esteves M, de Leon D, Doheny D, et al. Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5173–6.

Klein C, Hedrich K, Kabakci K, Mohrmann K, Wiegers K, Landt O, et al. Exon deletions in the GCHI gene in two of four Turkish families with dopa-responsive dystonia. *Neurology* 2002b; 59: 1783–6.

Klein C, Liu L, Doheny D, Kock N, Müller B, de Carvalho Aguiar P, et al. Epsilon-sarcoglycan mutations found in combination with other dystonia gene mutations. *Ann Neurol* 2002a; 52: 675-9.

Klein C, Schilling K, Saunders-Pullman RJ, Garrels J, Breakefield XO, Brin MF, et al. A major locus for myoclonus-dystonia maps to chromosome 7q in eight families. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1314–9.

Klein C. Movement disorders: classifications. *J Inherit Metab Dis*. 2005; 28: 425-39.

Klein C. Myoclonus and myoclonus-dystonias. In: Pulst S (ed) *Genetics of movement disorders*. 2002; Academic Press, San Diego, pp 449–69.

Klepper J, Leiendecker B, Bredahl R, Athanassopoulos S, Heinen F, Gertsen E, et al. Introduction of a ketogenic diet in young infants. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25: 449–60.

Klepper J, Leiendecker B. GLUT1 deficiency syndrome-2007 update. *Dev Med Child Neurol*. 2007; 49: 707-16.

Kock N, Naismith TV, Boston HE, Ozelius LJ, Corey DP, Breakefield XO, et al. Effects of genetic variations in the dystonia protein torsinA: identification of polymorphism at residue 216 as protein modifier. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1355–64.

- Konakova M, Pulst SM. Immunocytochemical characterization of torsin proteins in mouse brain. *Brain Res* 2001; 922: 1–8.
- Kustedjo K, Deechongkit S, Kelly JW, Cravatt BF. Recombinant expression, purification, and comparative characterization of torsinA and its torsion dystonia-associated variant Delta E-torsinA. *Biochemistry* 2003; 42: 15333–41.
- Lapize C, Pluss C, Werner ER, Huwiler A, Pfeilschifter J. Protein kinase C phosphorylates and activates GTP cyclohydrolase I in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 802–5.
- LeDoux MS, Xiao J, Rudzińska M, Bastian RW, Wszolek ZK, Van Gerpen JA, et al. Genotype-phenotype correlations in THAP1 dystonia: Molecular foundations and description of new cases. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18:414–25.
- Lee HY, Nakayama J, Xu Y, Fan X, Karouani M, Shen Y, et al. Dopamine dysregulation in a mouse model of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *J Clin Invest*. 2012; 122: 507–18.
- Lee HY, Xu Y, Huang Y, Ahn AH, Auburger GW, Pandolfo M, et al. The gene for paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia encodes an enzyme in a stress response pathway. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 3161–70.
- Lentz SI, Kapatos G. Tetrahydrobiopterin biosynthesis in rat brain: heterogeneity of GTP cyclohydrolase I mRNA expression in monoamine-containing neurons. *Neurochem Int* 1996; 28: 569–82.
- Leung JC, Klein C, Friedman J, Vieregge P, Jacobs H, Doheny D, et al. Novel mutation in the TOR1A (DYT1) gene in atypical early onset dystonia and polymorphisms in dystonia and early onset parkinsonism. *Neurogenetics* 2001; 3: 133–43.
- Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, Cardona F, Artiola C, Antonozzi I. Autosomal dominant GTP-CH deficiency presenting as a dopa-responsive myoclonus-dystonia syndrome. *Neurology* 2002; 59: 1241–3.
- Lim LE, Campbell KP. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 443–452.
- Ling H, Polke JM, Sweeney MG, Haworth A, Sandford CA, Heales SJR, et al. An intragenic duplication in guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 gene in a dopa-responsive dystonia family. *Mov Disord* 2011; 26: 905–9.

Lohmann K, Uflacker N, Erogullari A, Lohnau T, Winkler S, Dendorfer A, et al. Identification and functional analysis of novel THAP1 mutations. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 171-5.

Lu W, Gotzmann J, Sironi L, Jaeger VM, Schneider M, Lüke Y, et al. Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 2415–26.

Ludecke B, Dworniczak B, Bartholome K. A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Hum Genet* 1995; 95: 123–5.

Ludecke B, Knappskog PM, Clayton PT, Surtees RA, Clelland JD, Heales SJ, et al. Recessively inherited L-DOPA-responsive parkinsonism in infancy caused by a point mutation (L205P) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1023–8.

Lupas A, Flanagan JM, Tamura T, Baumeister W. Self-compartmentalization proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 399–404.

Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 2005; 202: 654–62.

Maita N, Hatakeyama K, Okada K, Hakoshima T. Structural basis of biopterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 51534–40.

Maita N, Okada K, Hatakeyama K, Hakoshima T. Crystal structure of the stimulatory complex of GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein GFRP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1212–17.

Margari L, Perniola T, Illiceto G, Ferrannini E, de Iaco MG, Presicci A, et al. Familial paroxysmal exercise-induced dyskinesia and benign epilepsy: a clinical and neurophysiological study of an uncommon disorder. *Neurol Sci* 2000; 21: 165–72.

Marger MD, Saier MH Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 13–20.

Maria K, Nadine G, Florian C, Christian D, Christian G, Peter L, et al. Mutational screening of THAP1 in a German population with primary dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: 104-6.

Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, Duarte J, Bottiglieri T, Sinton CM, et al. Glut1 deficiency (G1D): Epilepsy and metabolic dysfunction in a mouse model of the most common human phenotype. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 92-101.

Matsumoto S, Nishimura M, Shibasaki H, Kaji R. Epidemiology of primary dystonias in Japan: comparison with Western countries. *Mov Disord*. 2003; 18: 1196-8.

Matsuo H, Kamakura K, Saito M, Okano M, Nagase T, Tadano Y, et al. Familial paroxysmal dystonic choreoathetosis: clinical findings in a large Japanese family and genetic linkage to 2q. *Arch Neurol* 1999; 56: 721–6.

Mazars R, Gonzalez-de-Peredo A, Cayrol C, Lavigne AC, Vogel JL, Ortega N, et al. The THAP-zinc finger protein THAP1 associates with coactivator HCF-1 and O-GlcNAc transferase: a link between DYT6 and DYT3 dystonias. *J Biol Chem* 2010; 285: 13364-71.

McNally EM, Ly CT, Kunkel LM. Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhelin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* 1998; 422: 27–32.

Milstien S, Jaffe H, Kowlessur D, Bonner TI. Purification and cloning of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP. *J Biol Chem* 1996. 271: 19743–51.

Misbahuddin A, Placzek MR, Taanman JW, Gschmeissner S, Schiavo G, Cooper JM et al. Mutant torsinA, which causes early-onset primary torsion dystonia, is redistributed to membranous structures enriched in vesicular monoamine transporter in cultured human SH-SY5Y cells. *Mov Disord* 2005; 20: 432–40.

Miyamoto R, Goto S, Sako W, Miyashiro A, Kim I, Escande F, et al. Generalized dystonia in a patient with a novel mutation in the *GLUD1* gene. *Mov Disord* 2012; 27: 1198-9.

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985; 229: 941–5.

Müller B, Hedrich K, Kock N, Dragasevic N, Svetel M, Garrels J, et al. Evidence that paternal expression of the epsilon-sarcoglycan gene accounts for reduced penetrance in myoclonus-dystonia. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1303–11.

Müller U, Kupke KG. The genetics of primary torsion dystonia. *Hum Genet* 1990; 84: 107–15.

Müller U, Steinberger D, Topka H. Mutations of *GCH1* in dopa-responsive dystonia. *J Neural Transm* 2002; 109: 321-8.

Müller U. The monogenic primary dystonias. 2009 *Brain*; 132: 2005-25.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.

Münchau A, Valente EM, Shahidi GA, Eunson LH, Hanna MG, Quinn NP, et al. A new family with paroxysmal exercise induced dystonia and migraine: a clinical and genetic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 609–14.

Nagao M, Fujita Y, Wakabayashi K, Nukaya H, Kosuge T, Sugimura T. Mutagens in coffee and other beverages. *Environ Health Perspect* 1986; 67: 89–91.

Naismith TV, Heuser JE, Breakefield XO, Hanson PI. TorsinA in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7612–7.

Nar H, Huber R, Meining W, Schmid C, Weinkauff S, Bacher A. Atomic structure of GTP cyclohydrolase I. *Structure* 1995; 3: 459-66.

Nardocci N, Zorzi G, Barzaghi C, Zibordi F, Ciano C, Ghezzi D, et al. Myoclonus-dystonia syndrome: clinical presentation, disease course, and genetic features in 11 families. *Mov Disord* 2008; 23: 28–34.

Nardocci N, Zorzi G, Blau N, Fernandez Alvarez E, Sesta M, Angelini L, et al. Neonatal dopa-responsive extrapyramidal syndrome in twins with recessive GTPCH deficiency. *Neurology* 2003; 60: 335-7.

Nery FC, Zeng J, Niland BP, Hewett J, Farley J, Irimia D, et al. TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton. *J Cell Sci* 2008; 121: 3476–86.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 1999; 9: 27–43.

Neville BG, Parascandolo R, Farrugia R, Felice A. Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa-responsive motor and cognitive disorder. *Brain* 2005; 128: 2291–6.

Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M. Identification and characterization of epsilon-sarcoglycans in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 125: 1–12.

Norgren N, Mattson E, Forsgren L, Holmberg M. A high-penetrance form of late-onset torsion dystonia maps to a novel locus (DYT21) on chromosome 2q14.3-q21.3. *Neurogenetics* 2011; 12: 137–43.

Nygaard TG, Marsden CD, Duvoisin RC. Dopa-responsive dystonia. *Adv Neurol* 1988; 50: 377–84.

Nygaard TG, Raymond D, Chen C, Nishino I, Greene PE, Jennings D, et al. Localization of a gene for myoclonus-dystonia to chromosome 7q21-q31. *Ann Neurol* 1999; 46: 794–8.

Nygaard T, Trugman J, de Yebenes J, Fahn S. Dopa-responsive dystonia: the spectrum of clinical manifestations in a large North American family. *Neurology* 1990; 40: 66–9.

Nygaard TG, Wilhelmssen KC, Risch NJ, Brown DL, Trugman JM, Gilliam TC, et al. Linkage mapping of dopa-responsive dystonia (DRD) to chromosome 14q. *Nat Genet* 1993b; 5: 386–91.

Nygaard TG. Dopa-responsive dystonia. Delineation of the clinical syndrome and clues to pathogenesis. *Adv Neurol* 1993a; 60: 577–85.

Ogura T and Wilkinson AJ. AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function. *Genes Cells* 2001; 6: 575–97.

Ohta E, Funayama M, Ichinose H, Toyoshima I, Urano F, Matsuo M, et al. Novel mutations in the guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene associated with DYT5 dystonia. *Arch Neurol* 2006; 63:1605-10.

Oppenheim H. Uber eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurologisches Centralblatt* 1911; 30: 1090–107.

Ozelius L, Kramer P, Moskowitz C, Kwiatkowski D, Brin M, Bressman S, et al. Human gene for torsion dystonia located on chromosome 9q32-34. *Neuron* 1989; 2: 1427–34.

Ozelius L, Hewett J, Page C, Bressman S, Kramer P, Shalish C, et al. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 1997; 17: 40–8.

Ozelius LJ, Page CE, Klein C, Hewett JW, Mineta M, Leung J, et al.. The TOR1A (DYT1) gene family and its role in early onset torsion dystonia. *Genomics* 1999; 62: 377–84.

Ozelius LJ. Update on the genetics of primary torsion dystonia loci DYT6, DYT7, and DYT13 and the dystonia plus locus DYT12. *Adv Neurol* 2004; 94: 109–12.

Paisán-Ruiz C, Ruiz-Martinez J, Ruibal M, Mok KY, Indakoetxea B, Gorostidi A, et al. Identification of a novel THAP1 mutation at R29 amino-acid residue in sporadic patients with early-onset dystonia. *Mov Disord* 2009; 24: 2428–29.

Pandya MJ, Golderer G, Werner ER, Werner-Felmayer G. Interaction of human GTP cyclohydrolase I with its splice variants. *Biochem J* 2006; 400: 75-80.

Park SK, Nguyen MD, Fischer A, Luke MP, Affar el B, Dieffenbach PB, et al. Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* 2005; 122: 275–87.

Pascual JM, Wang D, Yang R, Shi L, Yang H, De Vivo DC. Structural signatures and membrane helix 4 in GLUT1: inferences from human blood-brain glucose transport mutants. *J Biol Chem* 2008; 283: 16732-42.

PedersenWA, Luo H, Kruman I, Kasarskis E, Mattson MP. The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 2000; 14: 913–24.

Pekmezovic T, Ivanovic N, Svetel M, Nalić D, Smiljković T, Raicević R et al. Prevalence of primary late-onset focal dystonia in the Belgrade population. *Mov Disord*. 2003; 18: 1389-92.

Plant GT, Williams AC, Earl CJ, Marsden CD. Familial paroxysmal dystonia induced by exercise. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984; 47: 275–9.

Pons R, Cuenca-León E, Miravet E, Pons M, Xaidara A, Youroukos S, et al. Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia due to a PNKD recurrent mutation: report of two Southern European families. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012; 16: 86-9.

Powell L, Burke B. Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1990; 111: 2225–34.

Puschmann A, Xiao J, Bastian RW, Searcy JA, LeDoux MS, Wszolek ZK. An African-American family with dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17: 547-50.

Rainier S, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Bui M, Plein E, et al. Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Arch Neurol* 2004; 61: 1025–9.

Rajput AH, Gibb WRG, Zhong XH, Shannak KS, Kish S, Chang LG et al. Dopa-responsive dystonia: pathological and biochemical observations in a case. *Ann Neurol* 1994; 35: 396-402.

Raskind WH, Bolin T, Wolff J, Fink J, Matsushita M, Litt M, et al. Further localization of a gene for paroxysmal dystonic choreoathetosis to a 5-cM region on chromosome 2q34. *Hum Genet* 1998; 102: 93–7.

Razafsky D, Hodzic D. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoskeletal connections. *J Cell Biol* 2009; 186: 461–72.

Risch N, de Leon D, Ozelius L, Kramer P, Almasy L, Singer B, et al. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet.* 1995; 9: 152–9.

Risch NJ, Bressman SB, Deleon D, Brin MF, Burke RE, Greene PE, et al. Segregation analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews suggests autosomal dominant inheritance. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 533–8.

Risch NJ, Bressman SB, Senthil G, Ozelius LJ. Intragenic cis and trans modification of genetic susceptibility in DYT1 torsion dystonia. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 1188–93.

Rotstein M, Engelstad K, Yang H, Wang D, Levy B, Chung WK, et al. Glut1 deficiency: inheritance pattern determined by haploinsufficiency. *Ann Neurol* 2010; 68: 955-8.

Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard JP. THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 2003; 22: 2432-42.

Roze E, Apartis E, Clot F, Dorison N, Thobois S, Guyant-Marechal L, et al. Myoclonus-dystonia: clinical and electrophysiologic pattern related to SGCE mutations. *Neurology* 2008; 70: 1010–6.

Saier MH Jr, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, et al. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1: 257–279.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.

Sakashita M, Aoyama N, Minami R, Maekawa S, Kuroda K, Shirasaka D, et al. Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2001; 37: 204–9.

Salas-Burgos A, Iserovich P, Zuniga F, Vera JC, Fischbarg J. Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J* 2004; 87: 2990–9.

Saunders-Pullman R, Raymond D, Senthil G, Kramer P, Ohmann E, Deligtisch A, et al. Narrowing the DYT6 dystonia region and evidence for locus heterogeneity in the Amish-Mennonites. *Am J Med Genet* 2007; 143: 2098 –105.

Schneider SA, Paisan-Ruiz C, Garcia-Gorostiaga I, Quinn NP, Weber YG, Lerche H, et al. GLUT1 gene mutations cause sporadic paroxysmal exercise-induced dyskinesias. *Mov Disord* 2009; 24: 1684–8.

Schneider SA, Ramirez A, Shafiee K, Kaiser FJ, Erogullari A, Bruggemann N, et al. Homozygous THAP1 mutations as cause of early-onset generalized dystonia. *Mov Disord* 2011; 26: 858-61.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. () Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.

Schüle B, Kock N, Svetel M, Dragasevic N, Hedrich K, De Carvalho Aguiar P, et al. Genetic heterogeneity in ten families with myoclonus-dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1181-5.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904–11.

Schwalbe W. Eine eigentümliche tonische Krampfform mit hysterischen Symptomen. *Inaug Diss, Berlin, G. Schade, 1908.*

Scola RH, Carla Carducci C, Amaral VG, Lorenzoni PT, Teive HA, Giovanniello T, et al. A novel missense mutation pattern of the GCH1 gene in dopa-responsive dystonia. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 1224–7.

Segawa M, Hosaka A, Miyagawa F, Nomura Y, Imai H. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Adv Neurol* 1976; 14: 215–33.

Segawa M, Nomura Y, Nishiyama N. Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease). *Ann Neurol*. 2003; 54 Suppl 6:S32–45.

Segawa M. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Brain Dev* 2000; 22 Suppl: S65–80.

Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, et al. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet* 1998; 18: 188-91.

Sengel C, Gavarini S, Sharma N, Ozelius LJ, Bragg DC. Dimerization of the DYT6 dystonia protein, THAP1, requires residues within the coiled-coil domain. *J Neurochem* 2011; 118: 1087-100.

Shashidharan P, Kramer BC, Walker RH, Olanow CW, Brin MF. Immunohistochemical localization and distribution of torsinA in normal human and rat brain. *Brain Res* 2000; 853: 197–206.

Shen Y, Lee HY, Rawson J, Ojha S, Babbitt P, Fu YH, et al. Mutations in PNKD causing paroxysmal dyskinesia alters protein cleavage and stability. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 2322-32.

Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1–29.

Shiller A, Wevers R, Steenbergen G, Blau N, Jung H. Longterm course of L-dopa-responsive dystonia caused by tyrosine hydroxylase deficiency. *Neurology* 2004; 63:1524–6.

Shimoji M, Hirayama K, Hyland K, Kapatos G. GTP cyclohydrolase I gene expression in the brains of male and female hph-1 mice. *J Neurochem* 1999; 72: 757-64.

Skrygan M, Bartholomé B, Bonafé L, Blau N, Bartholomé K. A splice mutation in the GTP cyclohydrolase I gene causes dopa-responsive dystonia by exon skipping. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24: 345-51.

Söhn AS, Glöckle N, Doetzer AD, Deuschl G, Felbor U, Topka HR, et al. Prevalence of THAP1 sequence variants in German patients with primary dystonia. *Mov Disord* 2010; 25: 1982–6.

Spacey SD, Adams PJ, Lam PC, Materek LA, Stoessl AJ, Snutch TP, et al. Genetic heterogeneity in paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *Neurology* 2006; 66: 1588–90.

Stark Z, Ryan MM, Bruno DL, Burgess T, Savarirayan R. Atypical Silver-Russell phenotype resulting from maternal uniparental disomy of chromosome 7. *Am J Med Genet A* 2010; 152A: 2342–5.

Stefanova E, Djarmati A, Momcilović D, Dragasević N, Svetel M, Klein C, et al. Clinical characteristics of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia in Serbian family with Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutation. *Mov Disord* 2006; 21: 2010–5.

Steinberger D, Blau N, Goriunov D, Bitsch J, Zuker M, Hummel S, et al. Heterozygous mutation in 5'-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 2004; 5: 187–90.

Steinberger D, Korinthenberg R, Topka H, Berghäuser M, Wedde R, Müller U. Dopa-responsive dystonia: mutation analysis of GCH1 and analysis of therapeutic doses of L-dopa. German Dystonia Study Group. *Neurology* 2000; 55: 1735–7.

Steinberger D, Topka H, Fischer D, Müller U. GCH1 mutation in a patient with adult-onset oromandibular dystonia. *Neurology* 1999; 52: 877–9.

Steinberger D, Trübenbach J, Zirn B, Leube B, Wildhardt G, Müller U. Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 2007; 8: 51–5.

Steinberger D, Weber Y, Korinthenberg R, Deuschl G, Benecke R, Martinius J, et al. High penetrance and pronounced variation in expressivity of GCH1 mutations in five families with dopa-responsive dystonia. *Ann Neurol* 1998; 43: 634–9.

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, et al. Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 27989–96.

Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, Cassiman D, et al. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain*. 2008; 131: 1831–44.

Sumi-Ichinose C, Urano F, Kuroda R, Ohye T, Kojima M, Tazawa M, et al. Catecholamines and serotonin are differently regulated by tetrahydrobiopterin: a study from 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase knockout mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 41150–60.

Suzuki T, Kurita H, Ichinose H. GTP cyclohydrolase I utilizes metal-free GTP as its substrate. *Eur J Biochem* 2004; 271: 349-55.

Suzuki T, Ohye T, Inagaki H, Nagatsu T, Ichinose H. Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase I: relationship to etiology of dopa-responsive dystonia. *J Neurochem* 1999; 73: 2510–6.

Szczałuba K, Jurek M, Szczepanik E, Friedman A, Milewski M, Bal J, et al. A family with paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia: genetic and treatment issues. *Pediatr Neurol* 2009; 41: 135-8.

Tassin J, Dürr A, Bonnet AM, Gil R, Vidailhet M, Lücking CB, et al. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain* 2000; 123: 1112–21.

Tezenas du Montcel S, Clot F, Vidailhet M, Roze E, Damier P, Jedynek CP, et al. Epsilon sarcoglycan mutations and phenotype in French patients with myoclonic syndromes. *J Med Genet* 2006; 43: 394–400.

Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J* 2000; 347: 1–16.

Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E141-5.

Thornalley PJ. The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med* 1993; 14: 287–371.

Togari A, Ichinose H, Matsumoto S, Fujita K, Nagatsu T. Multiple mRNA forms of human GTP cyclohydrolase I. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 359–65.

Tomita H, Nagamitsu S, Wakui K, Fukushima Y, Yamada K, Sadamatsu M, et al. Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1688–97.

Torres GE, Sweeney AL, Beaulieu JM, Shashidharan P, Caron MG. Effect of torsinA on membrane proteins reveals a loss of function and a dominant-negative phenotype of the dystonia-associated deltaE-torsinA mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15650–55.

Trender-Gerhard I, Sweeney MG, Schwingenschuh P, Mir P, Edwards MJ, Gerhard A, et al. Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 839–45.

Uldry M, Thorens. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* 2004; 447: 480–9.

Uncini A, De Angelis MV, Di Fulvio P, Ragno M, Annesi G, Filla A, et al. Wide expressivity variation and high but no gender-related penetrance in two dopa-responsive dystonia families with a novel GCH-I mutation. *Mov Disord* 2004; 19: 1139–45.

Unterberger I, Trinka E. Diagnosis and treatment of paroxysmal dyskinesias revisited. *Ther Adv Neurol Disord* 2008; 1: 4-11.

Vale RD. AAA proteins: Lords of the ring. *J Cell Biol* 2000; 150: F13–9.

Valente EM, Edwards MJ, Mir P, DiGiorgio A, Salvi S, Davis M, et al. The epsilon-sarcoglycan gene in myoclonic syndromes. *Neurology* 2005; 64: 737–739.

Valente EM, Warner TT, Jarman PR, Mathen D, Fletcher NA, Marsden CD, et al. The role of DYT1 in primary torsion dystonia in Europe. *Brain*. 1998; 121: 2335–9.

van den Heuvel LP, Luiten B, Smeitink JA, de Rijk-van Andel JF, Hyland K, Steenberg-Spanjers GC, et al. A common point mutation in the tyrosine hydroxylase gene in autosomal recessive L-DOPA-responsive dystonia in the Dutch population. *Hum Genet* 1998; 102:644–6.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 1997; 21: 2–21.

Wang D, Kranz-Eble P, De Vivo DC. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum Mutat* 2000; 16: 224–31.

Wang D, Pascual JM, Ho Y-Y, et al. Glut-1 deficiency syndrome (Glut-1 DS): a severe phenotype associated with compound heterozygosity in trans. *Ann Neurol* 2001; 50: S125.

Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Jhung S, Sun RP, et al. Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects. *Ann Neurol*. 2005; 57: 111–8.

Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, et al. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1169–79.

Wang ZG, Delva L, Gaboli M, Rivi R, Giorgio M, Cordon-Cardo C, et al. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 1998a; 279: 1547-51.

Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet*. 1998b; 20: 266-72.

Weber Y, Steinberger D, Deuschl G, Benecke R, Müller U. Two previously unrecognized splicing mutations of GCH1 in Dopa-responsive dystonia: exon skipping and one base insertion. *Neurogenetics* 1997; 1: 125–7.

Weber Y, Kamm C, Suls A, Kempfle J, Kotschet K, Schule R, et al. Paroxysmal choreoathetosis/spasticity (DYT9) is caused by a GLUT1 defect. *Neurology* 2011; 77:959–64.

Weber YG, Lerche H. Genetics of paroxysmal dyskinesias. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2009; 9: 206-11.

Weber YG, Storch A, Wuttke TV, Brockmann K, Kempfle J, Maljevic S, et al. GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest* 2008; 118: 2157–68.

Wider C, Melquist S, Hauf M, Solida A, Cobb SA, Kachergus JM, et al.: Study of a Swiss doparesponsive dystonia family with a deletion in GCH1: redefining DYT14 as DYT5. *Neurology* 2008; 70: 1377–83.

Wu Z, Lin Y, Chen W, Zhao G, Xie H, et al. Molecular analyses of GCH-1, TH and parkin genes in Chinese dopa-responsive dystonia families. *Clin Genet* 2008; 74:513–21.

Xiao J, Uitti RJ, Zhao Y, Vemula SR, Perlmutter JS, Wszolek ZK, et al. Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia. *Ann Neurol* 2012; 71:458-69.

Xiao J, Zhao Y, Bastian RW, Perlmutter JS, Racette BA, Tabbal SD, et al. Novel THAP1 sequence variants in primary dystonia. *Neurology* 2010; 74: 229–38.

Yokoi F, Dang MT, Li J, Li Y. Myoclonus, motor deficits, alterations in emotional responses and monoamine metabolism in epsilon-sarcoglycan deficient mice. *J Biochem* 2006; 140: 141–6.

Yokoi F, Dang MT, Mitsui S, Li Y. Exclusive paternal expression and novel alternatively spliced variants of epsilon-sarcoglycan mRNA in mouse brain. *FEBS Lett* 2005; 579: 4822–8.

Yokoi F, Dang MT, Yang G, Li J, Doroodchi A, Zhou T, Li Y. Abnormal nuclear envelope in the cerebellar Purkinje cells and impaired motor learning in DYT11 myoclonus-dystonia mouse models. *Behav Brain Res* 2012a; 227: 12-20.

Yokoi F, Dang MT, Zhou T, Li Y. Abnormal nuclear envelopes in the striatum and motor deficits in DYT11 myoclonus-dystonia mouse models. *Hum Mol Genet* 2012b; 21:916-25.

Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 1997; 80: 1046–51.

Young CD, Anderson SM. Sugar and fat—that’s where it’s at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 202.

Zeman W, Dyken P: Dystonia musculorum deformans; clinical, genetic and pathoanatomical studies. *Psychiatr Neurol Neurochir* 1967; 70: 77–121.

Zeman W, Kaelbling R, Pasamanick B. Idiopathic dystonia musculorum deformans: I. The hereditary pattern. *Am J Hum Genet* 1959; 11: 188–202.

Zeman W, Kaelbling R, Pasamanick B. Idiopathic dystonia musculorum deformans: II. The formes frustes. *Neurology* 1960; 10: 1068–75.

Zeman W: Dystonia: An overview. *Adv Neurol* 1976; 14: 91–103.

Zeman W: Pathology of the torsion dystonias (dystonia musculorum deformans). *Neurology* 1970; 20: 79–88.

Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, et al. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet.* 2001; 29: 66–9.

Zirn B, Grundmann K, Huppke P, Puthenparampil J, Wolburg H, Riess O, et al. Novel TOR1A mutation p.Arg288Gln in early-onset dystonia (DYT1). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008a; 79: 1327–30.

Zirn B, Steinberger D, Troidl C, Brockmann K, von Der Hagen M, Feiner C, et al. Frequency of GCH1 deletions in dopa-responsive dystonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008b; 79: 183–6.

Zittel S, Moll CK, Brüggemann N, Tadic V, Hamel W, Kasten M, et al. Clinical neuroimaging and electrophysiological assessment of three DYT6 dystonia families. *Mov Disord* 2010; 25: 2405–12.

Zorzi G, Castellotti B, Zibordi F, Gellera C, Nardocci N. Paroxysmal movement disorders in GLUT1 deficiency syndrome. *Neurology* 2008; 71: 146–8.

Zorzi G, Garavaglia B, Invernizzi F, Girotti F, Soliveri P, Zeviani M, et al. Frequency of DYT1 mutation in early onset primary dystonia in Italian patients. *Mov Disord.* 2002; 17: 407–8.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Valerija Dobričić, rođena Opačić, rođena je u Sisku, republika Hrvatska, 09.05.1980. godine. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 1998/99. godine, a diplomirala je u maju 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,86 i diplomskim radom pod nazivom „*Analiza haplotipova na Y hromozomu u populaciji Srbije i Crne Gore*“. U toku osnovnih studija bila je dobitnik većeg broja nagrada kao najbolji student u svojoj generaciji.

Školske 2003/2004. upisala je poslediplomske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i biohemija. Od tada je i stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Magistrirala je na Biološkom fakultetu u Beogradu u decembru 2005. godine sa prosečnom ocenom 10,0 i temom „*Longitudinalna studija ekspanzija GAA ponovaka u genu za frataksin*“.

Od juna 2006. do novembra 2008. godine bila je zaposlena na Biološkom fakultetu kao istraživač saradnik na projektu Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije „Molekularna genetika naslednih neurodegenerativnih i psihijatrijskih oboljenja“. Od novembra 2008. godine zaposlena je na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije kao molekularni biolog u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti. Od 2011. godine angažovana je na projektima „Analiza genetičkih markera mišićne distonije“ i „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma: kliničke, morfološke i molekularno-genetičke korelacije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

U toku 2011. godine usavršavala se na Institutu za neurologiju univerzitetskog koledža u Londonu.

Tečno govori engleski, a služi se i nemačkim jezikom.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ мр Валерија Добричић _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____ Студија генетске основе примарних дистонија у _____
_____ популацији Србије _____

Ментор _____ проф. др Ивана Новаковић _____

Потписани _____ мр Валерија Добричић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____ 08.02.2013. _____

Valerija Dobricic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Студија генетске основе примарних дистонија у популацији Србије

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, ____ 08.02.2013. ____

Бенјамин Убојић