

THE ROLE OF GENE MODIFIERS ON CLINICAL COURSE OF  
DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHYULOGA GENA MODIFIKATORA NA KLINIČKI TOK DIŠENOVE  
MIŠIĆNE DISTROFIJEAna Kosac<sup>1,2</sup>, Vedrana Milić Rašić<sup>1,2</sup>, Dušanka Savić Pavićević<sup>3</sup>, Ružica Kravljanc<sup>1,4</sup><sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija<sup>2</sup> Klinika za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd, Srbija<sup>3</sup> Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija<sup>4</sup> Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", Beograd, Srbija

Correspondence: kosacana@gmail.com

## Abstract

Duchenne muscular dystrophy is the most common inherited muscle disease in childhood, which has a progressive clinical course with a fatal outcome that most often occurs between the second and fourth decade of life. The disease is inherited X-linked, recessively, and in two-thirds of patients, it is transmitted from the mother, while in the remaining third of patients, it is a *de novo* mutation. Mutations in the dystrophin gene (*DMD* gene) such as deletions, duplications and small mutations can be found throughout the entire length of the gene. The disease begins between the third and fifth year of life, and the initial muscle weaknesses are clinically manifested as slower running, difficulty climbing stairs or difficulty getting up from squats. Sometimes, accidentally discovered, elevated keratin kinase values or delayed early psychomotor development milestones in a child with hypertrophic calves can initiate a diagnostic procedure in the direction of Duchenne muscular dystrophy. The disease usually has a uniform clinical course and implies a clear time sequence of events. Muscle weakness leads to loss of ambulation, then the function of the upper extremities, to complete immobility, with the evolution of dilated cardiomyopathy and respiratory insufficiency, which are the main causes of death. Certain patients show deviations from the above in terms of longer functionality and later loss of independent ambulation, later cardiomyopathy and respiratory insufficiency and vice versa. It is believed that in addition to the application of modern standards of care and treatment of patients, the clinical course is influenced by genes independent of the causal *DMD* gene, which affects processes in dystrophic muscle, primarily inflammation, fibrosis and fatty infiltration, through specific signaling pathways. So far, six genes have been described whose variants modify the course of Duchenne muscular dystrophy. The secreted phosphoprotein 1 (*SPP1*) is the first described gene whose G allele in the variant rs28357094 is associated with an earlier age of gait loss. In addition, variants in the genes described are *LTBP4* (latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 4), *CD40*, *ACTN3* (actinin 3), *THBS1* (thrombospondin 1) and *TCTEX1D1* (Tctex1 domain containing 1).

The aim of this paper is to present already-known genes that modify Duchenne muscular dystrophy and their influence on the clinical course of the disease.

## Keywords:

Duchenne muscular  
dystrophy,  
gene modifiers,  
*SPP1*,  
*LTBP4*,  
*CD40*

## Sažetak

Dišenova mišićna distrofija je najčešća nasledna bolest mišića u dečjem uzrastu. Ima progresivan klinički tok sa smrtnim ishodom koji najčešće nastaje u uzrastu od druge do četvrte decenije života. Bolest se nasleđuje X-vezano, recesivno i u dve trećine pacijenata prenosi se preko majke, dok je u preostaloj trećini pacijenata u pitanju *de novo* mutacija. Mutacije u genu za distrofin (*DMD* genu) tipa delecija, duplikacija i malih mutacija mogu se naći celom dužinom gena. Bolest počinje između treće i pete godine života, a inicijalne mišićne slabosti klinički se manifestuju kao sporije trčanje, otežano penjanje uz stepenice ili otežano ustajanje iz čučnja. Nekada, slučajno otkrivene, povišene vrednosti keratin kinaze ili usporeno usvajanje miljokaza ranog psihomotornog razvoja kod deteta sa hipertrofičnim listovima mogu pokrenuti dijagnostički postupak u pravcu Dišenove mišićne distrofije. Bolest najčešće ima uniforman klinički tok i podrazumeva vremenski jasan sled događaja. Mišićne slabosti vode ka gubitku hoda, potom i funkcije gornjih ekstremiteta, do potpune imobilnosti, uz pojavu dilatativne kardiomiopatije i respiratorne insuficijencije, koje su glavni uzrok smrtnog ishoda. Određeni pacijenti pokazuju odstupanja od navedenog u smislu duže funkcionalnosti i kasnijeg gubitka samostalnog hoda, kasnije nastale kardiomiopatije i respiratorne insuficijencije i vice versa. Smatra se da, pored primene savremenih mera nege i lečenja obolelih, uticaj na klinički tok imaju i geni nezavisni od kauzalnog *DMD* gena, koji utiču na procese u distrofičnom mišiću, pre svega na proces inflamacije, fibroze i masne infiltracije, preko specifičnih signalnih puteva. Do sada je opisano šest gena čije varijante modifikuju tok Dišenove mišićne distrofije. Sekretovani fosfoprotein 1 (engl. *secreted phosphoprotein 1, SPP1*) prvi je opisani gen čiji je G-alel varijante rs28357094 udružen sa ranijim uzrastom gubitka hoda. Pored navedenog, opisane su i varijante u sledećim genima: latentnom transformišućem faktoru rasta beta vezujućem proteinu 4 (engl. *latent transforming growth factor-β binding protein 4, LTBP4*), CD40, aktininu 3 (engl. *actinin 3, ACTN3*), trombospondinu 1 (engl. *thrombospondin 1, THBS1*) i *TCTEX1D1* (engl. *Tctex1-domain containing 1*).

Cilj rada je predstavljanje do sada poznatih gena modifikatora Dišenove mišićne distrofije i njihovog uticaja na klinički tok bolesti.

### Ključne reči:

Dišenova mišićna distrofija, geni modifikatori, *SPP1*, *LTBP4*, *CD40*

## Uvod

Dišenova mišićna distrofija (*DMD*) je najčešća nasledna bolest mišića, sa početkom u dečjem dobu, koja se nasleđuje X-vezano, recesivno i javlja se u oko 1 u 5.000 do 10.000 novorođene muške dece (1). Mutacija u *DMD* genu odgovorna je za kliničku sliku distrofinopatija. Ukoliko je povezana sa gubitkom funkcije i nemogućnošću sinteze proteina distrofina usled poremećaja okvira čitanja transkripta, uzrokuje najteži oblik distrofinopatije – Dišenu mišićnu distrofiju (2). Gen *DMD* ima 79 egzona i prostire se na 2,2 Mb. Najčešći tip mutacija u *DMD* genu su delecije jednog ili nekoliko egzona, koje su prisutne kod oko 68% bolesnika, duplikacije jednog ili nekoliko egzona kod 11%, dok preostalih oko 20% čine male mutacije (tačkaste mutacije, male delecije i insercije). Iako delecije i duplikacije egzona mogu nastati na bilo kom mestu u *DMD* genu, ipak postoje regioni u kojima se mutacije češće dešavaju i to između egzona 45 i 55 za delecije, a između 2. i 10. egzona za duplikacije (3). Mutacije po tipu delecija i duplikacija dovode do pomeranja okvira čitanja, uzrokuju inkorporaciju neadekvatnih aminokiselina uz formiranje prevremenog stop kodona, dovodeći do prevremene terminacije translacije i izostanka produkcije funkcionalnog proteina distrofina. S druge strane, tačkaste mutacije u *DMD* genu ostvaruju efekat formiranjem prevremenog stop kodona, uzrokujući prekid dalje sinteze proteina

distrofina. Osnovna uloga distrofina je stabilizacija mišićnog vlakna tokom kontrakcije, koju ostvaruje povezivanjem aktinskih filamenata citoskeleta u mišićnim vlaknima sa ekstracelularnim matriksom koji okružuje vlakna.

## Klinička slika Dišenove mišićne distrofije

Prve manifestacije *DMD* mogu se javiti veoma rano, u vidu usporenog usvajanja miljokaza psihomotornog razvoja. Na bolest se može posumnjati i nakon slučajno otkrivenih veoma povišenih vrednosti kreatin kinaze u serumu, dok su ipak najčešći prvi simptomi bolesti mišićne slabosti, koje se uočavaju u periodu između treće i pete godine života. Roditelji opisuju da dete u ovom uzrastu sporije trči od vršnjaka, da se otežano penje uz stepenice, kao i da otežano ustaje iz čučnja.

Klinička slika *DMD* je najčešće tipična i podrazumeva nezaustavljiv sled događaja - mišićne slabosti koje uzrokuju gubitak sposobnosti samostalnog hoda, vodeći u potpunu imobilnost, dilatativnu kardiomiopatiju (DK), respiratornu insuficijenciju i letalan ishod između druge i četvrte decenije života (4). Izuzeci od pravila su opisani i predmet su interesovanja brojnih istraživanja sa pitanjem šta to modifikuju klinički tok bolesti (5-8).

## Terapijski pristupi u Dišenovoj mišićnoj distrofiji

Najvažnije smernice u lečenju i nezi obolelih od DMD date su u preporukama grupe autora, koje obuhvataju sve aspekte oboljenja i prikazane su kroz definisane faze bolesti (9-11). Multidisciplinarni pristup u lečenju podrazumeva postavljanje bolesnika u centar interesovanja lekara različitih specijalnosti, čija mišljenja objedinjuje neurolog koji prati klinički tok bolesti. Simptomatsko lečenje predstavlja osnov terapije obolelih od DMD, a kortikosteroidna (KS) terapija je glavna farmakološka mera. U kliničkoj praksi i sprovedenim kliničkim studijama potvrđen je pozitivan uticaj KS na tok bolesti, kako pre, tako i posle gubitka mogućnosti samostalnog hoda (12-14). Najčešće se savetuje primena prednizona u dnevnoj dozi 0,75 mg/kg ili deflazakorta u dnevnoj dozi od 0,9 mg/kg (4).

Kauzalna terapija za sve obolele od DMD ne postoji, te njeno pronalaženje predstavlja cilj mnogobrojnih istraživačkih centara i aktivnih kliničkih studija. Genetička osnova bolesti imala je presudan uticaj u dosadašnjem otkrivanju novih lekova. Na osnovu tipa mutacije u *DMD* genu formirane su strategije prevazilaženja problema potpunog nedostatka proteina distrofina. Na ovaj način, sprovedenim kliničkim studijama, dobijeni su pozitivni rezultati i registrovane prve genetički dizajnirane kauzalne terapije koje su podobne za lečenje manjeg broja obolelih sa specifičnim tipovima mutacija u *DMD* genu. Evropska agencija za lekove registrovala je ataluren – podoban za primenu kod 10 - 15% obolelih sa tačkastom mutacijom u *DMD* genu koja stvara stop kodon (engl. *nonsense mutation*) (15-17). Lek je registrovan za obolele koji su pokretni i uzrasta dve godine i stariji i primenjuje se *per os* u tri dnevne doze. Američka agencija za hranu i lekove registrovala je preparate iz grupe novih terapija koji dovode do preskakanja egzona (engl. *exon skipping*) i to vezane za egzon 51, 45 i 53 u *DMD* genu (18-20). Lekovi se primenjuju intravenoskim putem, jednom nedeljno, takođe samo kod obolelih sa specifičnim tipovima mutacija u *DMD* genu podobnim za terapiju preskakanja egzona 51, 45 ili 53. Navedenim terapijama je u kliničkim studijama dostignuta statistička značajnost u količini proizvedenog proteina distrofina, kvantifikovanoj primenom *western blot* testa iz biopsija mišića obolelih, na osnovu čega se u komercijalnoj primeni očekuje i klinički benefit, koji dosadašnjim kliničkim ispitivanjima nije dosegao statističku značajnost.

## Heterogenost, naočigled uniformnog kliničkog toka Dišenove mišićne distrofije

U planiranju kliničkih studija važno mesto imaju studije prirodnog toka bolesti u okviru kojih se uočavaju odstupanja od očekivanog kliničkog toka DMD. U francuskoj studiji, koja je uključila 278 obolelih od DMD, izdvojila su se dva klinički ekstremna fenotipa. Težak fenotip

podrazumevao je gubitak samostalnog hoda u proseku u uzrastu od 7,10 godina i prestanak plućnog „rasta“ na uzrastu 10,26 godina, dok je u grupi obolelih sa blagim DMD fenotipom mobilnost izgubljena u proseku sa 12,01 godina, a zabeležen plućni zastoj u razvoju sa 14,58 godina. Ova varijabilnost fenotipa nije bila uslovljena specifičnim spektrom mutacija u *DMD* genu (7).

S druge strane, retki oboleli sa određenim mutacijama u okviru samog *DMD* gena mogu imati nešto povoljniju prognozu. To su oboleli sa delecijom egzona 3-7 u *DMD* genu, kao i oboleli podobni za preskakanje egzona 44, u okviru kojih većina ima deleciju egzona 45 (21,22). Smatra se da kod ovih obolelih dolazi do spontanog preskakanja egzona u *DMD* genu, čime se ponovo uspostavlja okvir čitanja i posledično stvara određena količina proteina distrofina.

Nameće se pitanje: Šta to još modifikuje klinički tok DMD i da li bi se ta biološka prednost mogla iskoristiti u kreiranju kliničkih istraživanja u oblasti lečenja DMD?

## Genetički modifikatori kliničkog toka Dišenove mišićne distrofije

Nakon sprovedenih dobro definisanih istraživanja zaključeno je da i geni nezavisni od kauzalnog *DMD* gena imaju uticaj na klinički tok DMD. Ovi geni utiču na procese u distrofičnom mišiću, u prvom redu na procese inflamacije, fibroze i masne infiltracije, preko specifičnih signalnih puteva. Do sada je opisano šest gena čije varijante modifikuju tok DMD. Sekretovani fosfoprotein 1 (engl. *secreted phosphoprotein 1, SPP1*) prvi je opisan gen čiji je G-alel varijante rs28357094 udružen sa ranijim uzrastom gubitka hoda. Pored navedenog, opisane su i varijante sledećim genima: latentnom transformišućem faktoru rasta beta vezujućem proteinu 4 (engl. *latent transforming growth factor-β binding protein 4, LTBP4*), *CD40*, aktininu 3 (engl. *actinin 3, ACTN3*), trombospondinu 1 (engl. *thrombospondin 1, THBS1*) i *TCTEX1D1* (engl. *Tctex1-domain containing 1*).

Specifične varijante u opisanim genima usporavaju progresiju bolesti, što je najčešće pokazano kroz odlaganje vremena gubitka samostalnog hoda za, u proseku, jednu do dve godine (23). Najčešći način otkrivanja gena-modifikatora bolesti jeste ispitivanje odabranih gena sa već poznatom ulogom u patogenezi DMD. S druge strane, primenom novih tehnologija, kao što je sekvenciranje celokupnog egzoma, kod obolelih sa ekstremnim DMD fenotipom (težkim i blažim oblikom bolesti), mogu se otkriti novi geni - modifikatori bolesti. To je bio slučaj sa poslednjom opisanom varijantom u genu *TCTEX1D1* na hromozomu 1 (24).

Prva je opisana varijanta u promotoru gena *SPP1*, koji kodira citokin osteopontin, uključen u procese regeneracije, inflamacije i tumorske proliferacije (25). U fibroblastima mišića koji ne ekspimiraju distrofin, osteopontin povećava ekspresiju kolagena podsticanjem signalnog puta transformišućeg faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta, TGFβ*) indukcijom MMP9



proteinaze (26). G-alel varijante rs28357094 promotora *SPP1* gena je po dominantnom modelu udružen sa ranijim gubitkom hoda. Istraživanje je sprovedeno u populaciji italijanske DMD mreže, koja je uključila 80 obolelih (27). Validacionim studijama, koje su uključile veći broj ispitanika, 283 obolelih od DMD i duži vremenski period praćenja, potvrđena je uloga navedene varijante na klinički tok obolelih od DMD. U studijama koje su usledile analizirane su stratifikovane subpopulacije prema podatku o upotrebi KS terapije u jednogodišnjem periodu pre gubitka sposobnosti samostalnog hoda. Na osnovu dobijenih rezultata, varijanta rs28357094 definisana je više kao farmakodinamski marker odgovora na KS terapiju nego kao direktni modifikator toka bolesti (28). Naime, u grupi obolelih koji su koristili KS terapiju G-alel rs28357094 je prema dominantnom modelu bio povezan sa nepovoljnijim kliničkim tokom i ovi oboleli gubili su sposobnost hoda u proseku dve godine ranije, dok je kod obolelih bez KS terapije klinička progresija u oba genotipa bila slična.

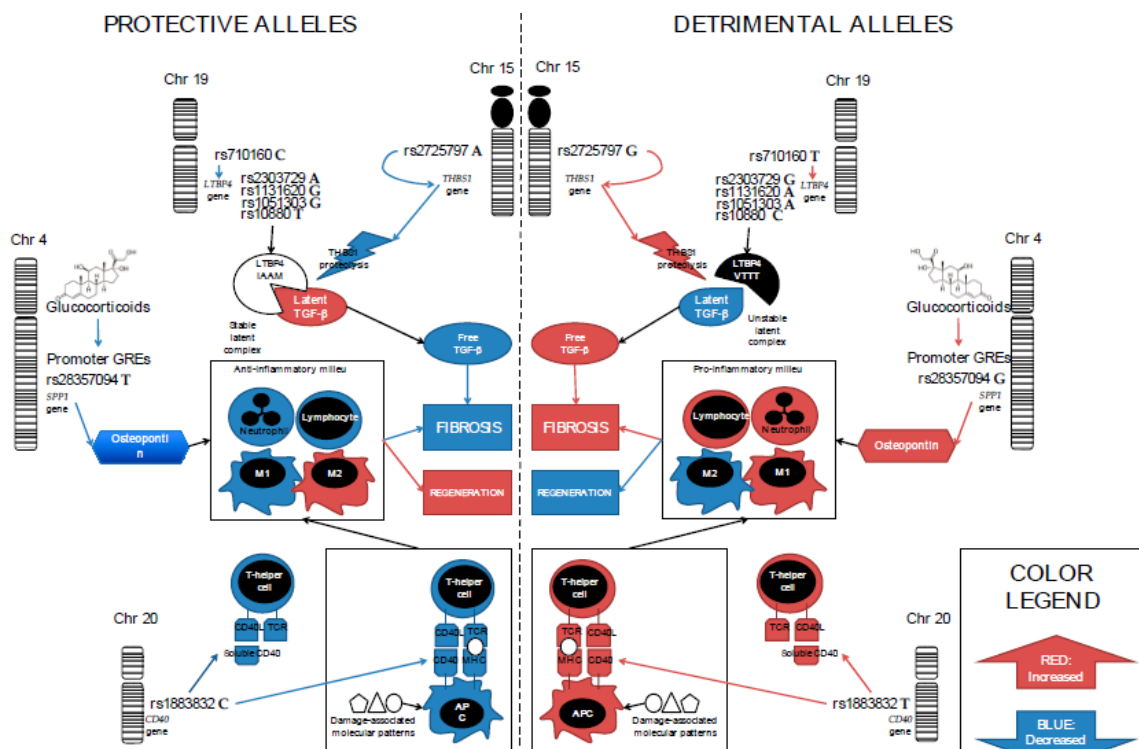
Gen *LTBP4* opisan je kao gen modifikator DMD 2013. godine. Haplotip IAAM gena *LTBP4* je povezan sa kasnijim gubitkom sposobnosti samostalnog hoda (29). *LTBP4* protein je deo TGF $\beta$  signalnog puta sa ulogom u fibrozi (30). Rezultate primarne studije potvrdili su i drugi autori u evropskoj populaciji obolelih, naglašavajući da je IAAM haplotip povezan sa produženom mobilnošću DMD pacijenata, što je rezultat dobijen multicentričnom studijom na 265 obolelih (31). Efekat genotipa *LTBP4* je procenjen u CINRG-DNHS kohorti, čiji su pacijenti multietničkog porekla i u celoj kohorti nije postignuta statistički značajna povezanost sa uzrastom gubitka hoda. Kada su podaci odvojeno analizirani u manjoj podgrupi bolesnika

bele rase, T-alel rs10880 bio je prema recesivnom modelu značajno povezan sa produženom mobilnošću (28).

Varijanta u članu 5 superfamilije receptora faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*, TNFRSF5), koji je označen kao gen *CD40*, opisana je kao treći gen modifikator DMD. Otkriven je istraživanjima kroz selekciju 438 gena koji pripadaju putevima nuklearnih faktora kapa B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) i TGF $\beta$ . Efekat ređeg T-alela varijante rs1883832 *CD40* gena po dominantnom modelu pokazan je kod 109 ispitanika evropskog porekla obolelih od DMD. Ovaj rezultat validiran je u multicentričnoj kohorti od 660 obolelih i povezan je sa, u proseku, jednom godinom ranijeg gubitka sposobnosti samostalnog hoda (32).

Prva tri opisana gena modifikatora ostvaruju svoj efekat preko dva signalna puta (TGF $\beta$  i NF- $\kappa$ B), koji se ukrštaju u svojim aktivnostima (slika 1) (33).

Preostala tri gena modifikatora DMD su: aktin 3 - *ACTN3* i opisana varijanta rs1815739, koji je važna komponenta sarkomere, ekspirira se u brzim glikoličkim vlaknima (34); trombospondin *THBS1* kao važan aktivator TGF $\beta$  i njegova varijanta rs2725797, čiji ređi alel smanjuje ekspresiju *THBS1*, uzrokujući prosečno kasniji uzrast gubitka hoda (35). Poslednji opisani gen modifikator DMD je *TCTEX1D1*. Ovaj gen jedini je otkriven primenom metode sekvenciranja celog egzoma pacijenata obolelih od DMD sa klinički ekstremnim manifestacijama bolesti u smislu značajne razlike u uzrastu gubitka hoda i pojave kardiomiopatije. *TCTEX1D1* je prvi gen modifikator bolesti otkriven na ovaj način u grupi pacijenata sa neuromišićnim oboljenjima, što je izvedeno zahvaljujući dobroj fenotipizaciji obolelih i snažnoj internacionalnoj



**Slika 1.** Dijagram molekularnih mehanizama predložen za objašnjenje asocijacija varijanti gena modifikatora sa fenotipom Dišenove mišićne distrofije. Plava boja označava molekule, puteve ili biološke procese koji su smanjeni zajedno sa određenim genotipom, dok crvena boja označava one koji su povećani. Na levoj strani su predstavljeni zaštitni aleli varijanti modifikatora i njihove posledice, dok desna strana predstavlja štetne alele. Modifikovano prema Bello et al 2019.

saradnji. Analiza je sprovedena u populaciji dve grupe obolelih, onih koji su izgubili sposobnost samostalnog hoda pre 8,5 godina i onih nakon 12. godine života, kao i kod obolelih kod kojih je kardiomiopatija dijagnostikovana već u 13. godini života i onih koji i posle 28. godine nemaju znake značajnog narušavanja srčane funkcije. Ovim pristupom analizirano je 242 potencijalnih varijanti koje su validirane u multicentričnoj evropskoj kohorti koju čini 301 oboleli sa DMD, kao i u drugoj nezavisnoj američkoj kohorti, koju čine oboleli evropskog porekla. Sprovedenim istraživanjem izdvojile su se dve varijante u *TCTEX1D1* genu – rs1060575 i rs3816989, čiji su manje učestali aleli, uzrokujući smanjenu ekspresiju *TCTEX1D1*, bili povezani sa bržom progresijom bolesti (24).

Najveći broj istraživanja fokusiran je na uticaj gena modifikatora DMD na motorni ishod oboljenja kao markera progresije, a to su slabost skeletne muskulature i vreme gubitka hoda.

## Značaj gena modifikatora u Dišenovoj mišićnoj distrofiji

Geni modifikatori DMD utiču i na vreme pojave respiratorne slabosti i insuficijencije, kao i na kontraktilnost i volumen leve srčane komore koji vode u dilatativnu kardiomiopatiju. Pojava ozbiljnih kardioloških manifestacija bolesti ne mora uvek da korelira sa težinom zahvaćenosti skeletne muskulature u nekim situacijama kod mutacija u početnom delu *DMD* gena, naprotiv. U nedavno objavljenoj studiji Belo i saradnici analizirali su uticaj *SPP1* i zaključili da postoji negativan efekat dominantnog GG genotipa rs28357094 na forsirani vitalni kapacitet (FVC) i na plućne funkcionalne testove (PFT) u srednjem periodu praćenja od 4,5 godine (36). Za razliku od efekta na skeletne mišiće, dominantni GG genotip rs28357094 bio je povezan sa 5 godina kasnijom pojavom DK (37). U istoj studiji je analiziran efekat genotipa *CD40* na plućnu funkciju. Pokazalo se, sa značajnim negativnim efektom, da je T-alel rs1883832 po aditivnom modelu bio povezan sa nižim FVC i ranijim gubitkom hoda, kao i ranijom upotrebom neinvazivne ventilacije kod obolelih od DMD (36). Za razliku od *SPP1* i *CD40*, varijante u *LTBP4* genu nisu pokazale povezanost sa PFT kod odabranih obolelih od DMD (36).

Otkriće gena modifikatora DMD je važno iz više razloga. Na prvom mestu, u pitanju je dodatni genetički činilac koji ima uticaj na klinički tok i progresiju DMD. Do sada nisu sprovedene studije udruženog uticaja svih opisanih gena modifikatora. Moguće je da bi ovaj zajednički uticaj na klinički tok bio veći od pojedinačnog, imajući u vidu da većina gena modifikatora ostvaruje efekat preko signalnih puteva čije se delovanje ukršta. Na drugom mestu, geni modifikatori DMD imaju važnu ulogu u planiranju istraživanja na polju pronalaska novih terapijskih pristupa. Medikamentoznim potenciranjem efekta određene varijante gena modifikatora moglo bi se uticati na pojavu nešto lakšeg fenotipa DMD. Takođe, geni modifikatori

moгу imati i važnu ulogu u planiranju kliničkih studija i to u stratifikaciji obolelih prema genotipu, što bi omogućilo formiranje homogenijih grupa unutar kojih bi analiza rezultata bila egzaktnija.

S druge strane, prognostički efekat gena modifikatora kod pojedinačnog bolesnika nema veliki značaj jer je potrebno uzeti u obzir veliki broj drugih varijabli pojedinca, kako genetičkih, tako i sredinskih, kao i njihovu interakciju. Ovo je polje koje će u budućnosti ostati prijemučivo istraživačima koji tragaju za odgovorom kako bolje razumeti DMD i kako se približiti pronalasku specifične kauzalne terapije ovog teškog oboljenja. Do tada ostaje potreba da se i u našoj populaciji obolelih od DMD sprovede istraživanje uticaja svih gena modifikatora na klinički tok bolesti, što je i započeto od strane autora ovog rukopisa (38).

## Literatura

1. Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12(1):79.
2. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002; 359(9307):687-95.
3. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2016; 53(3):145-51.
4. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1):77-93.
5. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003; 2(12):731-40.
6. Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, et al. Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One.* 2009; 4(2):e4347.
7. Humbertclaude V, Hamroun D, Bezzou K, Bérard C, Boespflug-Tanguy O, Bommelaer C, et al. Motor and respiratory heterogeneity in Duchenne patients: implication for clinical trials. *Eur J Paediatr Neurol.* 2012; 16(2):149-60.
8. Hufton M, Roper H. Variations in Duchenne muscular dystrophy course in a multi-ethnic UK population: potential influence of socio-economic factors. *Dev Med Child Neurol.* 2017; 59(8):837-42.
9. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* 2018; 17(3):251-67.
10. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Alman BA, Apkon SD, Blackwell A, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018; 17(4):347-61.
11. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Colvin MK, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol.* 2018; 17(5):445-55.
12. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1):CD003725.
13. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Duong T, Joyce NC, Hu F, et al. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet.* 2018;

- 391(10119):451-61.
14. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur A. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Sys Rev.* 2016; (5):CD003725.
  15. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* 2015; 36(4), 395-402.
  16. Bello L, Pegoraro E. Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2016; 35(3):122-7.
  17. Laing NG, Davis MR, Bayley K, Fletcher S, Wilton SD. Molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. *Clin Biochem Rev.* 2011; 32(3):129-34.
  18. Wagner KR, Kuntz NL, Koenig E, East L, Upadhyay S, Han B, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial. *Muscle Nerve.* 2021; 64(3):285-92.
  19. Clemens PR, Rao VK, Connolly AM, Harper AD, Mah JK, Smith EC, et al. Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2020; 77(8):982-91.
  20. McDonald CM, Shieh PB, Abdel-Hamid HZ, Connolly AM, Ciafaloni E, Wagner KR, et al. Open-Label Evaluation of Eteplirsen in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 51 Skipping: PROMOTI Trial. *J Neuromuscul Dis.* 2021; 8(6):989-1001.
  21. van den Bergen JC, Ginjaar HB, Niks EH, Aartsma-Rus A, Verschuuren JJ. Prolonged Ambulation in Duchenne Patients with a Mutation Amenable to Exon 44 Skipping. *J Neuromuscul Dis.* 2014; 1(1):91-4.
  22. Winnard AV, Mendell JR, Prior TW, Florence J, Burghes AH. Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(1):158-66.
  23. Bello L, Pegoraro E. The "Usual Suspects": Genes for Inflammation, Fibrosis, Regeneration, and Muscle Strength Modify Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med.* 2019; 8(5):649.
  24. Spitali P, Zaharieva I, Bohringer S, Hiller M, Chaouch A, Roos A, et al. TCTEX1D1 is a genetic modifier of disease progression in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2020; 28(6):815-25.
  25. Pegoraro E, Hoffman EP, Piva L, Gavassini BF, Cagnin S, Ermani M, et al. SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2011; 76(3):219-26.
  26. Kramerova I, Kumagai-Cresse C, Ermolova N, Mokhonova E, Marinov M, Capote J, et al. Spp1 (osteopontin) promotes TGFβ processing in fibroblasts of dystrophin-deficient muscles through matrix metalloproteinases. *Hum Mol Genet.* 2019; 28(20):3431-42.
  27. Bello L, Piva L, Barp A, Taglia A, Picillo E, Vasco G, et al. Importance of SPP1 genotype as a covariate in clinical trials in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2012; 79(2):159-62.
  28. Bello L, Kesari A, Gordish-Dressman H, Cnaan A, Morgenroth LP, Punetha J, et al. Genetic modifiers of ambulation in the Cooperative International Neuromuscular Research Group Duchenne Natural History Study. *Ann Neurol.* 2015; 77(4):684-96.
  29. Flanigan KM, Ceco E, Lamar KM, Kaminoh Y, Dunn DM, Mendell JR, et al. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013; 73(4):481-8.
  30. Heydemann A, Ceco E, Lim JE, Hadhazy M, Ryder P, Moran JL, et al. Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119(12):3703-12.
  31. van den Bergen JC, Hiller M, Böhringer S, Vijfhuizen L, Ginjaar HB, Chaouch A, et al. Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: a multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015; 86(10):1060-5.
  32. Bello L, Flanigan KM, Weiss RB; United Dystrophinopathy Project, Spitali P, Aartsma-Rus A, et al. Association Study of Exon Variants in the NF-κB and TGFβ Pathways Identifies CD40 as a Modifier of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2016; 99(5):1163-71.
  33. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF-β/Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9(1):a022137.
  34. Hogarth MW, Houweling PJ, Thomas KC, Gordish-Dressman H, Bello L; Cooperative International Neuromuscular Research Group (CINRG), et al. Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2017; 8:14143.
  35. Weiss RB, Vieland VJ, Dunn DM, Kaminoh Y, Flanigan KM; United Dystrophinopathy Project. Long-range genomic regulators of THBS1 and LTBP4 modify disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2018; 84(2):234-45.
  36. Bello L, D'Angelo G, Villa M, Fusto A, Vianello S, Merlo B, et al. Genetic modifiers of respiratory function in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020; 7(5):786-98.
  37. Barp A, Bello L, Politano L, Melacini P, Calore C, Polo A, et al. Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0141240.
  38. Kosac A, Pesovic J, Radenkovic L, Brkusanin M, Radovanovic N, Djuricic M, et al. LTBP4, SPP1, and CD40 Variants: Genetic Modifiers of Duchenne Muscular Dystrophy Analyzed in Serbian Patients. *Genes.* 2022; 13(8):1385.