

디스트로핀 유전자에 새로이 발견된 불연속적 엑손 중복을 보이는 Duchenne형 근디스트로피 환자 5예

Novel Non-contiguous Duplications in the *DMD* Gene in Five Patients with Duchenne Muscular Dystrophy

임정훈¹ · 조선미¹ · 유 내¹ · 이경아^{1,2}

John Hoon Rim, M.D.¹, Sun-Mi Cho, M.D.¹, Nae Yu, M.D.¹, Kyung-A Lee, M.D.^{1,2}

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 연세대학교 의과대학 신경근육병 재활연구소²

Department of Laboratory Medicine¹, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Rehabilitation², Institute of Neuromuscular Disease, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Muscular dystrophy is an X-linked recessive disorder caused by mutations in the *DMD* gene. Muscular dystrophy is classified into 2 types; Duchenne muscular dystrophy (DMD), which has severe clinical symptoms, and Becker muscular dystrophy (BMD), which has much milder clinical symptoms. Phenotypic progression to either DMD or BMD can be predicted by analyzing mutations in *DMD* by using the reading frame rule.

Methods: Of 88 patients with mutations in *DMD*, which were detected using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification DMD test kit (MRC-Holland, The Netherlands), medical records of 5 patients with non-contiguous duplications were reviewed. These rare non-contiguous duplications in *DMD* were compared with those reported previously.

Results: We identified 3 novel non-contiguous duplications in *DMD* that included exons 2-7 and 45-51, exons 5-37 and 50-59, and exons 52-53 and 56-61. The 5 patients with these non-contiguous duplications showed the phenotypic features of DMD. Especially, duplication of exons 52-53 and 56-61 was observed in a family, i.e., 2 DMD-affected brothers and their carrier mother.

Conclusions: Prediction of phenotypes associated with complex non-contiguous duplications by using the reading frame rule is difficult because the duplications affect the expression of *DMD* together. Because most patients with non-contiguous duplications showed the phenotypic features of DMD, the reading frame rule should be interpreted cautiously. This study provides important insights on the non-contiguous duplications in *DMD* for understanding genotype-phenotype correlations and for developing dystrophin for therapeutic purposes.

Key Words: Duchenne muscular dystrophy, *DMD* gene, Non-contiguous duplication, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

서 론

근디스트로피(근이영양증, muscular dystrophy)는 디스트로핀(dystrophin, *DMD*) 유전자의 돌연변이로 인해 발병하는 질환으로 [1], 듀센형(Duchenne muscular dystrophy, DMD)은 유년기에 하

Corresponding author: Kyung-A Lee

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, 211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea
Tel: +82-2-2019-3531, Fax: +82-2-2019-4822, E-mail: KAL1119@yuhs.ac

Received: September 5, 2014

Revision received: December 3, 2014

Accepted: February 13, 2015

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2015, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지 근위부의 근력저하로 독립 보행이 어려워지며, 대부분 30대 이전에 호흡부전이나 심부전으로 사망하게 되는 중증형이고, 베커형(Becker muscular dystrophy, BMD)은 DMD보다 증상이 경미하여 상대적으로 늦은 나이에 발현되며, 진행 양상이 완만하다[2]. 따라서 DMD/BMD가 의심되는 환자에게 *DMD* 유전자 검사는 진단 및 예후 예측에 필수적인 역할을 한다[3].

DMD 유전자의 돌연변이 종류로는 결손(deletion)이 전체 환자의 55-65%로 가장 흔하며[4], 중복(duplication)은 약 5-10% [5], 나머지 20-30%는 점돌연변이(point mutation), 미세결손(microdeletion), 미세삽입(microinsertion) 등이 있다[6]. 이러한 *DMD* 유전자 돌연변이를 검출하는 유전자검사법으로는 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR), 정량 서던블롯(quantitative Southern blotting), 형광제자리부합법(FISH), 직접 염기서열 분석(sequence analysis) 등이 있는데, 최근 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 방법이 DMD/BMD 환자 및 여성 보인자 진단에 우선

적으로 추천되고 있다[7, 8].

DMD와 BMD에서는 유전자 돌연변이의 종류 및 부위를 바탕으로 임상양상의 차이와 중증도 예측이 가능하다. Monaco 등은 비교적 간단하게 표현형을 예측할 수 있는 해독틀법칙(reading frame rule)을 제시하였고, 이는 현재까지 결과분석에 유용하게 사용되고 있다[9]. 기본 원리는 결손 또는 중복 부위가 mRNA의 번역 해독틀(translational reading frame)을 이동시킬 경우(out-of-frame)에는 전사가 조기에 종식하게 되는 등 디스트로핀 단백질의 형성에 문제가 발생하여 증상이 심한 DMD가 발현하게 되지만, 반대로 번역해독틀이 보존(in-frame)되는 결손, 중복의 경우에는 분자량이 작거나 비정상적인 단백질이 생성되어 증상이 경미한 BMD가 발현한다는 것이다. 이 해독틀법칙은 현재까지 주요한 Leiden 근디스트로피 돌연변이 데이터베이스(<http://www.dmd.nl/>)와 비교하였을 때, 92%의 정확도를 보이며, 특히 RNA 발현까지 고려하면 정확도가 99.5%까지 높아진다[10]. DMD 유전자의 결손 돌연변이의 경우에는 해독틀법칙 결과와 임상 경과와의 상관성이 정립되어 있지만, 중복 돌연변이의 경우에는 결손에 비해 RNA 수준의 변화를 예측하기 어려운 경우가 많음에도 불구하고 해독틀법칙 결과와 임상적인 상관성에 대한 보고는 현재까지 많지 않다[11]. 특히 단일 부위의 중복이 아닌 불연속적 엑손 부위들의 중복에 대한 연구는 매우 드문 실정이다.

본 연구는 MLPA 방법을 사용하여 진단된 DMD 유전자 변이 중 불연속적 엑손 중복에 의한 근디스트로피 증례들을 보고하고, 환자들의 질병 양상과 유전자 변이 결과와의 상관성에 대해 고찰하고자 한다.

증례 및 방법

1. 증례

2007년 8월부터 2011년 7월까지 단일 대학병원에서 DMD/BMD

진단을 위해 시행한 MLPA 검사 결과 중 양성 환자는 총 88명이었다. 이 중 연속적 부위의 결손 돌연변이는 67명(76.1%), 연속적 부위의 중복 돌연변이는 15명(17.0%)이었다. 이 외 점돌연변이를 보인 환자 1명을 제외하고, 기존 데이터베이스에 보고되어 있지 않으며, 불연속적으로 두 부위에서 중복 돌연변이를 보인 5명의 환자에 대해 임상 증상 및 검사 결과를 후향적으로 분석하였다.

2. MLPA 검사 방법

환자의 말초혈액으로부터 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc, Hildern, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. MLPA는 MLPA DMD test kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands)를 이용하였다. 환자의 DNA를 프로브 혼합물 034 (DMD 엑손 1-10, 21-30, 41-50, 61-70), 035 (DMD 엑손 11-20, 31-40, 51-60, 71-79)와 교잡하여 결합시킨 후 PCR 증폭을 하였으며, PCR 반응은 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 35회 증폭하고, 마지막에 72°C에서 20분간 항온시켰다. PCR 증폭 산물은 Applied Biosystems 3,500×L system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 분석하였다. DMD 유전자 변이의 분석은 Softgenetics MLPA 프로그램(GeneMarker 1.70)을 이용하여 매 실험에서의 대조군 반응과 비교하여 분석하였으며, 상대적인 최댓값이 0.75 이하이면 결손, 1.3 이상이면 중복으로 보았다.

결 과

각 환자의 임상소견(Table 1) 및 MLPA 검사 결과는 다음과 같다.

환자 1은 18세 남자 환자로 보행 장애를 평가하기 위해 3세에 시행한 근육조직검사상 근디스트로피로 진단되었다. 이후 상지 및 하지 근력 약화로 독립적인 보행이 어려워지며 호흡재활이 필요한 상태가 되어 임상적으로 DMD 진단을 받았으며, 확정적 진단을 위해 시행한 MLPA 검사상 DMD 유전자 엑손 2-7 부위와 엑손 45-51

Table 1. Clinical features of the 5 patients examined in this study

Patient	Sex	Symptoms of onset/age	Age at the last follow-up	Ambulation	Cardiac involvement	Scoliosis	Chronic respiratory rehabilitation	Creatine kinase (U/L) [†]
1*	Male	Gait disturbance/ 3 yr old	20 yr old	Impossible	Normal	Yes	Yes	3,063
2*	Male	Delayed development/ 5 yr old	24 yr old	Impossible	Dilated cardiomyopathy	Yes	Yes	1,829
3 [‡]	Male	Delayed language development/ 4 yr old	16 yr old	Impossible	Normal	Yes	Yes	1,016
4 [‡]	Male	Delayed language development/ 2 yr old	14 yr old	Impossible	Mild cardiomyopathy	Yes	Yes	1,486
5 [‡]	Female	Lower limb weakness/ 24 yr old	38 yr old	Possible	Normal	No	Yes	1,350

*Family study was not performed; [‡]Family members; [†]Level of creatine kinase was measured at the time of diagnosis.

부위의 불연속적 중복이 관찰되었다(Fig. 1). 각각의 중복은 모두 독립적으로 in-frame으로 예측되었다.

환자 2는 5세에 발달 지연으로 시행한 근전도 검사에서 근디스트로피를 진단받았으며, 10세부터 독립적인 일상생활이 어려워 휠체어에서 생활하였다. 이후 20세에 호흡 약화로 호흡재활이 필요하여 정확한 진단을 위해 MLPA 검사를 시행하였다. 임상적으로 *DMD*가 의심되어 시행한 검사 결과상 *DMD* 유전자 엑손 5-37 부위와 엑손 50-59 부위가 중복되었다. 이후 주기적인 통원 재활치료를 시행하였으나 척추측만증(scoliosis)이 진행되며 확장형 심근병증(dilated cardiomyopathy) 소견이 관찰되었다. 또한 골다공증 소견도 보여 전반적으로 질병이 진행되는 양상이 관찰되었다. 각각의 중복은 모두 독립적으로 in-frame으로 예측되었다.

환자 3과 환자 4는 형제이며 언어발달지연으로 타 병원을 방문하여 시행한 근육조직검사상 근육병(myopathy)을 진단받은 후 특별한 치료 없이 지나다가 각각 9세, 7세부터 하지 근육 약화로 인해 자발적인 생활이 불가능할 정도로 질병이 진행되어 6년 후 근디스

트로피의 확정적 진단을 위해 유전자 검사를 시행하였다. MLPA 검사상 환자 3과 환자 4에서 모두 *DMD* 유전자의 엑손 52-53 부위와 엑손 56-61 부위의 불연속적 중복이 관찰되었다. 환자 3과 환자 4의 어머니인 환자 5는 24세에 둘째 아들(환자 4)을 출산한 후부터 하지 근력 약화가 시작되었으며 gower 증후가 나타나고 이상견갑골증(winged scapula)을 보여 근디스트로피로 진단되었다. 환자 5에서도 역시 MLPA 검사상 *DMD* 유전자 엑손 52-53 부위와 엑손 56-61 부위가 중복된 양상이 관찰되어 한 가계 내 형제와 어머니에서 동일한 불연속적 엑손의 중복이 검출되었다. 각각의 중복은 in-frame, out-of-frame 중복으로 예측되었다.

고찰

현재까지 *DMD* 유전자 두 부위의 불연속적 중복에 대한 증례들은 5개 연구에서 8명의 환자가 보고되었고 드물게 세 부위에 대한 불연속적 중복에 대한 증례 보고도 있다(Table 2) [12].

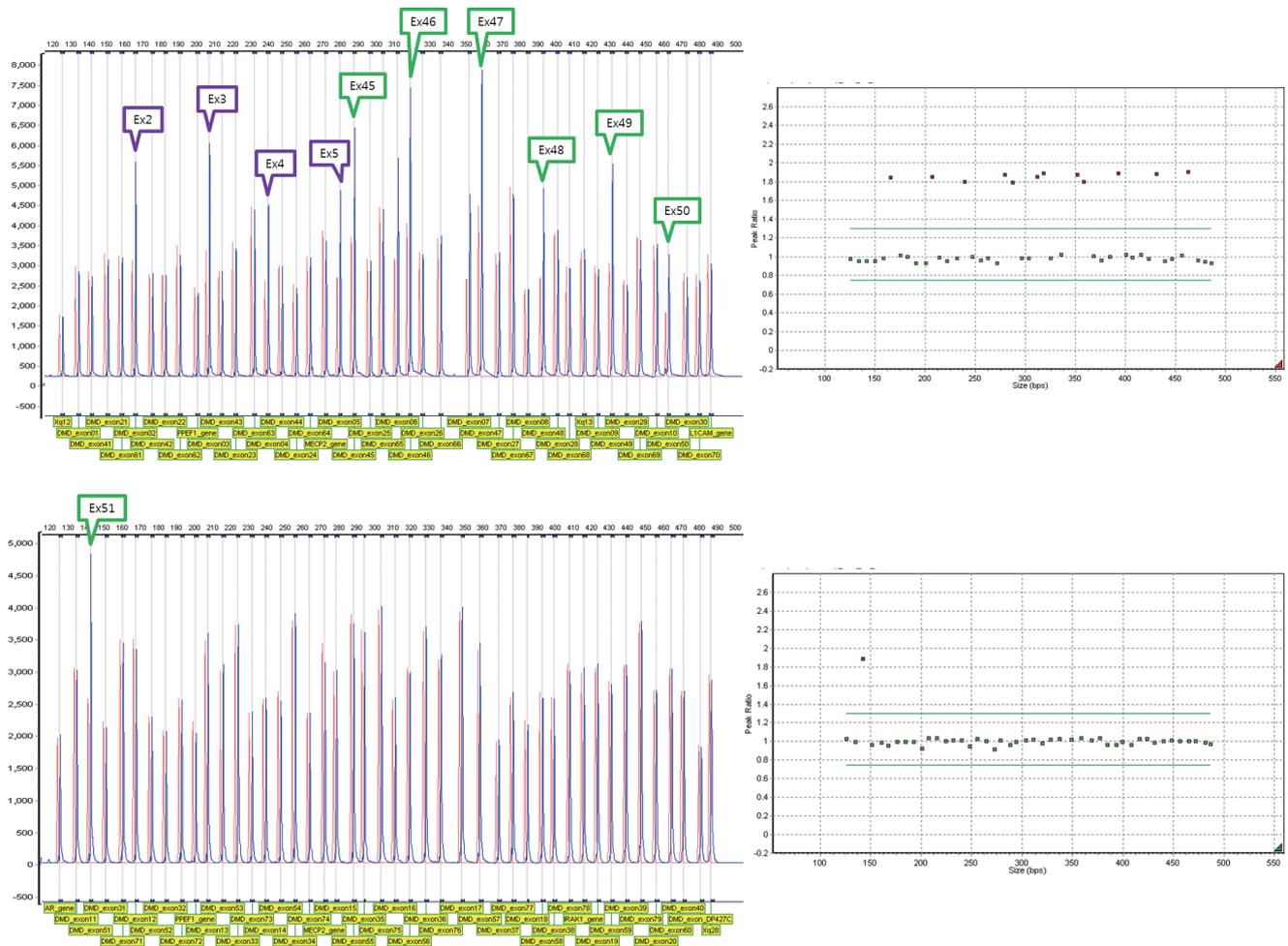


Fig. 1. Results of MLPA analysis for patient 1 (non-contiguous duplication of exons 2-7 and 45-51).

Table 2. A summary of the identified non-contiguous duplications in DMD

Patient	Phenotype	Frame of the first duplication	Frame of the second duplication	Country	Reference
P1	DMD	Exon 2-7/In frame	Exon 45-51/In frame	Korea	This study
P2	DMD	Exon 5-37/In frame	Exon 50-59/In frame	Korea	This study
P3*	DMD	Exon 52-53/In frame	Exon 56-61/Out of frame	Korea	This study
P4*	DMD	Exon 52-53/In frame	Exon 56-61/Out of frame	Korea	This study
P5*	DMD carrier	Exon 52-53/In frame	Exon 56-61/Out of frame	Korea	This study
p1	DMD	Exon 45-48/In frame	Exon 54-55/In frame	Germany	Neurogenetics (2005)
p2	NA	Exon 5-19/Out of frame	Exon 38-41/In frame	Multicenter	Human Mutation (2006)
p3	NA	Exon 45-55/In frame	Exon 65-79/Out of frame	Multicenter	Human Mutation (2006)
p4	DMD	Exon 45-48/In frame	Exon 55-63/Out of frame	Japan	Journal of Human Genetics (2008)
p5 [†]	DMD	Exon 2-7/In frame	Exon 50-55/In frame	Spain	Journal of Neurogenetics (2008)
p6 [†]	DMD	Exon 2-7/In frame	Exon 50-55/In frame	Spain	Journal of Neurogenetics (2008)
p7 [†]	DMD carrier	Exon 2-7/In frame	Exon 50-55/In frame	Spain	Journal of Neurogenetics (2008)
p8	IMD	Exon 1/Undetermined	Exon 42-43/Out of frame	Mexico	Journal of Genetics (2014)

*†Family members.

Abbreviations: DMD, Duchenne muscular dystrophy; IMD, intermediate muscular dystrophy; NA, not available.

불연속적 중복의 첫 보고로서 2005년에 Janssen 등[13]이 발표한 14명의 DMD 유전자 중복 또는 결손 환자들 중 1명에서 엑손 45-48 부위와 엑손 54-55 부위의 중복이 관찰되었으며, 각 부분의 중복은 in-frame으로 예측되지만, 환자는 DMD의 표현형을 나타냈다. 본 연구에서 나타난 환자 1, 환자 2의 경우도 임상적으로 DMD 표현형을 나타내는 공통점을 보였다.

환자 3, 환자 4, 환자 5는 가족관계로 공통적으로 엑손 52-53 부위와 엑손 56-61 부위가 중복된 양상을 보였으며 각각의 중복은 in-frame, out-of-frame으로 예측되어 있다. 그 외 환자 1과 환자 2에서 발견되었던 엑손 2-7 부위의 중복과 엑손 45-51 부위의 중복, 엑손 5-37 부위의 중복과 엑손 50-59 부위의 중복은 모두 독립적으로 in-frame으로 예측되어 있다. 각각의 중복은 in-frame 중복으로 경미한 증상을 나타내는 BMD로 예측되지만, 불연속적으로 중복이 조합되는 대부분의 증례들이 임상증상이 심한 DMD로 진행하였다. 불연속적인 중복의 경우 복합적인 유전자 재배열이 동반될 수 있기 때문에 일반적인 해독특별칙에 의한 통상적인 표현형 예측이 어려울 수 있다. 최근 보고된 Lopez-Hernandez 등[12]의 연구에서는 엑손 1 부위와 엑손 42-43 부위의 불연속적 중복이 관찰된 14세 남자 환자 증례가 보고되었는데, 엑손 42-43 부위의 독립적인 중복은 out-of-frame으로 DMD가 예측되지만, 해독특별칙의 예외적인 경우로 DMD와 BMD의 중간(intermediate) 증증도의 표현형을 보였음을 밝혀, 본 증례에서 불연속적 in-frame 중복이 중증 DMD와 연관되었던 것과는 대조적으로 이질적인 임상양상을 보였다.

본 증례와 이전 보고들을 종합하여 DMD 유전자에서 불연속적 중복이 호발하는 부위를 살펴보면, 대부분 엑손 40-60 부위의 중복을 포함하고 있다. DMD 유전자 결손은 민감점(hot spot)을 가지

고 있다[10]. DMD 유전자 결손의 민감점은 엑손 2-20 부위와 엑손 44-53 부위로 이 두 부위가 결손의 50-70%를 차지하는 것으로 알려져 있으며, 특히 엑손 44-53 부위가 가장 높은 빈도를 보인다[14]. 하지만 아직까지 중복에 대한 민감점은 특별히 없으며, 기존 데이터베이스를 바탕으로 분석해보면 엑손 2 부위가 가장 흔하게 중복이 관찰되는 부위라고 할 수 있다[15]. 그러나 본 증례들에서는 한 명의 환자에서만 엑손 2 부위의 중복이 관찰되었다.

불연속적 엑손 중복의 경우 발생기전이 다양하며, 이에 대한 여러 가지 가설들이 제시되고 있다[12,16,17]. 우선, 불연속적 중복은 환자 어머니의 감수분열(meiosis) 단계에서 새로운(de novo) 유전자 재배열을 통해 중복이 일어날 수 있는데, 환자 3, 환자 4, 환자 5의 가족처럼 어머니가 보인자로서 다음 세대에 돌연변이가 그대로 전달되는 경우이다. 어머니는 보인자로서 증상이 나타나지 않거나 [17], 본 증례처럼 경미한 증상이 나타날 수 있다. 기전으로서 자매 염색분체(sister chromatid) 간의 불균형적인 교차로 인한 가능성이 보고된 바 있으며[18], 유사한 기전이 Charcot-Marie-Tooth병 1A형의 원인 유전자인 HNPP의 발병 과정에서 보고되었다[19]. 감수분열 단계에서 불연속적 엑손 중복이 재발할 위험도를 DMD 유전자 변이의 위치에 따라 예측하는 것도 가능하다[20].

또 다른 기전으로, 체세포분열(mitosis) 과정에서 이중 고리(double-loop)가 발생함으로써 하나의 연속적인 엑손 중복이 일어난 후 중복 내에서 일부 결손이 일어나는 과정을 통해 불연속적 엑손 중복이 발생할 수 있다[17]. 이는 B형 혈우병의 특정 돌연변이 발생 과정과 유사하다[21]. 실제로 DMD 유전자 MLPA 검사에서 섞임증(mosaicism)이 관찰되는 경우가 이러한 기전과 연관되어 있다. DMD 유전자에서 다양한 불연속적 엑손 중복이 가능한 원인은 DMD 유전자가 인체 유전자 중 가장 큰 유전자이기 때문에[10] 상

대적으로 복잡한 재배열(rearrangement)에 취약하기 때문이다. 특히 전사(transcription)와 복제(replication) 과정에 관여하는 인자들이 충돌할 수 있는 가능성이 높아지며[22], 감수분열 과정에 영향을 주어 다양한 조합의 불연속적 엑손 중복을 새롭게(de novo) 발생시킬 수 있다.

mRNA 및 단백질 단계에서 분석해 보면, DMD 유전자의 엑손 중 기능적인 역할을 하는 엑손 부위의 중복이 표현형과 연관되어 있다. DMD 유전자 mRNA 단계의 안정성(stability)에 따라 중복된 엑손의 단백질 발현 여부가 달라질 수 있으며[12], 이는 해독틀법칙의 중요한 인자로 생각되고 있다. 디스트로핀 단백질은 크게 액틴 결합 부위(actin-binding domain), 중앙 막대 부위(central rod domain), 시스테인이 풍부한 부위(cysteine-rich domain)와 C-말단 부위(C-terminal domain)로 나눌 수 있으며, 4개의 경첩 부위(hinge region)에 의해 연결되어 있다[23]. 이 중 제3경첩 부위(H3)에 결손 또는 중복이 있는 경우 임상 증상이 경미하여 대부분 BMD로 진행된다고 보고되어 있다[10]. 하지만 본 연구에서 나타난 3가지 양상의 불연속적 중복의 경우 모두 공통적으로 제3경첩 부위에서 절단점(breakpoint)이 발생하였음에도 불구하고 임상 증상이 심각한 DMD로 진행되었다. 이는 추가적으로 액틴 결합 부위 또는 중앙 막대 부위에 절단점이 발생함으로 인해 경미한 증상이 나타날 수 있는 가능성이 상쇄되었다고 해석할 수 있다(dominant negative effect).

결론적으로 DMD 유전자의 불연속적 엑손 중복은 각각의 중복이 상호 복합적으로 작용하여 유전자 발현에 영향을 줄 수 있기 때문에 해독틀법칙에 의한 표현형 예측이 어렵다. 또한 환자 증례마다 표현형과 분자유전학적 검사 결과와의 연관성에 대한 개별적인 해석이 매우 중요하며, 이는 다른 가족에 대한 유전상담 측면에서도 중요하다. 본 연구의 증례 분석 결과 대부분 중증 표현형을 발현하는 경우가 많았다. 불연속적 엑손 중복은 유전형-표현형 상관성에 대한 연구 및 유전자 치료 목적의 디스트로핀을 개발하는데 있어 중요성을 가지므로 향후 더 많은 증례를 통한 병태생리학적 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

배경: 근디스트로피는 DMD 유전자의 돌연변이로 인해 발병하는 성염색체 열성 유전질환으로 심한 임상양상을 나타내는 DMD와 경미한 임상양상을 나타내는 BMD가 있다. DMD 유전자의 돌연변이를 검출하여 분석 결과를 바탕으로 해독틀법칙을 적용하면 DMD 또는 BMD로 진행하는 표현형 예측이 가능하다.

방법: DMD/BMD 진단을 위한 MLPA DMD test kit (MRC-Holland, The Netherlands)를 사용하여 검출한 돌연변이 양성 환자 총 88명

중 DMD 유전자의 불연속적 엑손 중복이 나타난 5예의 의무기록을 분석하였다. 비교적 드물게 발생하는 두 부위의 불연속적 엑손 중복 돌연변이 5예의 유전자검사 결과 및 임상 표현형을 이전 보고되었던 불연속적 엑손 중복 돌연변이 증례들과 비교 분석하였다.

결과: 본 연구에서 기존 보고된 바 없는 세 가지 형태의 불연속적 엑손 중복 돌연변이가 관찰되었으며, 각각 DMD 유전자 엑손 2-7 부위와 엑손 45-51 부위, 엑손 5-37 부위와 엑손 50-59 부위, 엑손 52-53 부위와 엑손 56-61 부위의 중복이었다. 본 연구에서 제시된 DMD 유전자의 불연속적 엑손 중복 5예는 모두 DMD 표현형을 나타냈다.

결론: DMD 유전자의 불연속적 엑손 중복 돌연변이에서 각각의 중복이 상호 복합적으로 작용하여 유전자 발현에 영향을 주기 때문에 일반적인 해독틀법칙에 의한 표현형 예측이 어렵다. 대부분의 불연속적 엑손 중복 돌연변이는 DMD 표현형을 나타냈으며, 이에 대한 분별력 있는 해독틀법칙 적용이 필요하다. 본 증례 고찰은 근디스트로피의 유전형-표현형 예측 또는 치료 목적의 디스트로핀 개발과 관련한 기전 연구에 있어 중요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A120030).

REFERENCES

- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
- Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJ, Davies KE. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988;2:109-14.
- Prior TW and Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005;7:317-26.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-17.
- Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplication mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet* 1990;46:682-95.
- Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2331-5.

7. Lai KK, Lo IF, Tong TM, Cheng LY, Lam ST. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Clin Biochem* 2006;39:367-72.
8. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet* 2005;117:92-8.
9. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-5.
10. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006;34:135-44.
11. Tuffery-Giraud S, Bérout C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-Calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* 2009;30:934-45.
12. López-Hernández LB, Gómez-Díaz B, Bahena-Martínez E, Neri-Gómez T, Camacho-Molina A, Ruano-Calderón LA, et al. A novel non-contiguous duplication in the DMD gene escapes the 'reading-frame rule'. *J Genet* 2014;93:225-9.
13. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics* 2005;6:29-35.
14. Imoto N, Arinami T, Hamano K, Matsumura K, Yamada H, Hamaguchi H, et al. Topographic pattern of the rearrangement of the dystrophin gene in Japanese Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1993;92:533-6.
15. White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, et al. Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat* 2006;27:938-45.
16. Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, et al. Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet* 2008;53:215-9.
17. Fenollar-Cortés M, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Lorda-Sánchez I, Ayuso C. Two non-contiguous duplications in the DMD gene in a Spanish family. *J Neurogenet* 2008;22:93-101.
18. Hu XY, Ray PN, Worton RG. Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 1991;10:2471-7.
19. Lopes J, Tardieu S, Silander K, Blair I, Vandenberghe A, Palau F, et al. Homologous DNA exchanges in humans can be explained by the yeast double-strand break repair model: a study of 17p11.2 rearrangements associated with CMT1A and HNPP. *Hum Mol Genet* 1999;8:2285-92.
20. Helderma-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ, Kneppers AL, Ginjaar HB, et al. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet* 2009;75:465-72.
21. Sommer SS. Recent human germ-line mutation: inferences from patients with hemophilia B. *Trends Genet* 1995;11:141-7.
22. Helmrich A, Ballarino M, Tora L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol Cell* 2011;44:966-77.
23. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-28.