

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ VYŠETŘENÍ
U AUTOZOMÁLNĚ DOMINANTNÍCH
DEMYELINIZAČNÍCH FOREM
DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ
CHARCOT-MARIE-TOOTH A U CHOROBY
PELIZAEUS-MERZBACHER

Doktorská disertační práce

MUDr. Emilie Vyhnálková

Praha 2007

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ VYŠETŘENÍ
U AUTOZOMÁLNĚ DOMINANTNÍCH
DEMYELINIZAČNÍCH FOREM DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ
CHARCOT-MARIE-TOOTH A U CHOROBY
PELIZAEUS-MERZBACHER

Molecular Genetic Testing In Autosomal Dominant Forms
of the Hereditary Neuropathies Charcot-Marie-Tooth
And In Pelizaues-Merzbacher Disease

Doktorská disertační práce, Praha 2007

MUDr. Emilie Vyhnálková (roz. Mikešová)

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Seeman, PhD.

Pracoviště: DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie 2. LF UK
a FNM

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Oborová rada: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Pavlovi Seemanovi, PhD. za jeho podporu během mého postgraduálního studia, za předání jeho nadšení a vědomostí a za inspiraci jeho ryzím přístupem k vědecké práci.

Dále děkuji všem spolupracovníkům z DNA laboratoře Kliniky dětské neurologie a Neurologické kliniky dospělých 2. LF UK, především MUDr. Lucii Baránkové, Mgr. Ivě Sakmaryové, Markétě Kubálkové a As. MUDr. Radimovi Mazancovi, PhD., bez kterých by tato práce obtížně vznikala. Děkuji přednostům obou neurologických klinik Doc. MUDr. Vladimírovi Komárkovi, CSc. a Doc. MUDr. Martinovi Bojarovi, CSc. za podporu mého projektu, zázemí pro mou práci a vstřícný přístup.

Vřelé poděkování patří kolegům z Ústavu lidské genetiky Univerzity Friedrich-Alexander v Erlangenu (PD. Dr. Bernd Rautenstrauss, Dr. Kathrin Hühne, Dr. Corrina Stengel a Dr. Christian Thiel) a z Institutu experimentální neurologie University Pitié-Salpêtrière v Paříži (Dr. Hamid Azzedine a Prof. Eric Leguern) za velmi cenné zkušenosti a rady a za vynikající podmínky k práci.

Děkuji představitelům 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a grantovým agenturám GAUK (grant 72/2004/C/2.LF), IGA MZ (grant 1A8254), Nadaci Charty 77 (Program NeuroEuro 2006 Konta Bariéry), evropskému programu Leonardo da Vinci (projekt mobilit CZ/04/A/PL/134164) a MZ ČR (výzkumný záměr MZO 00064203) za finanční podporu pro mou práci.

OBSAH

SOUHRN	6
SUMMARY	9
A DĚDIČNÉ NEUROPATIE CHARCOT-MARIE-TOOTH	12
1. ÚVOD	12
1.1. KLINICKÉ PROJEVY DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ	13
1.2. KLASIFIKACE DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ	14
1.3. KLINICKÉ SPEKTRUM A GENOVÉ PORUCHY U AD CMT1	17
1.4. PATOMECHANISMY U AD CMT1	18
2. CÍLE STUDIE	22
3. PACIENTI A METODY	24
3.1. URČENÍ ZASTOUPENÍ FOREM DĚDIČNOSTI V SOUBORU CMT RODIN	24
3.2. VÝBĚR PACIENTŮ	24
3.3. SEKVENAČNÍ ANALÝZA GENŮ <i>EGR2</i> , <i>NEFL</i> A <i>SIMPLE</i>	24
3.4. RESTRIKČNÍ MUTAČNÍ ANALÝZA	26
3.5. NEUROLOGICKÁ A NEUROFYZIOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ	26
3.6. KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR K TESTOVÁNÍ POČTU KOPIÍ GENU <i>PMP22</i>	26
4. RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ TYPŮ DĚDIČNOSTI V SOUBORU CMT RODIN	27
5. TESTOVÁNÍ GENU PRO EARLY GROWTH RESPONSE FACTOR 2 (<i>EGR2</i>)	29
5.1. ÚVOD A CÍLE	29
5.2. PACIENTI A METODY	31
5.3. VÝSLEDKY	31
5.4. DISKUSE	35
6. TESTOVÁNÍ GENU PRO NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN POLYPEPTIDE (<i>NEFL</i>)	38
6.1. ÚVOD A CÍLE	38
6.2. PACIENTI A METODY	40
6.3. VÝSLEDKY	41
6.4. DISKUSE	54
7. TESTOVÁNÍ GENU PRO SMALL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN OF THE LYSOZOME/LATE ENDOSOME (<i>SIMPLE</i>)	62
7.1. ÚVOD	62
7.2. PACIENTI A METODY	63
7.3. VÝSLEDKY	64

7.4.	DISKUSE	73
8.	TESTOVÁNÍ CMT1A A HNPP POMOCÍ REAL-TIME PCR	77
8.1.	ÚVOD	77
8.2.	CÍLE STUDIE	79
8.3.	PACIENTI A METODY	80
8.4.	VÝSLEDKY	82
8.5.	DISKUSE	84
9.	ZÁVĚR CMT	87
B	CHOROBA PELIZAEUS-MERZBACHER	88
10.	ÚVOD	88
11.	PACIENTI A METODY	91
12.	VÝSLEDKY	94
13.	DISKUSE	96
C	LITERATURA	98
D	VLASTNÍ PUBLIKACE	107
E	CURRICULUM VITAE	111
F	PŘÍLOHY	112

SOUHRN

Dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth (CMT)

Určila jsem relativní zastoupení typů dědičnosti v celkovém souboru CMT rodin dosud shromážděných v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie 2. LF UK (včetně rodin s již dříve prokázanou kauzální mutací). Zastoupení dominantních a sporadických forem je přibližně shodné (40% rodin). Malé procento rodin (2%) vykazuje zřejmý autozomálně recesivní (AR) typ dědičnosti se dvěma nebo více postiženými sourozenci a zdravými rodiči. Sporadické případy mohou být buď následkem AD de-novo mutací nebo AR. U zbývajících 18% rodin (nepříbuzných pacientů) nejsou k dispozici spolehlivé klinické údaje o rodině, které by umožnily stanovit typ dědičnosti.

Dále jsem určila relativní zastoupení typů dědičnosti ve skupině CMT rodin s dosud nenalezenou kauzální mutací (t.j. s vyloučenou formou CMT1A / HNPP ev. s vyloučenými mutacemi v některém z dalších testovaných genů asociovaných s CMT – *Cx32*, *MPZ*, *PMP22*, *EGR2*, *NEFL*, *SIMPLE*). Podíl dominantních a sporadických forem CMT se zde mění, ve srovnání s celkovým souborem rodin, ve prospěch sporadických případů (dominantní 30%, sporadické 50%). Podle tohoto údaje lze usuzovat, že nejvyšší záchytnost kauzálních mutací je obecně ve skupině rodin se zřetelně dominantním typem dědičnosti.

Zjistila jsem frekvenci mutací v genu pro „early growth response factor 2“ (*EGR2*) ve skupině českých pacientů s demyelinizační formou CMT (CMT1) po vyloučení nejčastější formy CMT1A (2,2%; 1 ze 46 rodin s pozitivním nálezem). Zachycená mutace u sporadicky postižené pacientky vznikla de-novo. Mutace v *EGR2* vznikají podle literatury často de-novo a proto má smysl testovat pacienty se sporadickým výskytem demyelinizační neuropatie. I přes pečlivý výběr testovaných pacientů je ovšem pravděpodobnost záchytu kauzální mutace velmi malá a neopodstatňuje běžnější diagnostické testování. Výsledky testování genu *EGR2* jsem publikovala v roce 2005 v časopisu *Neuromuscular Disorders*.

Dále jsem testovala gen pro „neurofilament light chain polypeptide“ (*NEFL*). Ve skupině 66 pacientů s postižením CMT1 a s vyloučenou formou CMT1A jsem neidentifikovala ani jednoho pacienta s kauzální mutací v *NEFL*. Mutace v genu *NEFL* jsou tedy pravděpodobně

velmi vzácné mezi českými CMT1 pacienty. Naopak ve skupině českých CMT2 pacientů mohou být *NEFL* mutace zodpovědné za 2,2% případů (nálezný dosud nepopsané mutace u 1 AD rodiny ze 45 testovaných) a jejich testování je opodstatněné zejména u AD rodin s jednoznačně axonální neurogenní lézí a časným začátkem v dětském věku, u kterých nejsou významně sníženy rychlosti vedení motorickými vlákny n. medianus. Celková frekvence mutací mezi CMT1 i CMT2 formami (po vyloučení nejčastějších forem CMT1A a HNPP) je velmi nízká – přibližně 0,9% (1 pozitivní nález mezi celkově 111 testovanými rodinami).

Frekvence mutací v genu pro „small integral membrane protein of the lysosome/late endosome“ (*SIMPLE*) ve skupině českých CMT1 pacientů po vyloučení nejčastější formy CMT1A představuje 3,8%. Mezi 104 testovanými CMT1 rodinami jsme prokázali mutace u 4 rodin. Identifikovali jsme celkem 3 různé kauzální mutace v genu *SIMPLE* ve 4 rodinách. Dvě z nalezených mutací jsou nové. Podle spektra zachycených rodin lze usuzovat, že záchyt kauzálních mutací v *SIMPLE* je pravděpodobnější u familiárních případů AD rodin než u sporadických případů (3 ze 4 rodin jsou AD). Diagnostické testování je ale vhodné i u sporadických CMT1 případů.

U pacientů s nově nalezenými kauzálními mutacemi v testovaných genech *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* byl dle možností upřesněn neurologický a elektrofyziologický fenotyp nosičů a byla upřesněna diagnostická kritéria pro podtypy dědičných periferních neuropatií způsobených zachycenými mutacemi.

Ověřila jsem a zavedla metodu multiplexní kvantitativní real-time PCR (real-time Q-PCR) k diagnostickému testování počtu kopií genu pro „peripheral myelin protein 22“ (*PMP22*), jehož duplikace a delece jsou zodpovědné za dvě nejčastější formy dědičných neuropatií Charcot-Marie-Tooth – CMT1A a HNPP. Testováním referenčních vzorků (n=158) s dříve známým počtem kopií *PMP22* genu jsem stanovila diagnostická rozmezí $\Delta\Delta Ct$ hodnot pro 1, 2 a 3 kopie *PMP22* genu, která byla následně využita pro prospektivní testování nových vzorků s předem neznámým počtem kopií (n=236) i k retrospektivnímu testování vzorků vyšetřených dříve pomocí mikrosatelitové analýzy s negativním výsledkem (n=178). Použití kvantitativní real-time PCR umožnilo potvrzení duplikace *PMP22* genu u celkem 6 rodin, u kterých bylo na základě mikrosatelitové analýzy vysloveno podezření na CMT1A duplikaci atypického - menšího rozsahu. V souboru 243 rodin s potvrzenou CMT1A duplikací v naší laboratoři představují tedy atypicky menší duplikace cca 3%. Tato frekvence je překvapivě vyšší než jsme původně předpokládali a než bylo uvedeno v literatuře. Zavedením a ověřením metody real-time PCR pro detekci počtu kopií *PMP22* jsme získali spolehlivý nástroj k průkazu všech

CMT1A duplikací a HNPP delecí nezávisle na jejich rozsahu. Kvantitativní real-time PCR má vůči dosud používané mikrosatelitové analýze výhodu zejména u sporadicky postižených pacientů s předpokládanou HNPP delecí bez možnosti vyšetření rodičů.

Choroba Pelizaeus-Merzbacher (PMD)

Choroba Pelizaeus-Merzbacher (PMD) je X-vázanou poruchou centrální myelinizace. Ve většině případů je způsobena duplikací genu pro „proteolipid protein 1“ (*PLP1*). Vyšetřením referenčních vzorků jsem ověřila a zavedla dvě multiplexní real-time Q-PCR eseje na testování počtu kopií dvou nesousedících exonů genu *PLP1*. Byla určena diagnostická rozmezí $\Delta\Delta C_t$ hodnot pro testování počtu kopií *PLP1* u suspektních PMD pacientů a žen přenašeček. Výsledky této studie ukazují, že multiplexní real-time Q-PCR je velmi účinnou metodou dobře využitelnou k diagnostickému testování duplikací genu *PLP1* u onemocnění Pelizaeus-Merzbacher. Popis metody a výsledky ověřovací studie jsem publikovala v roce 2006 v časopisu Genetic Testing.

SUMMARY

Hereditary neuropathies Charcot-Marie-Tooth (CMT)

We evaluated the relative frequency of each mode of inheritance in the large group of CMT families gathered in the DNA laboratory of the Dept. of Child Neurology of the 2nd Medical School (including families with already detected causal mutations). The frequency of dominant and sporadic forms is approximately equal (40% of families). In a small percentage of families (2%), the autosomal recessive (AR) mode of inheritance (two or more affected siblings) was recognized. In the rest of the families (18%) there are not enough reliable data on the clinical state of the family members to indicate the mode of inheritance.

Further we evaluated the relative frequency of inheritance modes in the „unconfirmed“ group of CMT families without detected causal mutation (which previously tested negative for the CMT1A / HNPP forms and / or for mutations in some of the following CMT-associated genes – *Cx32*, *MPZ*, *PMP22*, *EGR2*, *NEFL*, *SIMPLE*). The frequency of dominant and sporadic forms in this group is somewhat different from the large cohort of families. The frequency of dominant pedigrees is lower (30%) and the frequency of sporadic cases higher (50%). This may indicate that, in general, we can expect the detection rate of CMT causes to be higher in dominant pedigrees compared to sporadic CMT cases.

In this study I have estimated the frequency of mutations in the early growth response factor 2 gene (*EGR2*) among Czech patients with demyelinating form of CMT (CMT1) and with excluded most common CMT forms (CMT1A and HNPP). This frequency is 2,2%; (1 patient/family with detected causal mutation among 46 tested). The only causal de-novo mutation was detected in a sporadically affected patient. Mutations in *EGR2* originate often de-novo and, therefore, patients with CMT1 with sporadic occurrence should be preferentially included for *EGR2* testing, although the probability of finding a causal mutation seems to be generally very low and it does not reach the level for routine diagnostic testing. The results of this study were published in 2005 in the *Neuromuscular Disorders* journal.

Further on, I tested the neurofilament light chain polypeptide gene (*NEFL*) in CMT1 and CMT2 families. Mutations in *NEFL* are probably very rare among Czech patients with CMT1.

In this study, there was no causal mutation detected in a group of 66 CMT1 patients with excluded CMT1A form. **In the group of Czech CMT2 patients, mutations in *NEFL* can be responsible for 2,2% of cases** (1 novel mutation was detected in 1 AD family out of 45 tested). This study shows that families with AD mode of inheritance and clearly axonal neuronal lesion without marked reduction in median motor nerve conduction velocity on EMG studies should be preferentially included for *NEFL* testing. The overall frequency of mutations in both CMT1 and CMT2 families (with excluded CMT1A form) is very low (estimated 0,9%; 1 positive pedigree among 109 tested) and the routine diagnostic testing is questionable.

Further on, we tested the small integral membrane protein of the lysosome/late endosome gene (*SIMPLE*) in a group of Czech CMT1 patients with excluded CMT1A form and the estimated frequency is 3,8% (4 positive pedigrees among 104 tested). A total of 3 different *SIMPLE* mutations (2 out of which were novel) were detected in 4 families. Based on the spectra of the families with detected mutations we can conclude that the probability of finding a *SIMPLE* mutation is high in AD families (3 out of 4), however, sporadic cases can be included for *SIMPLE* testing as well.

In the carriers of the newly detected mutations in the *EGR2*, *NEFL* and *SIMPLE* genes, the neurological and electrophysiological status was specified and the inclusion criteria for the molecular testing of the corresponding CMT subtypes were elaborated.

In this study I further optimized and evaluated a multiplex quantitative real-time PCR reaction for diagnostic dosage analysis of the peripheral myelin protein 22 gene (*PMP22*). *PMP22* duplications and deletions are responsible for the two most common forms of CMT (CMT1A and HNPP). The method was evaluated by testing of 158 reference DNA samples, which allowed reliable differentiation of 1, 2 and 3 copies of *PMP22*. The obtained ranges of $\Delta\Delta C_t$ values were further used for retrospective screening of patients who previously tested negative for CMT1A/HNPP by microsatellite analysis (n=178) and for testing of newly received DNA samples simultaneously by both methods (n=236). Using both real-time Q-PCR and the microsatellite analysis, we were able to confirm *PMP22* gene duplication in 6 families suspected for an atypical size of CMT1A duplication based on microsatellite analysis. Given the total of 243 CMT1A families detected in our laboratory, we assume that atypical CMT1A duplications are more frequent than expected. They could represent up to 3% of all CMT1A cases. Their reliable detection and confirmation requires the use of two independent methods, such as microsatellite analysis and real-time Q-PCR. The sensitivity of real-time Q-PCR for CMT1A/HNPP testing is at least equal, if not superior, to the currently used routine testing by a set of 17 microsatellite

markers. Another advantage of real-time Q-PCR is the short time-to-result and simple performance. Simultaneous use of quantitative real-time PCR and microsatellite analysis in CMT1A testing is necessary for the confirmation of CMT1A duplications of atypical size.

Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD)

I have evaluated two multiplex real-time Q-PCR essays for testing of two *PLP1* exons in patients with the Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) by testing of 110 reference g-DNA samples with previously known proteolipid protein 1 gene (*PLP1*) copy number. PMD is an X-linked disorder of the central nervous system myelination. In most of the cases, the affected boys carry an extra copy of the *PLP1* gene as a result of a segmental duplication at Xq22. Female carriers carry 3 *PLP1* gene copies. Samples were tested using analogical approach to the *PMP22* gene testing. Diagnostic ranges of detected $\Delta\Delta C_t$ values for 1, 2 and 3 *PLP1* copies were set by testing a group of reference samples. These reference ranges were and are being further used for reliable detection of suspected PMD patients and female carriers. Multiplex real-time Q-PCR is a highly efficient method that can be successfully used in *PLP1* copy number testing in PMD patients and *PLP1* duplication female carriers. The results of this study were published in 2006 in the Genetic Testing journal.

A DĚDIČNÉ NEUROPATIE CHARCOT-MARIE-TOOTH

1. Úvod

V roce 1886 popsali v Paříži profesor Charcot a jeho žák Marie neobvyklou formu pomalu progredující muskulární atrofie charakterizovanou slabostí a atrofií svalů na dolních končetinách a později na rukou (*Charcot a Marie, 1886*) (Obr. 1).

SUR UNE FORME PARTICULIÈRE
D'ATROPHIE MUSCULAIRE PROGRESSIVE
SOUVENT FAMILIALE
DÉBUTANT PAR LES PIEDS ET LES JAMBES
ET ATTEIGNANT PLUS TARD LES MAINS
Par J.-M. CHARCOT et P. MARIE

L'atrophie musculaire progressive semble devoir de plus en plus se montrer en groupes secondaires dont le nombre s'accroît, en même temps que l'observation clinique des faits devient plus attentive et plus précise.

La forme d'atrophie musculaire qui fait l'objet de ce travail nous paraît présenter des caractères assez définis et assez stables pour mériter une description spéciale et une place à part dans les cadres nosographiques.

Pendant l'année qui vient de s'écouler, nous avons eu l'occasion d'observer cinq malades atteints de cette affection; c'est d'après les symptômes présentés par eux que nous décrivons celle-ci; nous aurons aussi raconté, quand cela sera nécessaire, aux observations analogues publiées par d'autres auteurs.

Voici d'abord les observations de nos cinq malades.

Obs. I. — Maxime W..., neuf ans. Aucun antécédent héréditaire, son frère, plus âgé de trois ou quatre ans, ne présente aucune trace d'atrophie musculaire.

Maxime aurait eu des convulsions dans la première ou deuxième année; à cinq ans aurait commencé à se montrer les premiers signes de faiblesse du côté des membres inférieurs; les pieds se tournaient quand il marchait, la face plantaire regardant tout à fait en dedans. A ce moment, on lui a mis des appareils, les pieds ont semblé un peu

1. Les photographies reproduites dans ce travail ont été faites dans le laboratoire de la Salpêtrière, par M. A. Londe.

REV. DE MÉD. TOME VI. — FÉVRIER 1886.

7

Obr. 1. Úvodní strana článku autorů Charcot a Marie z roku 1886, který jako první v historii medicíny popisuje pacienty s dědičnými periferními neuropatiemi.

Ve stejném roce nezávisle na nich uveřejnil Tooth popis „peroneálního typu progresivní svalové atrofie“ s prakticky stejnými klinickými příznaky, jako uváděl Charcot. (*Tooth, 1886*) Dědičná povaha onemocnění byla zaznamenána v obou pracích, tedy ještě v době před znovobjevením Mendelových zákonů dědičnosti. Tooth ve své originální práci dále správně určil, že se jedná o neuropatii spíše než o myelopatii, jak předpokládali Charcot a Marie. (*Murakami et al., 1996*) Nicméně trvalo dalších více než 100 let, než mohly být první typy **dědičných neuropatií** objasněny na molekulárně genetické úrovni. (*Lupski et al., 1991; Raeymaekers et al., 1991*)

1.1. Klinické projevy dědičných neuropatií

Dědičné periferní neuropatie se podle klinického nálezu obecně rozdělují do tří velkých skupin: dědičné motoricko-senzitivní neuropatie (HMSN), dědičné distální motorické neuropatie (HMN) a dědičné senzitivní a autonomní neuropatie (HSAN/HSN). (Dyck, 1984; De Jonghe et al., 2000)

Dědičné motoricko-senzitivní neuropatie (HMSN), též nazývané onemocnění Charcot-Marie-Tooth (CMT), jsou s incidencí v populaci kolem 1:2500 – 5000 nejčastějším geneticky podmíněným nervosvalovým onemocněním. (Skre, 1974) Jde o klinicky, ale především geneticky velice heterogenní skupinu chorob. Pro CMT je charakteristický pozvolný začátek a pomalu progredientní průběh obtíží. Až na výjimky patří do obrazu CMT distální svalová slabost a atrofie (nejvíce a nejdříve bývají postiženy peroneální svaly) a dále deformita nohy s vysokým nártem a klenbou označovaná jako „pes cavus“ (nebo „pes excavatus“). Díky oslabení extenzorů nohou pacientům přepadávají špičky, při chůzi často zakopávají a jako adaptace se objevuje tzv. „peroneální“ - či „kohoutí“ - chůze. Mezi další základní příznaky CMT patří u většiny pacientů snížení či vymizení šlachosvalových reflexů (dříve a více na dolních končetinách) a také poruchy citlivosti, jelikož při CMT jsou postižena jak motorická tak senzitivní nervová vlákna. Později se většinou objeví slabost a atrofie svalů na rukou a horních končetinách. CMT nejčastěji začíná v první nebo druhé dekádě života. Některé genové poruchy však vedou k velmi časnému (CHN) nebo naopak velmi pozdnímu (CMT2I) začátku. Spektrum klinických nálezu u CMT je velmi široké, od pacientů s náznakem pes cavus a jen minimální svalovou slabostí až po pacienty s těžkými distálními atrofiemi a deformitami nohou i rukou. (Pareyson, 1999; Murakami et al., 1996) Na jednom konci širokého spektra CMT stojí mírná forma „hereditary neuropathy with liability to pressure palsies“ (HNPP) - tzv. tomakulózní neuropatie, patřící mezi tzv. rekurentní neuropatie - a na druhém konci dvě závažné formy s velmi časným začátkem obtíží - Dejerine-Sottas neuropatie (DSN), někdy také označovaná jako HMSN typ III a její nejtěžší a nejčasnější forma, tzv. kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN). (Suter a Scherer, 2003) CMT lze klasifikovat podle řady kritérií, nejčastěji je to podle: klinického obrazu, elektrofyziologického nálezu, typu dědičnosti, neuropatologického obrazu, a dále dle zodpovědné genové poruchy a věku začátku. (Dyck, 1984)

1.2. Klasifikace dědičných neuropatií

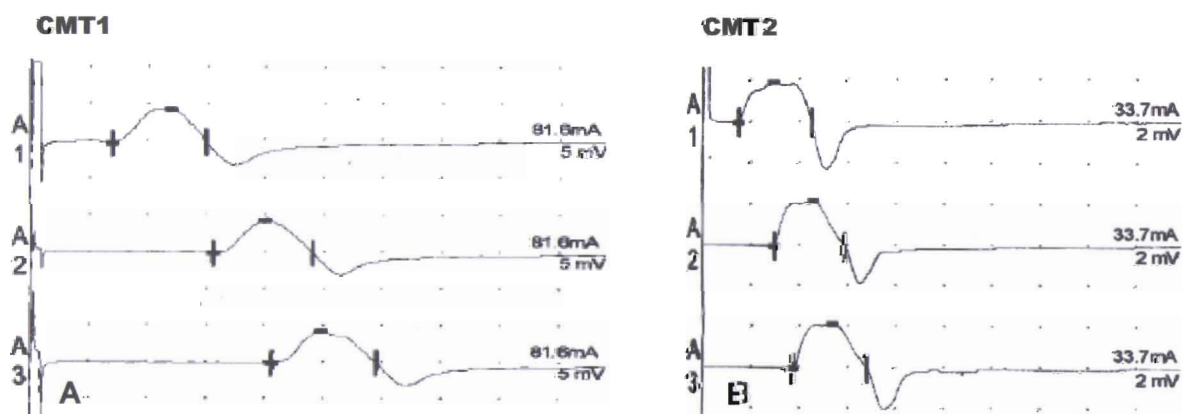
Elektrofyzilogická klasifikace

V klasifikaci CMT hraje od 60. let minulého století nejdůležitější roli elektrofyziologické vyšetření – elektromyografie (EMG), které rozděluje CMT na mnohem častější typ 1 (demyelinizační) a méně častý typ 2 (axonální). (Harding a Thomas, 1980) CMT1 forma se vyznačuje sníženými motorickými rychlostmi vedení periferním nervem (MNCV) pod 38m/s. Forma CMT2 má MNCV > 38 m/s a snížené amplitudy motorických i sensitivních akčních potenciálů (CMAP, SNAP). (Dyck et al., 1993; Suter a Scherer, 2003) CMT1 forma je predominantně nalézána až u 80% všech CMT pacientů. (Young a Suter, 2001) Klinicky neurologicky jsou oba typy nerozlišitelné.

Pro EMG diagnostiku dědičných periferních neuropatií a pro klasifikaci typů mají zásadní význam tzv. kondukční studie různých periferních nervů. Kondukční studie stanovují parametry vodivosti periferních nervů. Jsou prováděny pomocí povrchových stimulačních a registračních elektrod (Obr. 2) a jejich vyšetření je proto limitováno pouze pro nervy uložené blízko povrchu. Vyšetřovat takto lze nervy motorické, sensitivní a i smíšené a získaný výsledek nám dává informaci o zachování kontinuity nervu a o rychlosti vedení jeho vlákny. (Ambler, 1999) Typické nálezy u CMT1 a CMT2 jsou znázorněny na obrázku 3.



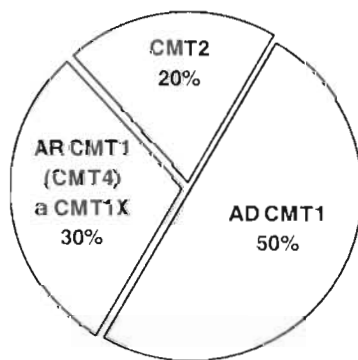
Obr. 2.
Znázornění provedení kondukční studie na n. medianus.
(Foto R. Mazamec)



Obr. 3. Zaznamenaná elektrická aktivita činných svalů – akčních potenciálů (AP) při stimulaci periferních nervů. Výška AP (osa Y) vyjadřuje intenzitu svalové odpovědi – amplitudu (mV). Na ose X je vynesena čas. Elektrofyziologické nálezy – motorická rychlost vedení n. ulnaris (MNCV) u CMT1 a CMT2. A - CMT1: MNCV je významně snížena - zde na 26 m/s. Složené svalové akční potenciály (CMAP) mají normální amplitudu, ale prodlouženou latenci. Pro CMT1 je typické difusní a uniformní demyelinizační postižení na všech nervech PNS. B - CMT2: Rychlosti vedení periferním nervem jsou téměř v normě (norma > 50 m/s; zde 49 m/s). CMAP na n. ulnaris má sníženou amplitudu (norma > 5,5 mV; zde 2 mV). Amplitudy složených sensitivních akčních potenciálů (SNAP) bývají sníženy zejména na dolních končetinách, jelikož tíže postižení je závislá na délce nervu (axonu).

Klasifikace dle typu dědičnosti

Po základním rozdělení na typ 1 a 2 se CMT neuropatie dále subklasifikují podle typu dědičnosti. U CMT existují všechny typy dědičnosti (autozomálně dominantní (AD), autozomálně recesivní (AR) i X-vázaná), nejčastější je ale AD typ. V souboru CMT rodin shromážděném v naší laboratoři je velký podíl sporadických izolovaných případů, za které může být zodpovědná jak nová mutace s dominantním efektem, tak AR forma s heterozygotní mutací u obou zdravých rodičů. Nejčastější klinicko genetickou formou CMT je AD CMT1 – autozomálně dominantní demyelinizační – která představuje celkově asi 50% (Graf 1). Do této skupiny patří nejčastější forma CMT1A.



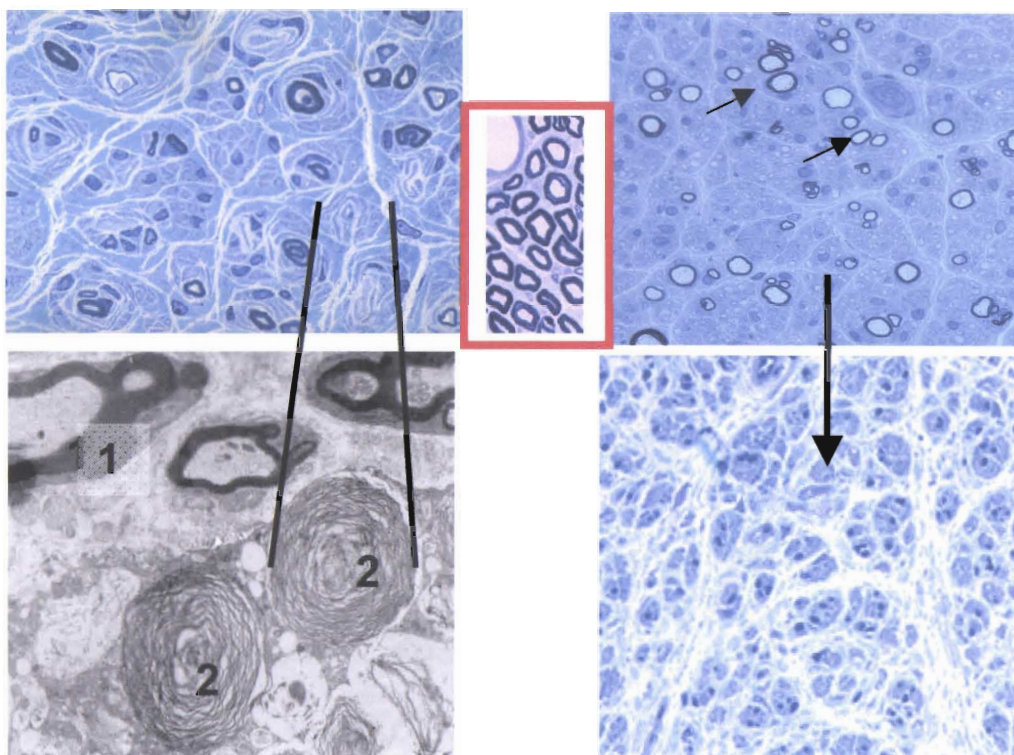
Graf 1.

Celkové relativní zastoupení demyelinizačních forem CMT1 s AD, AR a X-vázanou dědičností a axonálních forem CMT2 mezi všemi CMT formami. Je patrná zřejmá predominance demyelinizačních forem s AD dědičností – AD CMT1.

(www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html, www.geneclinics.org/profiles/cmt/)

Neuropatologická klasifikace

V histologickém obrazu z nervové biopsie n. suralis je u CMT1 patrný rozpad myelinových pochev a koncentrické hypertrofické formace Schwannových buněk, tzv. „cibulovité“ formace (onion bulbs), které jsou známkou opakovaně probíhající segmentální demyelinizace a remyelinizace. Demyelinizační neuropatie je proto označována také jako hypertrofická (Obr. 4). S postupem nemoci ubývá i nervových vláken (axonální ztráta), která nejlépe koreluje klinickým zhoršováním u pacientů a je také jeho příčinou. CMT2 je primárně spojena s úbytkem myelinizovaných axonů a s výskytem skupin regenerujících vláken, zatímco myelinové obaly nejsou primárně postiženy (Obr. 5). (Suter a Scherer, 2003) Sekundárně však v pozdějších stádiích dochází většinou také k demyelinizaci. Zcela charakteristický, i když ne zcela specifický, histologický obraz s lokálním ztluštěním myelinové pochvy (tzv. tomakulum) a segmentální demyelinizací a remyelinizací má druhá nejčastější forma CMT – tzv. tomakulózní neuropatie (HNPP). (Suter a Scherer, 2003)

**Obr. 4.**

Demyelinizační neuropatie CMT1. Nahoře řez periferním nervem barveným toluidinovou modří. Ve výřezu pro srovnání normální nerv. Dole obrázek z elektronového mikroskopu 1: normální myelin, 2: „onion bulb“ struktura. (zvětšení 25.000x)
(www.neuropathologyweb.org/chapter12/chapter12Neuropathy.html)

Obr. 5.

Axonální neuropatie CMT2. Nahoře obraz těžkého postižení s občasnými zachovanými axony (šipky). Ve výřezu pro srovnání řez normálním nervem. Dole obraz „end stage“ axonální neuropatie s úplným vymizením axonů.
(www.neuropathologyweb.org/chapter12/chapter12Neuropathy.html)

Genové poruchy u CMT a klasifikace

Dvěma nejčastějšími genovými poruchami u CMT jsou duplikace a delece genu pro periferní myelinový protein 22 (*PMP22*) v oblasti chromosomu 17p11.2-12, zodpovědné za formy CMT1A a HNPP. Forma CMT1A s duplikací *PMP22* genu představuje asi 70% všech CMT1 případů a je tedy absolutně nejčastější formou dědičných neuropatií. (Nelis et al., 1996; Houlden a Reilly, 2006)

V době sepisování této práce na jaře roku 2007 je známo 36 genů a genových lokusů, jejichž porucha může vést k různým formám dědičných neuropatií. (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>) Jednotnou klasifikaci CMT proto není prakticky možné vytvořit. Existuje přehledná databáze genových poruch se základním zařazením klinického obrazu a s odkazy na původní práce (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>) a dále existuje stránka, která nabízí ucelený přehled zohledňující současně jak klinickou tak i molekulárně genetickou klasifikaci dědičných neuropatií.

(www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html)

Hlavním předmětem mé práce bylo vyšetření genů asociovaných s formami AD CMT1 (ev. s AD CMT1 nebo AD CMT2) a proto se dále ve své práci pro přehlednost zaměřím hlavně na tuto oblast.

1.3. Klinické spektrum a genové poruchy u AD CMT1

Spektrum klinického postižení u AD CMT1 forem je velmi široké. Nejběžnější je klasické CMT1 – mírné až středně těžké postižení odpovídající již uvedenému obecnému popisu CMT. V rámci AD CMT1 dále existují dvě těžké a časně formy označované jako Dejerine-Sottas neuropatie (DSN) a kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN). (Houlden a Reilly, 2006) DSN je neuropatie s časným začátkem, výraznějším snížením NCV (pod 10 m/s) než CMT1 a s obrazem těžké dys/demyelinizace v nervové biopsii. CHN je velmi těžká neuropatie, projevující se hypotoníí a svalovou slabostí již v novorozeneckém nebo kojeneckém věku, velmi sníženými nebo nedetekovatelnými MNCV a obrazem těžké demyelinizace či dysmyelinizace až absence myelinu v nervové biopsii. (Houlden a Reilly, 2006) Ačkoli CMT1, DSN i CHN jsou charakterizovány primární demyelinizací různého stupně, je známo, že svalová atrofie a progresivní svalové slabosti jsou nejlépe v korelaci s poklesem amplitud CMAP a jsou tedy až důsledkem sekundární axonální degenerace (ztráty) a ne vlastní demyelinizace. (Verhamme et al., 2004) AD CMT1 je nyní klasifikováno podle nálezů molekulární genetiky na podtypy A, B, C, D, E a F které byly označeny postupně podle toho, jak byly vazebnými analýzami identifikovány kandidátní lokusy a v nich následně zodpovědné geny (Tab. 1). (Houlden a Reilly, 2006)

Tabulka 1. Klasifikace AD CMT1 s příslušnými asociovanými geny.
(Houlden a Reilly, 2006; <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>)

	Pozice genu	Klasifikace	Dědičnost	Klinický fenotyp
Geny asociované s AD CMT1				
PMP22 – duplik. / delece	17p11	CMT1A / HNPP	AD / de novo	CMT1 / HNPP
PMP22 - bod. mutace	17p11	CMT1A	AD / de novo	CMT1 / DSN / CHN
SIMPLE	16p13	CMT1C	AD / de novo	CMT1
EGR2	10q21	CMT1D	AD / de novo	CMT1 / DSN / CHN
Geny asociované s AD CMT1 a zároveň s AD CMT2				
NEFL	8p21	CMT1F	AD	CMT1
		CMT2E	AD / de novo	CMT2
MPZ	1q22	CMT1B /	AD / de novo	CMT1 / DSN / CHN;
		CMT1E		
		CMT2I / CMT2J	AD	CMT2

AD, autozomálně dominantní; **PMP22**, peripheral myelin protein 22; **SIMPLE**, small integral membrane protein of the lysosome/late endosome; **EGR2**, early growth response 2 gene; **NEFL**, neurofilament light chain gene; **MPZ**, myelin protein zero gene; **DSN**, Dejerine-Sottas neuropathy; **CHN**, congenital hypomyelinating neuropathy.

Během svého studia jsem různými metodami vyšetřovala na přítomnost mutací všechny geny uvedené v tabulce kromě genu *MPZ*, jehož testování bylo již dříve zavedeno. Z tabulky vyplývá, že mutace v genech *NEFL* a *MPZ* mohou být zodpovědné jak za demyelinizační, tak za axonální formy CMT. Gen *NEFL* jsem z tohoto důvodu později testovala i u skupiny pacientů s axonální formou tzv. CMT2E.

1.4. Patomechanismy u AD CMT1

Myelin v periferním nervovém systému (PNS) je tvořen a udržován Schwannovými buňkami. Tyto specializované buňky obalují axony neuronů svými plasmatickými membránami a tento tzv. myelinový obal umožňuje rychlé šíření akčních potenciálů axonem. Existuje velmi těsná komunikace mezi Schwannovými buňkami a neuronem a proto není překvapivé, že jakékoli narušení této dynamické rovnováhy vede obvykle k projevům periferní neuropatie. (Niemann *et al.*, 2006) Hereditární neuropatie CMT jsou geneticky i klinicky heterogenní. Mutace v různých genech mohou způsobit podobný CMT fenotyp a naopak, mutace ve stejném genu mohou vést k velmi rozdílným projevům onemocnění. (Suter a Scherer, 2003; Seeman *et al.*, 2004)

Během své práce jsem analyzovala geny exprimované buď v neuronu nebo v myelinizujících Schwannových buňkách v nervovém systému. Různými metodami jsem hledala mutace v genech *PMP22*, *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE*. Patomechanismy působení mutací v těchto genech jsou rozličné a proto jsem zpracovala stručné srovnání funkcí těchto genů a efektu mutací v nich. Seznámila jsem se se čtyřmi nejdůležitějšími mechanismy vzniku demyelinizační neuropatie na proteinové úrovni: 1. Mutace v myelinových komponentách; 2. Mutace v transkripčních faktorech regulujících geny kódující myelinové proteiny; 3. Mutace v neuronálních cytoskeletálních komponentách ovlivňující axonální transport; 4. Mutace ovlivňující syntézu, třídění nebo degradaci proteinů v myelinizujících buňkách.

CMT demyelinizačního typu způsobené mutacemi ve strukturních proteinech myelinu: gen PMP22

Protein PMP22 – glykosylovaný membránový protein obsahující 4 transmembránové podjednotky – je exprimován zejména Schwannovými buňkami v periferním nervovém systému (PNS) a společně s proteinem MPZ tvoří strukturální základ kompaktního myelinu. Periferní myelin má podobu multilamelární spirály tvořené specializovanou buněčnou membránou Schwannových buněk. V jeho složení převládá cholesterol, sfingolipidy a další specializované lipidy jako galaktocerebrosid nebo sulfatid, menší zastoupení mají strukturální proteiny – kromě převládajícího PMP22 zejména myelin protein 0 (MPZ) a myelin bazický protein (MBP). (Suter a Scherer, 2003) Ačkoli jsou funkce PMP22 ještě z větší části neznámé, předpokládá se, že je, kromě své strukturální funkce, nezbytný pro iniciaci myelinizace (vytváření myelinových spirál), regulaci buněčného růstu, diferenciaci, buněčné migrace a apoptosy a pro kontinuální obnovu a udržování stability myelinu v periferních nervech. (Niemann et al., 2006; Houlden a Reilly, 2006; Vallat, 2003) Gen PMP22 je dávkově sensitivní. Nejčastěji nacházenou mutací genu PMP22 je jeho duplikace. (Nelis et al., 1996) Způsobuje tzv. formu CMT1A, která – i když je v rámci CMT zdaleka nejčastější – zůstává na úrovni buněčných mechanismů stále do velké míry neobjasněna. Existuje více hypotéz patologického působení nadbytečné kopie PMP22 a krátce je zmíním v úvodu kapitoly 8 o testování CMT1A/HNPP forem pomocí real-time PCR.

CMT způsobené mutacemi v transkripčních faktorech regulujících geny kódující myelinové proteiny: gen pro early growth response 2 faktor (EGR2)

Exprese myelinových komponent (PMP22 a MPZ) je ve Schwannových buňkách přísně regulovaná. Mutace v transkripčních faktorech regulujících geny, které kódují myelinové

proteiny, jsou proto dalšími kandidáty ve skupině demyelinizačních neuropatií. Doposud byly u CMT1 pacientů identifikovány mutace ve dvou transkripčních faktorech – EGR2 a SOX10. (Niemann et al., 2006)

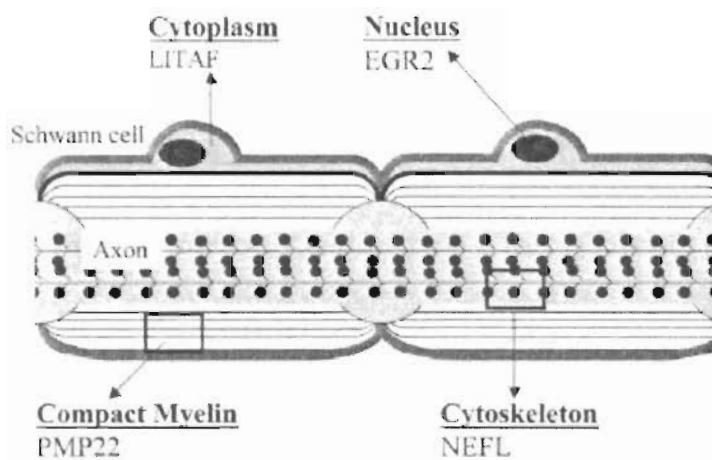
CMT způsobené změnami v cytoskeletu a poruchou transportního procesu v neuronu: gen pro neurofilament light chain gene (NEFL)

Těla motorických neuronů PNS jsou uložena v předních rozích míšních a těla sensitivních neuronů v dorzálních spinálních gangliích. Ovládané svaly a receptory se nacházejí na periférii organismu, často ve značné vzdálenosti od těla neuronu, která v případě dolních končetin může představovat až 1 m. Axony neuronů, zodpovědné za překonání této vzdálenosti, mají proto velmi vysoké nároky na kontinuální obousměrnou přepravu materiálu – zejména buněčných organel a vezikul obsahujících proteiny. Narušení tohoto transportu různými mutacemi v komponentách cytoskeletu – jako v případě genu pro lehký řetězec neurofilament – neurofilament light chain (NEFL), v transportních proteinech a v proteinech zajišťujících vazbu organel a vezikul k transportnímu aparátu, vede k rozvoji neuropatie. (Niemann et al., 2006) Mutace v NEFL byly prokázány jak u rodin s dominantními atonálními i demyelinizačními formami neuropatie CMT. (Mersiyanova et al., 2000; Jordanova et al., 2003)

CMT způsobené poruchou syntézy, třídění nebo degradace proteinů: gen pro small integral membrane protein of the lysosome/late endosome (SIMPLE)

Udržování správného složení myelinového obalu Schwannovou buňkou závisí na rovnováze mezi syntézou a degradací jeho komponent. Membránové proteiny myelinu jsou syntetizovány v endoplasmatickém retikulu (ER), modifikovány během transportu ER a Golgiho aparátem a poté buď rovnou degradovány či včleněny do plasmatické membrány. Degradace proteinů začíná procesem endocytózy, pokračuje transportem do časného endosomu, kde probíhá třídění a je zakončena buď přesunem ve vesikulách za pomoci mikrotubulů přes pozdní endosom do lysozomu k degradaci nebo recyklaci – navrácením do membrány. (Niemann et al., 2006) Mutace v genech kódujících proteiny zapojené do procesu syntézy a degradace proteinů jsou zodpovědné převážně za formu CMT1. V současné době se jedná asi o 6 známých proteinů a jedním z nich je „small integral membrane protein of lysosome / late endosome“ (SIMPLE). Jedná se o E3 ubiquitin ligázu lokalizovanou v membráně pozdních endosomů a lysozomů v cytoplasmě Schwannových buněk účastnící se procesu třídění a degradace proteinů

označených ubiquitinem. (Saifi *et al.*, 2005) Místa exprese jednotlivých zmíněných genů, resp. jejich proteinů v PNS jsou znázorněna na obrázku 6.



Obr. 6. Schematický průřez periferním nervem s vyznačením místa exprese genů *EGR2*, *SIMPLE*, *PMP22* a *NEFL*. Upraveno dle Houlden a Reilly, 2006.

2. Cíle studie

V době zahájení mé práce nebyla v rozsáhlém souboru více než 500 rodin (v současné době 770 z celkového počtu 1150 vyšetřených CMT rodin) shromážděném v DNA laboratoři neurologických klinik 2. LF UK přibližně u poloviny z nich objasněna příčina CMT a nebyla nalezena kauzální mutace. V té době bylo v naší laboratoři, jako jediné v ČR provádějící DNA vyšetření CMT příčin, možné vyšetření 5 nejčastějších genových poruch u dědičných neuropatií – přestaveb na chromosomu 17p (formy CMT1A a HNPP) a bodových mutací genů *Cx32*, *MPZ* a *PMP22*.

I po cíleném vyšetření těchto nejčastějších 4 až 5 genových příčin zůstává asi u 40% pacientů příčina na genové úrovni nejasná a diagnosa nemůže být upřesněna. U častých sporadických případů se nelze ani spolehlivěji vyjádřit k typu genetického přenosu a tedy ani ke genetické prognóze u pacienta a jeho příbuzných. Z tohoto důvodu bylo nezbytné, vzhledem k rychlému rozvoji poznatků o příčinách CMT, rozšířit možnosti dovyšetření o analýzy dalších genů u již shromážděného souboru pacientů. Mutace v genech *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* byly teprve v posledních 5 letech objeveny jako další příčiny chorob CMT. (*Warner et al., 1998; (Mersiyanova et al., 2000; Street et al., 2003)*) První publikace a studie těchto genů u pacientů s CMT ukázaly na relativně velký význam a naději pozitivních nálezů mutací v těchto genech i u našich již shromážděných pacientů s dosud neznámou příčinou choroby CMT.

Cíle mé práce byly:

1. Zjistit relativní zastoupení jednotlivých typů dědičnosti v celkovém souboru dosud shromážděných CMT rodin (včetně rodin s již dříve prokázanou kauzální mutací), zejména podíl autozomálně dominantních a sporadických forem.
2. Zjistit relativní podíl autozomálně dominantních a sporadických forem v souboru CMT rodin s dosud neznámou kauzální mutací (tzv. „nepotvrzená skupina“) s vyloučenou formou CMT1A resp. HNPP a event. s vyloučenými mutacemi v dalších testovaných genech asociovaných s CMT – *Cx32*, *MPZ*, *PMP22*.

3. Ze souboru pacientů s dosud nenalezenou kauzální mutací vybrat pacienty a rodiny s demyelinizační (CMT1) a později i s axonální (CMT2) formou dědičné neuropatie, u kterých je možné připustit autozomálně dominantní (AD) typ dědičnosti (rodiny s vertikálním typem přenosu choroby v rodokmenu i rodiny se sporadickým výskytem choroby a možnou de-novo mutací s dominantním efektem).
4. Na základě podrobnějších kritérií navržených dle poznatků z literatury vybrat z této skupiny pacienty k testování genů *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* a u nich provést přímou sekvenční analýzu celé kódující oblasti každého z těchto genů.
5. Určit frekvenci výskytu, lokalizaci v genu, podíl de-novo vzniklých mutací s dominantním efektem (mutační frekvenci) a případně původ vzniku mutací v genech *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* ve skupině pacientů s demyelinizační formou CMT1 v České republice.
6. Zjistit frekvenci výskytu, lokalizaci v genu, podíl de-novo vzniklých mutací s dominantním efektem (mutační frekvenci) a případně původ vzniku mutací v genu *NEFL* u pacientů s axonálním typem CMT2, kompatibilních s AD typem dědičnosti (viz výše).
7. Upřesnit neurologický a elektrofyziologický fenotyp (provést korelaci genotypu a fenotypu) a diagnostická kritéria pro podtypy dědičných periferních neuropatií způsobených zachycenými mutacemi v genech *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE*.
8. Dalším cílem mé práce bylo ověřit spolehlivost a zavést metodu real-time PCR pro rutinní diagnostickou detekci dvou nejčastějších mutací u dědičných neuropatií – duplikací a delecí genu *PMP22* (zodpovědných za formy CMT1A resp. HNPP) a následně pomocí této metody retrospektivně otestovat tzv. „nepotvrzenou“ skupinu pacientů s dříve vyloučenou CMT1A / HNPP formou na základě mikrosatelitové analýzy.

3. Pacienti a metody

3.1. Určení zastoupení forem dědičnosti v souboru CMT rodin

Statistický přehled zastoupení jednotlivých forem dědičnosti v celkovém souboru CMT rodin a v souboru CMT rodin s dosud nenalezenými mutacemi (tj. s již vyloučenými nejčastějšími mutacemi) (viz cíle projektu), byl vypracován pomocí selektivních dotazů v elektronické databázi CMT pacientů DNA laboratoře v programu MS Access.

3.2. Výběr pacientů

Opakovaný výběr pacientů k sekvenační analýze byl usnadněn existencí aktualizované databáze pacientů. Počet vyšetřených pacientů a přesná kritéria jejich výběru budou uvedena postupně přímo v následujících kapitolách týkajících se testování jednotlivých CMT-asociovaných genů. DNA pacientů byla izolována z periferní krve nebo ze slin za použití několika standardních metod.

3.3. Sekvenační analýza genů EGR2, NEFL a SIMPLE

Mutace v genech *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* jsem hledala metodou obousměrného přímého sekvenování všech kódujících exonů a přilehlých intronových oblastí.

PCR amplifikace: Gen *EGR2* jsem amplifikovala v 9 překrývajících se fragmentech s použitím dříve publikovaných párů primerů (*Timmerman et al., 1999*), gen *NEFL* v 6 částečně se překrývajících fragmentech s použitím primerů nově navržených pomocí nástroje ELXR (<http://mutation.swmed.edu/elxr/>) a gen *SIMPLE* ve 3 PCR fragmentech s použitím dříve navržených primerů. (*Street et al., 2003; Dr. Vincent Timmerman*) Sekvence primerů pro testované geny jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Přehled primerů použitých k PCR amplifikaci a přímému sekvenování genů *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE*.

Gen	Primer	Sekvence primeru - forward	Primer	Sekvence primeru - reverse
<i>EGR2</i>	1F	5' AAGTGTGGAGGGCAAAAGGA 3'	1R	5' ACGCGGCTTACCTCCGGC 3'
	2.1F	5' TCCCCTCCCAGATGGCATG 3'	2.1R	5' TGACGCTGGATGAGGCTGTG 3'
	2.2F	5' GCTACCCAGAAGGCATAATC 3'	2.2R	5' AGGAAGGAGGTGGTGGGTAG 3'
	2.3F	5' CCCTCCTGCGTTCCTGTCAG 3'	2.4R	5' CAGGGTAAAGTTACGGATTG 3'
	2.4F	5' ACCCAGGTCTCTTCCCAATG 3'	2.4R	5' GCAGGTGGTGTGGGTTATAG 3'
	2.5aF	5' CAATCCGTAACTTACCCTG 3'	2.5aR	5' GGATGTGCCGTGTCAGCTCG 3'
	2.5bF	5' CGAGCTGACACGGCACATCC 3'	2.5bR	5' CTCCGCCAAGACTGCTGCTG 3'
	2.5cF	5' CGCAAGTACCCCAACAGACC 3'	2.5cR	5' GGTGGTCACTGCGGCTGAAG 3'
	2.6F	5' ATCGGTGCCAGCCCCCTCTA 3'	2.6R	5' TAGGTGAAAGGGGGCAGTG 3'
<i>NEFL</i>	1.1F	5' AGCCTCCCGGCGTATAAAT 3'	1.1R	5' CTCAGCACCTCCTCTTCATAGC 3'
	1.2F	5' AGCAGAACAAGGTCCTGGAAG 3'	1.2R	5' CTTCTCCAGCGCTTCATTCA 3'
	1.3F	5' GACAGCTTGATGGACGAAATCT 3'	1.3R	5' CAAGCCCTATCCCTAAGAGCTG 3'
	2F	5' CAGGCTTCATGAAC TTGGGTAT 3'	2R	5' GCAGGGCTGGGATTTATCA 3'
	3F	5' GCTTGCCTTTGTGTTTAGGGTA 3'	3R	5' GTTCTTTAGGACACCAACCTGCT 3'
	4F	5' GTTAAGTCTTGGAGAGGAGCAGA 3'	4R	5' TGCCGTAGATCCTGAACTCATA 3'
	<i>SIMPLE</i>	2F	5' CAACTGAATTTCTTATCTGG 3'	2R
3F		5' ATAGCCAGACGATGAACG 3'	3R	5' ATGGTGCAGTTGAGAACC 3'
4F		5' AGAAGGACATGAACATGG 3'	4R	5' CAAAAGAAGACATGAAGG 3'

K PCR amplifikaci jsem použila následující DNA polymerázy či premixy: *EGR2* – TaqGold (ABI, USA); *NEFL* – WinTaq (Institut lékařské genetiky Erlangen) a Plain PP Master Mix (Top Bio s.r.o., ČR); *SIMPLE* – WinTaq a Plain PP Master Mix, a tyto programy:

EGR2 – touch down program: 94°C 7 min; 9 cyklů: 97°C 20 sec, 65°C (-1°C/cyklus) 20 sec, 72°C 40 sec; 29 cyklů: 94°C 20sec, 55°C 20 sec, 72°C 40 sec; 72°C 10 min, 15°C ∞.

NEFL – touch down: 94°C 3min; 2 cykly: 94°C 30 sec, 63°C 45 sec, 68°C 45 sec; 2 cykly: 94°C 30 sec, 61°C 45 sec, 68°C 45 sec; 2 cykly: 94°C 30 sec, 59°C 45 sec, 68°C 45 sec; 31 cyklů: 94°C 30 sec, 57°C 45 sec, 68°C 45 sec; 68°C 20 min, 15°C ∞.

SIMPLE: pro Plain PP Master Mix: 95°C 5 min; 35 cyklů: 95°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 30 sec; 72°C 5 min; 10°C ∞. Pro WinTaq: touch down: 94°C 3min; 2 cykly: 94°C 30 sec, 63°C 45 sec, 68°C 45 sec; 2 cykly: 94°C 30 sec, 61°C 45 sec, 68°C 45 sec; 2 cykly: 94°C 30 sec, 59°C 45 sec, 68°C 45 sec; 31 cyklů: 94°C 30 sec, 57°C 45 sec, 68°C 45 sec; 68°C 20 min, 15°C ∞.

Purifikace PCR produktů: Po vizualizaci na agarózovém gelu (s využitím interkalačního barviva ethidiumbromidu) jsem PCR produkty přečišťovala v různých fázích projektu pomocí následujících postupů: manuální přečištění pomocí kolonek Qiagen QIAquick (Qiagen Inc.), enzymatické přečištění Exo/Sap I a dále při testování většího počtu vzorků zejména automatické přečištění pomocí multipipetovacího robota Tecan (Tecan Ltd.) využívajícího filtrovací destičky

Millipore (Millipore, USA) a robotu Beckman Biomek (Beckman Coulter Inc.) fungujícím na principu vazby DNA na magnetické částice přečišťovacího roztoku Ampure.

Sekvenační reakce a sekvenace: Přečištěné PCR produkty byly sekvenovány s použitím kitu Big Dye Terminator V3.1 Kit (ABI, USA), produkty sekvenační reakce byly dále purifikovány precipitací s kyselým ethanolem nebo pomocí robotu Tecan a destiček Millipore či robotu Beckman Biomek a přečišťovacího roztoku CleanSeq. Přečištěné produkty byly po rozpuštění ve formamidu analyzovány na přístrojích ABI 3730, ABI 3130, ABI 3100Avant a ABI 310 (Applied Biosystems, USA).

Analýza sekvencí: Sekvence jsem vyhodnocovala s využitím softwarů SeqMan (DNASTAR Inc., USA) a SeqScape (ABI, USA).

3.4. Restrikční mutační analýza

K testování DNA vzorků zdravých kontrol na výskyt kauzálních mutací v genech *EGR2* a *NEFL* (mutace Arg359Gln a Tyr265Cys) bylo využito polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) při restrikčním štěpení enzymy BceAI a BtsI (BioLabs Inc., USA). Vhodné enzymy (takový, u kterého mutací buď vzniká či zaniká jeho restrikční místo) jsem vyhledala v databázi NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Výsledek štěpení u mutace Arg359Gln v genu *EGR2* je zobrazen dále v kapitole 5.3.

3.5. Neurologická a neurofyziologická vyšetření

Klinická neurologická vyšetření a genetické konzultace se sdělením výsledků molekulárně genetických analýz u pacientů s nově zachycenými mutacemi v CMT-asociovaných genech jsme prováděli společně s Doc. MUDr. Pavlem Seemanem, PhD. převážně na ambulanci Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM.

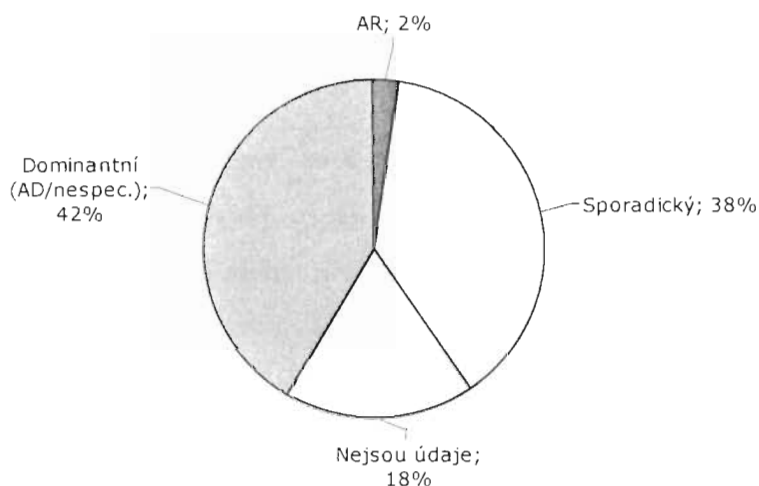
EMG vyšetření a vyšetření evokovaných potenciálů probíhala v rámci kontinuální zdravotní péče o CMT pacienty v ambulanci As. MUDr. Radima Mazance, PhD. na Neurologické klinice dospělých 2. LF UK a FNM.

3.6. Kvantitativní real-time PCR k testování počtu kopií genu *PMP22*

Principy a využití této metody k testování duplikací a delecí genu *PMP22* jsou podrobně popsány v kapitole 8.

4. Relativní zastoupení typů dědičnosti v souboru CMT rodin

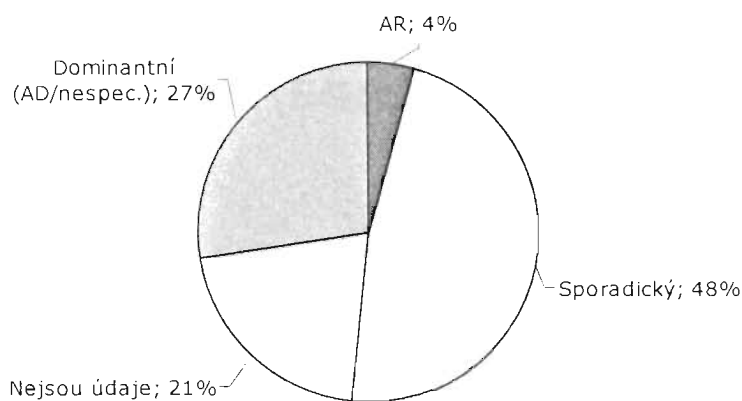
Relativní zastoupení jednotlivých typů dědičnosti v celkovém souboru CMT rodin a mezi rodinami s dosud nenalezenou mutací je znázorněno v následujících dvou grafech.



Graf 2. Relativní zastoupení typů dědičnosti v celkovém souboru všech CMT rodin (1150 k 1.4.2007)

V grafu 2 je patrná převaha dominantních forem (v této skupině jsou zahrnuty i rodiny s X-vázaným dominantním přenosem) nad formami jednoznačně autozomálně recesivními (AR). Skupina se sporadickým výskytem CMT je velmi rozsáhlá a může obsahovat jak pacienty s de novo dominantními mutacemi, tak pacienty s AR formami.

Relativní zastoupení rodin s dominantními formami a se sporadickým výskytem je přibližně srovnatelné (42% a 38%).



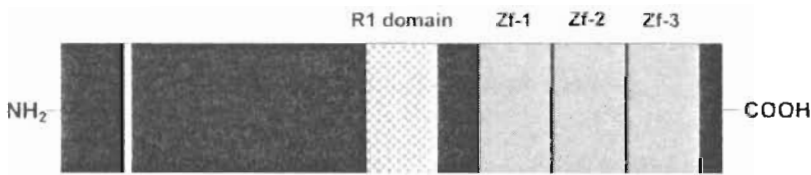
Graf 3. Relativní zastoupení typů dědičnosti v souboru CMT rodin s dosud nenalezenou kauzální mutací (770 rodin v tzv. "nepotvrzené" skupině k 1.4.2007)

Z grafu 3 je zřejmé, že v průběhu procesu objasňování příčin dědičných neuropatií v naší laboratoři je nejvyšší úspěšnost právě ve skupině se zaznamenaným dominantním přenosem. Naopak nejnižší záchyt mutací je pravděpodobně u sporadických případů. Původní četnost AD rodin 42% v celkovém souboru rodin poklesla v rámci této skupiny na 27% v „nepotvrzené skupině“ a o zhruba stejný podíl naopak stoupá zastoupení sporadických forem (z 38 na 48%). Tento trend je vysvětlitelný vysokým záchytem dvou nejčastějších forem – CMT1A a HNPP – které mají obě AD dědičnost, často se vyskytují v několika generacích (proto je rodina zařazena jako dominantní) a jsou zachyceny brzy po příjmu vzorku do laboratoře v 1. provedeném testování. (Nelis et al., 1996)

5. Testování genu pro early growth response factor 2 (EGR2)

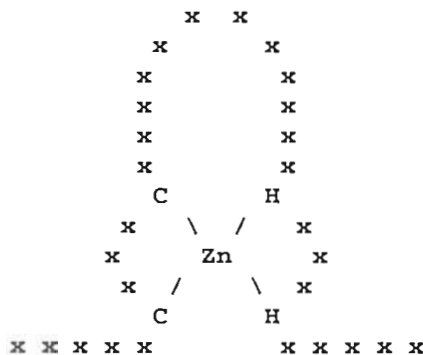
5.1. Úvod a cíle

Gen pro „early growth response 2 gene“ (*EGR2*) leží na chromosomu 10q21-22 a obsahuje 2 exony, které kódují protein o velikosti 476 AMK. *EGR2* je transkripční faktor typu zinkového prstu, který řídí časnou myelinizaci periferních nervů. (Joseph et al., 1998) Ve své struktuře obsahuje *EGR2* protein celkem 3 domény typu zinkového prstu (Obr. 7).



Obr. 7. Schematické znázornění domén proteinu *EGR2*. (Upraveno dle Houlden a Reilly, 2006.)

Domény typu zinkového prstu se vyskytují v mnoha proteinech vážících nukleové kyseliny. Doména je tvořena 25 – 30 aminokyselinovými zbytky, přičemž na jejích koncích nalézáme vždy dva zbytky cysteinové a dva histidinové, které přímo váží atom zinku. Doména je schematicky znázorněna na obrázku 8.



Obr. 8. Schéma domény typu zinkového prstu tzv. C2H2 typu. (<http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite-search-ac?PDOC00028>)

EGR2 je aktivován ve Schwannových buňkách již před začátkem myelinizace a poruchy jeho funkce v důsledku mutací vedou k zablokování vývoje Schwannových buněk v časném stadiu jejich diferenciaci. (Topilko et al., 1994)

Mutace v *EGR2* byly popsány u celého spektra pacientů s demyelinizačními formami HMSN, t.j. u kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN), u Dejerine-Sottas neuropatie (DSN) a později i u klasického demyelinizačního typu Charcot-Marie-Tooth – typ 1 (CMT1). (Suter a Scherer, 2003; Warner et al., 1998) Forma CMT1 způsobená mutacemi v genu *EGR2* byla označena jako CMT1D. (Suter a Scherer, 2003) Dosud bylo popsáno pouze 9 různých patogenních mutací a jeden nepatogenní polymorfismus v *EGR2* genu (Tab. 3).

(<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>) Téměř všechny popsané mutace jsou heterozygotní s dominantním efektem a u většiny je popsán vznik de-novo. Pouze jedna z mutací byla popsána u recesivní CHN v homozygotním stavu v konsangvinní rodině. (Warner et al., 1998)

Tab. 3. Přehled dosud publikovaných patogenních mutací v genu *EGR2*. U každé mutace je vyznačeno, zda vede k fenotypu CMT1, DSS či CHN. Zpracováno dle www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations

Mutace (v cDNA)	Změna v proteinu	Fenotyp	Citace
c.[803T>A]+[803T>A]	[Ile268Asn]+[Ile268Asn]	CHN	Warner et al., 1998
c.1064A>T	Asp355Val	CMT1-těžké	Bellone et al., 1999
c.1075C>T	Arg359Trp	DSS (+ post. hlavových nervů)/CMT1	Taroni et al., 1999 Timmerman et al., 1999 Boerkoel et al., 2001 Choi et al., 2004 Chung et al., 2005
EGR2:c.[1075C>T]+GJB1:c.[407T>C]	EGR2:[Arg359Trp]+GJB1:[Val136Ala]	DSS	Chung et al., 2005
c.1076G>A	Arg359Gln	CMT1 + progresivní skolióza	Mikesova et al., 2005
c.1086A>C	Arg362Arg	- (polymorfismus)	Timmerman et al., 1999 Choi et al., 2004
c.1141C>T	Arg381Cys	CMT1	Yoshihara et al., 2001
c.1142G>A	Arg381His	CMT1 (+ post. hlavových nervů)	Pareyson et al., 2000 Vandenberghe et al., 2002
c.[1146T>G;1147G>T]	[Ser382Arg; Asp383Tyr]	CHN	Warner et al., 1998
c.1147G>T	Asp383Tyr	DSS	Numakura et al., 2003
c.1225C>T	Arg409Trp	CMT1	Warner et al., 1998
c.1352G>T	Gly451Val	nespecifikované CMT	Takashima et al., 2001

5.2. Pacienti a metody

Testovala jsem 46 nepříbuzných pacientů s demyelinizační formou CMT. U všech pacientů byla v předešlém testování vyloučena přítomnost nejčastější CMT1A duplikace / HNPP delece pomocí sady mikrosatelitových markerů. (Seeman *et al.*, 2000) U některých pacientů byly navíc vyloučeny mutace v genech *Cx32*, *MPZ*, *PMP22*, *SIMPLE* a *GDAP1*.

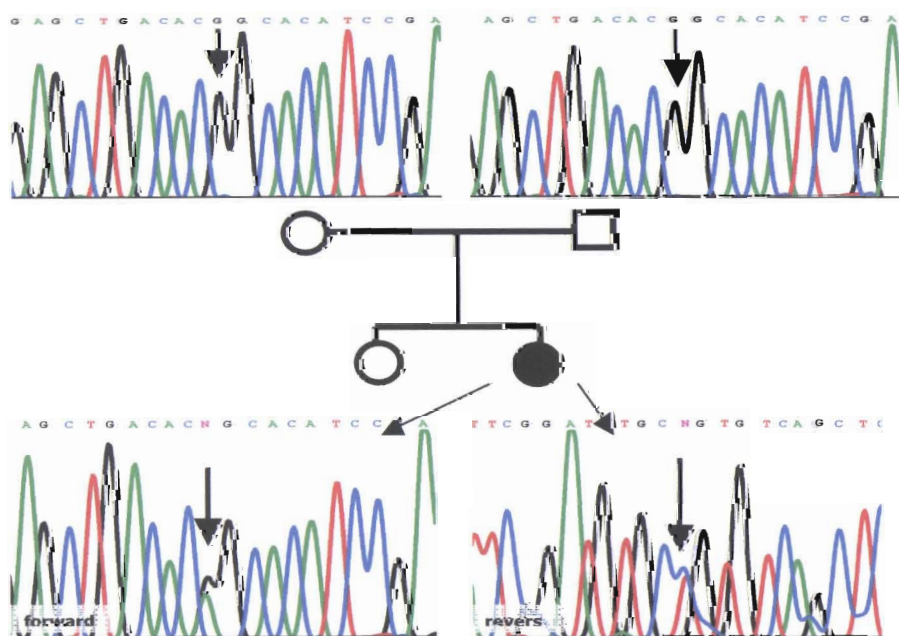
Pacienti byli vybráni podle těchto kritérií: rychlost vedení (NCV) motorickými vlákny n. medianus $NCV \leq 40$ m/s, dominantní nebo sporadický výskyt CMT v rodině a věk začátku neuropatie před 50. rokem věku. Vzorky genomové DNA jsem vyšetřovala přímým sekvenováním celé kódující a přilehlých nekódujících oblastí genu *EGR2*, jak již bylo popsáno.

5.3. Výsledky

DNA testování

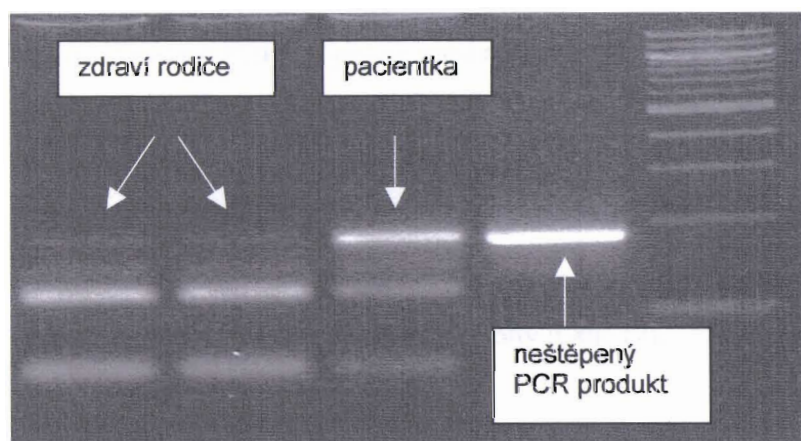
Nalezla jsem jednu novou missense mutaci v heterozygotním stavu, c.1076G>A, vedoucí k záměně aminokyselin Arg359Gln (R359Q) (Obr. 9). *EGR2* mutace byla zachycena v jedné ze 46 testovaných pacientů a frekvence *EGR2* mutací u CMT pacientů s demyelinizační formou CMT, bez nejčastější duplikované formy CMT1A, tak představuje přibližně 2%.

Nově identifikovaná mutace Arg359Gln nebyla nalezena u rodičů ani u starší sestry pacientky (Obr. 9), kteří nevykazují žádné příznaky periferní neuropatie a mají normální nález při kondukční studii periferních nervů. Paternita byla potvrzena vyšetřením 10 mikrosatelitových markerů. Tyto skutečnosti svědčí pro de-novo vznik mutace Arg359Gln u pacientky a pro kauzální patogenní charakter nalezené mutace.



Obr. 9. Mutace c.1076G>A, Arg359Gln u genu *EGR2* zachycená na forward a reverse sekvenci u pacientky a forward sekvence stejného úseku u otce rodičů, u kterých nebyla mutace zachycena.

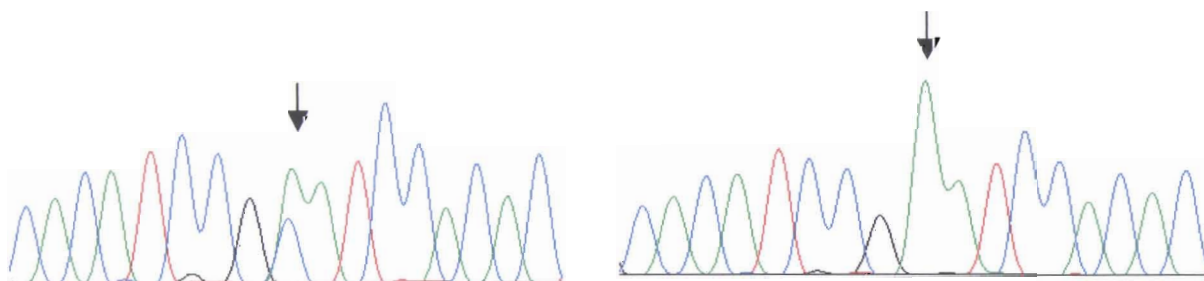
Oba rodiče pacientky a dále 138 kontrolních chromosomů (69 kontrolních DNA nepříbuzných nepostižených jedinců) bylo dále vyšetřeno metodou restriční analýzy s enzymem BceAI (BioLabs Inc., USA), u kterého zaniká díky mutaci restriční místo. Ani v jednom vzorku nebyla mutace Arg359Gln nalezena a byla tak vyloučena možnost, že se v české populaci jedná o běžný polymorfismus (Obr. 10).



Obr. 10.

Vyšetření rodičů a pacientky pomocí restričního štěpení PCR produktu enzymem BceAI. U pacientky, která je heterozygotkou pro mutaci Arg359Gln v EGR2, je patrné jen částečné štěpení PCR produktu v porovnání se zdravými rodiči, u kterých restriční místo enzymu nezaniká.

U dvou ze 46 testovaných pacientů byl v této studii dále nalezen dříve popsáný polymorfismus c. 1086A>C (Arg362Arg, R362R) (Obr. 11). (Timmerman et al., 1999; Vandenberghe et al., 2002; Choi et al., 2004)



Obr. 11. Vlevo F sekvence zachycující heterozygotní polymorfismus Arg362Arg v genu EGR2. Vpravo sekvence téhož úseku u normální kontroly.

Klinická a elektrofyziologická charakteristika pacientky nesoucí mutaci Arg359Gln

Nyní 18-ti letá pacientka je druhou dcerou zdravých nepříbuzných rodičů. Porodní váha, poporodní adaptace a časný psychomotorický vývoj byly v normě. Do 12 let věku byla pacientka zcela zdravá. Ve věku 12,5 let měla opakované distorce kotníků a ve věku 13 let zaznamenala epizodu slabosti dolních končetin během sprintu a přibližně ve stejném období rodina

zaznamenala první příznaky poruchy chůze charakteru „šoupání nohou“. Pacientka byla vyšetřena ortopedem, který popsal oboustrannou deformitu nohy pes cavus s kladívkovými prsty a thorakolumbální skoliózu. Progrese poruchy chůze, deformit nohou a skoliózy byla rychlá v prvním roce po nástupu obtíží, ale poté se relativně zpomalila. Svou roli v tom mohl sehrát intenzivní fyzioterapeutický program. Diagnóza CMT demyelinizačního typu 1 byla stanovena brzy po začátku onemocnění na základě EMG nálezů, které prokázaly výrazné snížení rychlosti vedení vzruchu periferními nervy.

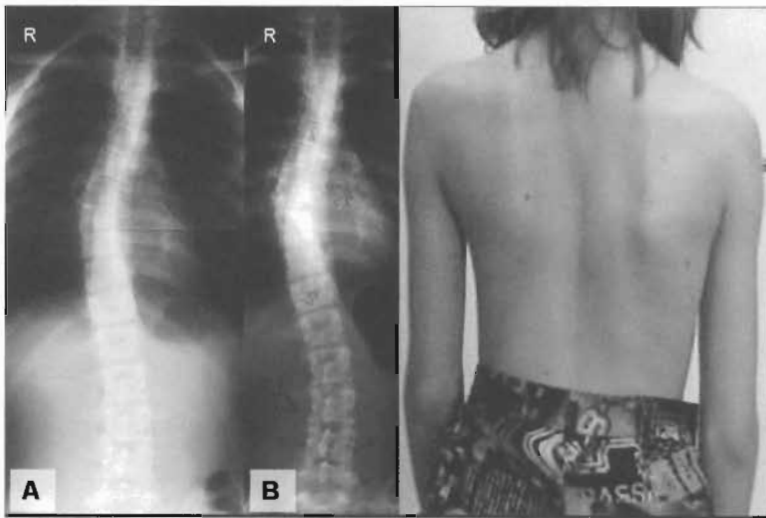
Neurologické vyšetření ve věku 17 let neprokázalo postižení hlavových nervů. Svalové atrofie byly mírného stupně a patrné pouze na svalech nohou. Pozorovali jsme bilaterální distální hypestezii a mírnou distální svalovou slabost flexorů zápěstí (4/5) a extenzoru hallucis longus (4/5). Pacientka měla bilaterální pes cavus s kladívkovými prsty a omezení úhlu maximální aktivní (105°) a pasivní (90°) extenze nohy (Obr. 12).



Obr. 12.

Deformita nohy pes cavus a omezení maximální extenze nohy u pacientky nesoucí mutaci Arg359Gln v genu *EGR2*.

Pacientka nebyla schopna chůze ani stoje na patách, měla vymizelé všechny reflexy na horních i dolních končetinách a neměla žádné známky ataxie. Měla středně těžkou a progresivní thorakolumbální skoliózu s pravou hrudní křivkou velikosti 36 stupňů dle Cobba a levou bederní křivkou velikosti 24 stupňů. Křivka v bederní oblasti progredovala o 8 stupňů během uplynulých 18 měsíců (Obr. 13). V době vyšetření pacientka netrpěla slabostí dýchacích svalů.

**Obr. 13.**

Thorakolumbální skolióza u pacientky s mutací Arg359Gln v genu *EGR2*. Ve věku 15,5 roku měla lumbální křivka velikost 16° (A), ve věku 17 let již 24° (B). Hrudní křivka v tomto období neprogredovala.

Kondukční studie ve věku 17 let ukázaly povšechné snížení rychlostí vedení vzruchu motorickými (MNCV) i senzitivními (SNCV) vlákny periferních nervů. Amplitudy akčního potenciálu v motorických (CMAP) a senzitivních vláknech (SNAP) byly na spodní hranici normálního rozmezí na horních končetinách a výrazně snížené až nedetekovatelné na dolních končetinách (hodnoty EMG vyšetření jsou shrnuty v Tab. 4).

Tab. 4. Výsledky kondukčních studií u pacientky nesoucí R359Q mutaci v genu *EGR2* odpovídají primární motorické a senzitivní demyelinizační lézi.

			Norma	Pacientka
Motorická vlákna	n. Medianus	DML (ms)	≤ 4.0	8.9
		MNCV (m/s)	≥ 51	13
		Amplituda (mV)	≥ 4.2	5.2
		F-wave (ms)	≤ 30	78.4
	n. Ulnaris	DML (ms)	≤ 2.8	6.5
		MNCV (m/s)	≥ 50	11
		Amplituda (mV)	≥ 5.5	5.5
		F-wave (ms)	≤ 30	50.9
	n. Peroneus (m. tibialis ant.)	DML (ms)	≤ 5.0	13.3
		MNCV (m/s)	≥ 39	16
	n. Tibialis	Amplituda (mV)	NA	2.5
		DML (ms)	≤ 5.5	14.3
MNCV (m/s)		≥ 40	9	
Senzitivní vlákna	n. Medianus	Amplituda (mV)	≥ 2.5	0.1
		SNCV (m/s)	≥ 48	16
	n. Ulnaris	Amplituda (μV)	≥ 10	5.0
		SNCV (m/s)	≥ 48	19
	n. Suralis	Amplituda (μV)	≥ 10	12
SNCV (m/s)		≥ 38	Neměřitelné	
		Amplituda (μV)	≥ 4.4	Neměřitelné

DML, distální motorická latence; MNCV, motor nerve conduction velocity – rychlost vedení motorickými vlákny; SNCV, sensory nerve conduction velocity – rychlost vedení senzitivními vlákny; NA, not available – hodnota není k dispozici. **Patologické hodnoty jsou tučně.**

Vyšetření blink reflexu ve věku 17 let prokázalo demyelinizační postižení n. facialis a trigeminus. Latence sluchových evokovaných potenciálů (BAEP) a zrakových evokovaných potenciálů (VEP) ve věku 17 let byly v normě. Koncentrace proteinů v mozkomíšním moku při vyšetření ve věku 13 let byla v normě (310 mg/l).

5.4. Diskuse

Ukázala jsem, že mutace v genu *EGR2* jsou velmi vzácné mezi českými pacienty s demyelinizačním typem onemocnění CMT. Sekvenováním genu *EGR2* jsem vyšetřila 46 nepříbuzných pacientů a pouze u jedné pacientky jsem našla kauzální mutaci. Jde o dosud nepopsanou missense mutaci Arg359Gln. Frekvence nalezených mutací v *EGR2* ve skupině CMT1 pacientů po vyloučení nejčastější formy CMT1A v této studii odpovídá asi 2,2 % a je v souladu s výsledky předešlých screeningových studií. (Warner *et al.*, 1998; Timmerman *et al.*, 1999; Vandenberghe *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2004; Numakura *et al.*, 2003)

Věk nástupu onemocnění u naší pacientky a její klinický obraz jsou velmi podobné nejčastějšímu fenotypu u formy CMT1A. U pacientky se objevily první příznaky neuropatie a thorakolumbální skoliózy na začátku druhé dekády života. Má výrazně zpomalené rychlosti vedení periferními nervy (NCV), oboustrannou deformitu nohy pes cavus, a pouze velmi mírné svalové atrofie. Nevykazuje žádné známky klinického postižení hlavových nervů.

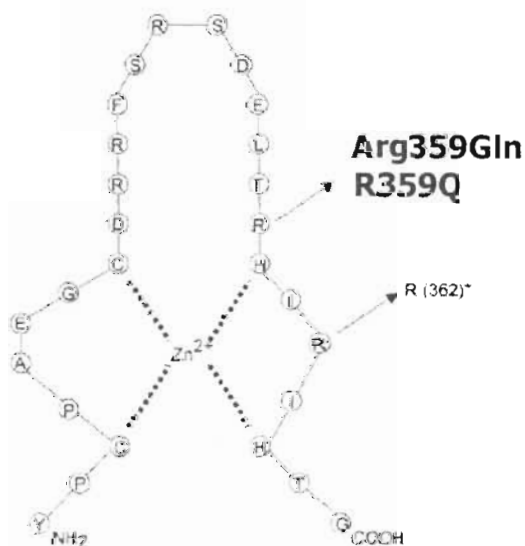
Ve srovnání s dalšími popsány fenotypy způsobenými mutacemi v genu *EGR2*, se věk nástupu a klinický obraz u naší pacientky shoduje nejlépe s fenotypem CMT1 u heterozygotních mutací Asp355Val (sporadický případ) a Arg409Trp (dominantní CMT1 rodina). (Bellone *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1998) Tito pacienti měli velmi podobný věk nástupu obtíží, ale NCV u naší pacientky jsou ještě výrazněji sniženy. Další dvě mutace v *EGR2*, obě v kodonu 381, jsou spojeny s CMT1 fenotypem, ale přesto se popsán klinický obraz poměrně významně liší od naší pacientky. (Yoshihara *et al.*, 2001; Pareyson *et al.*, 2000) Nositel heterozygotní mutace Arg381Cys měl NCV porovnatelné s naší pacientkou, ale měl velmi pozdní věk nástupu obtíží (59 let). (Yoshihara *et al.*, 2001) Druhá heterozygotní mutace Arg381His byla popsána v rodině s těžkou demyelinizační neuropatií CMT1 kombinovanou u jednoho člena rodiny s postižením hlavových nervů. (Pareyson *et al.*, 2000) Je potřeba zdůraznit, že v předešlých publikacích byli popsáni 4 pacienti s těžkou neuropatií typu Dejerine-Sottas nesoucí jinou mutaci (Arg359Trp, R359W) v témže kodonu 359 genu *EGR2*. (Timmerman *et al.*, 1999; Boerkoel *et al.*, 2001; Taroni *et al.*, 1999) První příznaky se u těchto pacientů objevily velmi časně – do 4 let věku, rychlosti vedení

periferními nervy byly u všech pod 8 m/s či zcela nedetekovatelné, ve třech případech bylo popsáno klinické postižení hlavových nervů, u jednoho pacienta se rozvinula těžká thorakolumbální skolióza a dva pacienti z této skupiny zemřeli v nízkém věku na respirační selhání. (Timmerman et al., 1999; Boerkoel et al., 2001) Fenotyp u naší pacientky je jednoznačně mírnější. Předpokládalo se, že mutace Arg359Trp konstantně způsobuje DSN, nedávná studie ovšem popisuje nález této mutace u dvou pacientů v dominantní CMT1 rodině. (Choi et al., 2004; Chung et al., 2005) Podrobná klinická studie provedená u naší pacientky rozšířila a obohatila znalosti o spektru fenotypů způsobených EGR2 mutacemi.

Mutovaný argininový zbytek 359 se nachází v α doméně prvního zinkového prstu proteinu EGR2 (Obr. 14). Tento zbytek je klíčový pro DNA vazebnou aktivitu EGR2 proteinu a její specificitu (Nardelli et al., 1991) a dříve popsaná mutace Arg359Trp snižuje v experimentu DNA vazebnou aktivitu EGR2. (Warner et al., 1999)

	1	11	21	31	41	51
1	MMTAKAVDKI	PVTLSGFVHQ	LSDNIYPVED	LAATSVTIFP	NAELGGPFDQ	MNGVAGDGM
61	NIDMTGEKRS	LDLPYPSSFA	PVSAPRNQTF	TYMGKFSIDP	QYPGASCYPE	GIINIVSAGI
121	LQGVTSFAST	TASSSVTSAS	PNPLATGPLG	VCTMSQTQPD	LDHLYSPPPP	PPPYSGCAGD
181	LYQDPSAFLS	AATTSTSSSL	AYPPPPSYPS	PKPATDPGLF	PMIPDYPGFF	PSQCQDLHG
241	TAGPDRKPF	CPLDTLRVPP	PLTPLSTIRN	FTLGGPSAGV	TGPGASGGSE	GPRLPGSSSA
301	AAAAAAAAAY	NPHHLPLRPI	LRPRKYPNRP	SKTPVHERPY	PCPAEGCDRR	FSRSDDELTRH
361	IRIHTGHKPF	QCRICMRNFS	RSDHLTTHIR	THTGEKPFAC	DYCGRKFARS	DERKRHTKIH
421	LRQKERKSSA	PSASVPAPST	ASCSGGVQPG	GTLCSSNSSS	LCGGPLAPCS	SRTRTP

EGR2, zinc-finger 1



Obr. 14.

Schéma α -helixu 1. zinkového prstu ve struktuře proteinu EGR2 a znázornění kodonu 359, který přímo sousedí s jedním ze dvou histidinů vázajících kationt zinku.

Nahoře je znázorněno aminokyselinové složení proteinu EGR2. Zvýrazněn je rozsah subdomény α -helixu 1. zinkového prstu, ve které leží mutace Arg359Gln.

(http://www.expasy.org/cgi-bin/sprot-ft-details.pl?P11161@ZN_FING@340@364)

Různé missense substituce v kodonu 359 genu *EGR2* vedou k rozdílným fenotypům. Jednoznačně mírnější fenotyp u nositelky mutace Arg359Gln je pravděpodobně dán menším dopadem substituce za glutamin na DNA vazebnou aktivitu proteinu, než v případě substituce za tryptofan u zmiňovaných DSN pacientů. Obdobná je situace v případě kodonu 381 *EGR2*, kde byl fenotyp Arg381Cys nositele mírnější, než fenotyp nositelů mutace Arg381His. (Vandenberghe et al., 2002; Yoshihara et al., 2001; Pareyson et al., 2000) Relativně četné substituce na dvou sousedních bazích v kodonu 359 *EGR2* odráží pravděpodobně přítomnost tzv. hot spot (horkého místa) pro vznik mutací v tomto CpG ostrůvku. (Boerkoel et al., 2001)

Mutace v *EGR2* vznikají často de novo a proto má smysl testovat zejména pacienty se sporadickým výskytem demyelinizační neuropatie. I přes pečlivý výběr testovaných pacientů je ovšem obecně pravděpodobnost záchytu kauzální mutace velmi malá. Přítomnost některých typických projevů u pacientů (progredující skolióza, velmi nízké NCV, časný začátek onemocnění) může pravděpodobnost nálezu mutace zvýšit.

Mutace Arg359Gln v genu *EGR2* byla zapsána do mezinárodní databáze mutací způsobujících CMT – Inherited Peripheral Neuropathy Mutation Database (Obr. 15). (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>)

IPNMDB Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database				
Mutations in EGR2				
	Mutation	Alias	Phenotype	Citations
	1 c.[803T>A]+[803T>A]	[Ile268Asn]+[Ile268Asn]	CH	Warner et al., 1998
	2 c.1064A>T	Asp355Val	CMT1-severe	Bellone et al., 1999
	3 c.1075C>T	Arg359Trp	DSS (plus cranial nerve involvement)/CMT1	Taroni et al., 1999 Timmerman et al., 1999 Boerkoel et al., 2001 Choi et al., 2004 Chung et al., 2005
	4 EGR2:c.[1075C>T]+GJB2:c.[407T>C]	EGR2:[Arg359Trp]+GJB1:[Val136Ala]	DSS	Chung et al., 2005
	5 c.1076G>A	Arg359Gln	CMT1 + progressive scoliosis	Mikesova et al., 2005
	6 c.1086A>C	Arg362Arg	- (polymorphism)	Timmerman et al., 1999 Choi et al., 2004
	7 c.1141C>T	Arg381Cys	CMT1	Yoshihara et

last updated: 14-Mar-07
Maintained by Eva Nelis, Marc Cruts, Han Wout

Obr. 15. Zápis mutace Arg359Gln v mezinárodní databázi mutací nalezených u dědičných neuropatií (IPNMDB).

6. Testování genu pro neurofilament light chain polypeptide (NEFL)

6.1. Úvod a cíle

Cytoskelet neuronů je tvořen třemi složkami: aktinovými mikrofilamenty, mikrotubuly a intermediálními filamenty (IF). Hlavním typem IF v dospělých neuronech jsou neurofilamenta (NF) o průměru 10 nm, která jsou složena ze tří podjednotek označených podle jejich velikosti: N-FL (neurofilament light), NF-M (neurofilament medium) a NF-H (neurofilament heavy). (Julien, 1999) Podjednotky neurofilament jsou syntetizovány v jádře neuronu (v perikaryon) a poté jsou transportovány do axonů, kde se organizují. (Perez-Olle, 2004) Neurofilamenta skupin N-FL, NF-M i NF-H mají stejnou trojdílnou strukturu s globulární doménou („hlavičkou“) na amino konci, centrální „tyčovou“ (rod) doménou a „ocáskem“ (tail) na karboxy konci. (Julien, 1999; Herrmann a Griffin 2002; Perez-Olle, 2004; Fabrizi et al., 2004) Neurofilamenta jsou důležitá pro udržení struktury a zajištění funkcí axonu a bylo prokázáno, že mutace v N-FL vedou k poruše transportu a agregace neurofilament. (Lee et al., 1993; Perez-Olle et al., 2004) Proto nebylo velkým překvapením zjištění, že mutace v podjednotce N-FL vedou k axonálnímu typu periferní neuropatie – CMT2. (Mersiyanova et al., 2000) Polypeptid N-FL je složen z 543 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 61 kDa. Kódující gen pro tuto podjednotku „neurofilament light chain polypeptide“ (NEFL), leží na chromosomu 8p21 v oblasti o velikosti 5,656 kbp a obsahuje čtyři kódující exony. (Julien et al., 1987)

Mutace v NEFL byly nejdříve nalezeny u pacientů s CMT axonálního typu (CMT2) a tato nová skupina byla označena jako CMT2E. (Mersiyanova et al., 2000) Následně byly ovšem mutace v NEFL popsány také u pacientů s demyelinizační formou CMT1, která dostala označení CMT1F. (Houlden a Reilly, 2006; Jordanova et al., 2003)

Doposud bylo v literatuře popsáno celkem 14 patogenních missense mutací postihujících 11 aminokyselin a jedna in-frame delece 5 aminokyselin v NEFL (Tab. 5). (www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/; Kabzinska, 2006; Fabrizi, 2007) První popsanou mutací byla Gln333Pro u CMT2. (Mersiyanova et al., 2000) Následoval popis mutace Pro8Arg v rozsáhlé belgické rodině s 10 postiženými jedinci. Dle elektrofyziologických nálezů je postižení v této

rodině klasifikováno jako CMT1 nebo také jako intermediální CMT (NCV mezi 25 a 45 m/s). (Jordanova et al., 2003)

Tab. 5. Přehled dosud publikovaných patogenních mutací v genu *NEFL*. U každé mutace je vyznačeno, zda vede k fenotypu CMT1 či CMT2 ev. k oběma. Zpracováno dle www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations

Mutace (v cDNA)	Změna v proteinu	Fenotyp	Citace
1 c.[19G>A]+[23C>G]	[Glu7Lys]+[Pro8Arg]	nespecifikované CMT	Jordanova et al., 2003
2 c.[22C>A;23C>G]	Pro8Arg	CMT2	De Jonghe et al., 2001
3 c.23C>A	Pro8Gln	CMT1	Jordanova et al., 2003
4 c.23C>G	Pro8Arg	CMT1	Jordanova et al., 2003
5 c.23C>T	Pro8Leu	CMT1	Jordanova et al., 2003
6 c.64C>A	Pro22Thr	CMT1	Yoshihara et al., 2002
7 c.64C>T	Pro22Ser	CMT1/2	Georgiou et al., 2002 Fabrzi et al., 2004 Fabrzi et al., 2006 Jordanova et al., 2003
8 c.265G>A	Glu89Lys	CMT1	Yoshihara et al., 2002
9 c.290A>G	Asn97Ser	CMT1	Jordanova et al., 2003 Yoshihara et al., 2002
10 c.443C>T	Ala148Val	nespecifikované CMT	Fabrzi et al., 2006
11 c.803T>C	Leu268Pro	CMT2	Mersiyanova et al., 2000
12 c.998A>C	Gln333Pro	CMT2	Fabrzi et al., 2006
13 c.963_977del	Del322Cys_326Asn	CMT2	Choi et al., 2004
14 c.1001T>C	Leu334Pro	CMT2	Choi et al., 2004
15 c.1189G>A	Glu397Lys	CMT1 / CMT2	Züchner et al., 2004 Fabrzi et al., 2006
16 c.1582_1584delGAG	Glu528del	CMT1 / polymorfismus	Yoshihara et al., 2002 Jordanova et al., 2003 Yamamoto et al., 2004

Prvním cílem mé práce bylo, vzhledem k tehdejším údajům o nálezů mutací spíše u CMT1 (Jordanova et al., 2003), zjistit frekvenci mutací v genu *NEFL* u českých pacientů s demyelinizačním typem CMT (CMT1) s autozomálně dominantním (AD) nebo sporadickým výskytem a s vyloučenou nejčastější CMT1A duplikací / HNPP delecí. Po vyšetření *NEFL* genu u početného souboru CMT1 pacientů, které nevedlo k nálezů žádné kauzální mutace, jsem následně provedla testování skupiny pacientů s AD nebo sporadickým výskytem axonálního typu periferní neuropatie (CMT2), opět s cílem identifikace zodpovědných mutací a určení jejich frekvence. Pacienti byli k vyšetření zařazeni po pečlivém výběru a analýze klinických a genealogických údajů podle předem stanovených kritérií (viz níže).

6.2. Pacienti a metody

Pacienti

Celkově jsem vyšetřila 111 nepříbuzných CMT1 nebo CMT2 pacientů na přítomnost mutací v genu *NEFL*.

Nejdříve jsem vyšetřila 66 českých nepříbuzných pacientů (z 66 rodin) s CMT1: První skupinu 48 pacientů jsem vybrala podle těchto kritérií: rychlost vedení (NCV) motorickými vlákny n. medianus $NCV \leq 40$ m/s, dominantní nebo sporadický výskyt CMT v rodině a věk začátku neuropatie před 50. rokem věku. Dalších 18 pacientů jsem vybrala podle upravených kritérií, která preferovala pacienty s časnějším věkem nástupu onemocnění: rychlost vedení (NCV) motorickými vlákny n. medianus nebo n. ulnaris $NCV \leq 40$ m/s, dominantní nebo sporadický výskyt CMT v rodině a začátek onemocnění před 20. rokem života. U všech CMT1 pacientů byla již dříve testováním sady 17 polymorfních markerů (*Seeman et al., 2000*) vyloučena nejčastější forma CMT1A a ebeny mutace v některých z dalších testovaných genů.

V další sérii jsem vyšetřila 45 nepříbuzných českých pacientů s CMT2 s AD nebo sporadickým výskytem v rodině a s údajem o primárně axonálním typu periferní neuropatie (NCV n. medianus / n. ulnaris > 38 m/s). U sporadických případů jsem přednostně vybrala pacienty, u kterých byly již vyšetřeny alespoň další dva CMT-asociované geny bez nálezu kauzální mutace.

Za účelem ověření segregace nových missense variant v *NEFL* detekovaných ve dvou rodinách s postižením CMT, jsem vyšetřila dalších 6 členů rodiny A (mutace Tyr265Cys) a 3 členy rodiny B (mutace Lys529Glu).

Dále jsem otestovala celkem 103 zdravých jedinců kavkazské populace jako kontroly pro obě nové varianty zachycené v *NEFL*.

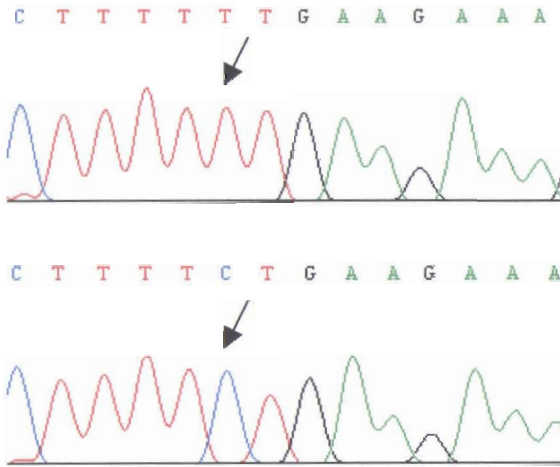
Molekulární analýza

Vzorky genomové DNA byly vyšetřeny přímým sekvenováním celé kódující a přilehlých nekódujících oblastí genu *NEFL* (viz kapitola 3.3).

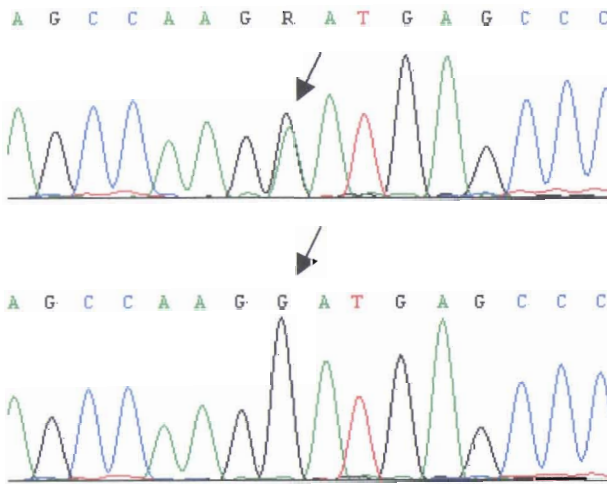
Přítomnost nové mutace Tyr265Cys, která vytváří nové restrikční místo pro enzym BtsI, byla následně testována na 103 vzorcích kontrolní populace pomocí analýzy délky restrikčních fragmentů (RFLP) s tímto enzymem (BioLabs Inc., USA). Stejný počet kontrol pro mutaci Lys529Glu byl otestován přímým sekvenováním exonu 4 genu *NEFL*.

6.3. Výsledky

Ve skupině 66 CMT1 pacientů jsem nenalezla kauzální mutaci v *NEFL* ani u jednoho pacienta. U dvou pacientů jsem identifikovala tyto dříve popsané nepatogenní polymorfismy: c.667C>T (Leu224Leu) (Obr. 16) v exonu 1 v homozygotní formě a c.1405G>A (Asp469Asn) v exonu 3 v heterozygotní formě (Obr. 17). (Jordanova et al., 2003)



Obr. 16.
Nahoře polymorfismus
c.670C>T (**Leu224Leu**)
v genu *NEFL*, dole kontrolní
sekvence.

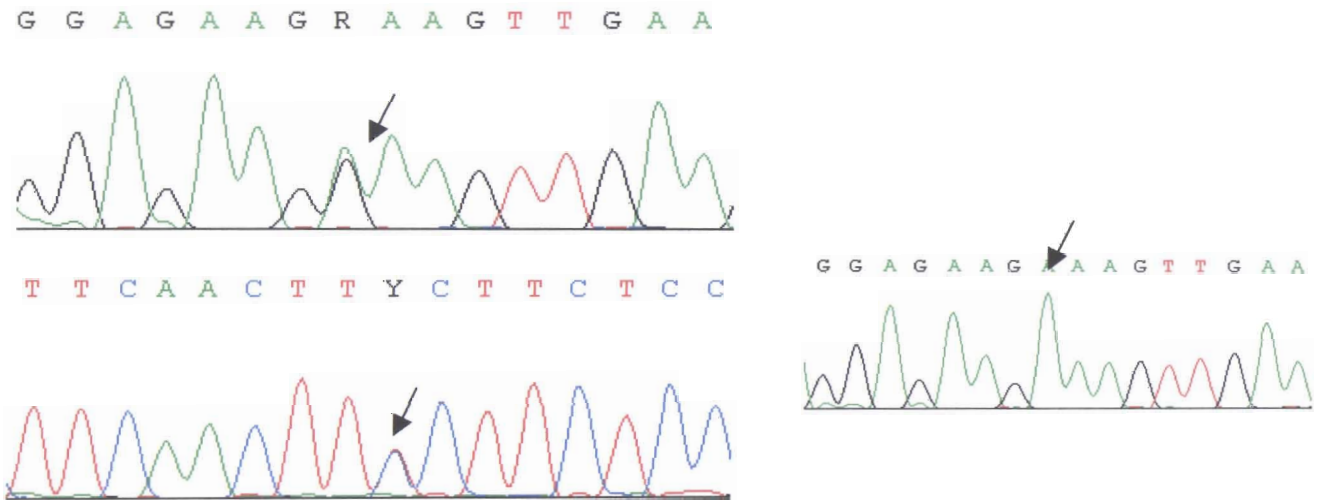


Obr. 17.
Nahoře forward sekvence
s heterozygotním polymorfismem
c.1405G>A (**Asp469Asn**), dole
kontrolní sekvence.

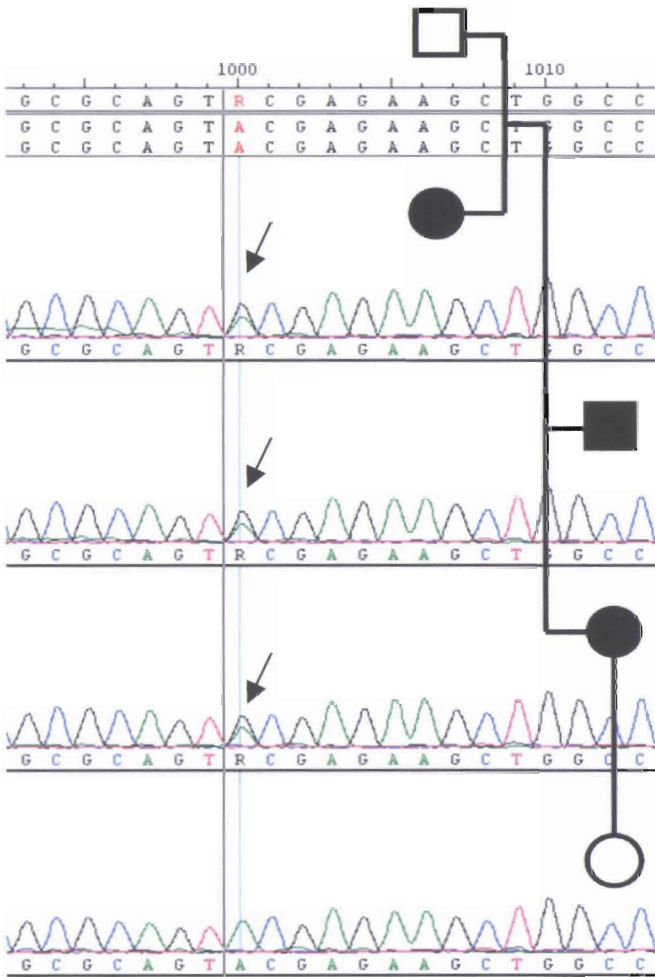
Dále jsem identifikovala množství opakujících se intronových změn – patrně polymorfismů, které nebyly v literatuře publikovány ani studovány. Jedná se o tyto záměny (v závorce je uvedena jejich četnost zjištěná v testovaném souboru): IVS 1+46G>A (3/66) v heterozygotní

formě; IVS 2+111T>G v heterozygotní formě (1/66); IVS 2-13T>C v heterozygotní formě (5/66) (sekvence nejsou zobrazeny).

Ve druhé vyšetřené skupině 45 CMT2 pacientů jsem našla dvě nové mutace v heterozygotním stavu ve dvou rodinách. Jedná se o pravděpodobně kauzální mutaci c.794A>G v exonu 1 *NEFL* vedoucí k záměně aminokyseliny tyrosin na cystein – Tyr265Cys (Obr. 19). Tato mutace byla doposud nalezena ve 4 generacích u 5 ze 7 vyšetřených členů stejné CMT2 rodiny (dále rodina A). Nebyla detekována v žádném z 206 vyšetřených kontrolních chromozomů. Druhou identifikovanou mutací je heterozygotní záměna c.1585A>G v exonu 4 *NEFL* vedoucí k záměně aminokyseliny lysin za glutamovou kyselinu – Lys529Glu (Obr. 18). Tato záměna byla nalezena celkem ve 3 generacích - u sporadicky postižené pacientky s CMT2 a dále u jejího otce s neobjasněným jednorázovým a přechodným postižením hybnosti a u jeho zdravé matky (rodina B). Mutace nebyla zachycena v žádném z 206 vyšetřených kontrolních chromozomů. Jedná se pravděpodobně o vzácný nepatogenní polymorfismus v genu *NEFL*.



Obr. 18. Heterozygotní záměna c.1585A>G (AAA>GAA) v exonu 4 *NEFL* vedoucí k záměně aminokyseliny lysin za glutamovou kyselinu – mutace **Lys529Glu**. Vlevo nahoře forward, dole revers sekvence. Vpravo kontrolní forward sekvence.

**Obr. 19.**

Forward sekvence zachycující novou heterozygotní mutaci c.794A>G (TAC>TGC) (**Tyr265Cys**) v genu *NEFL* u 3 členů rodiny s AD výskytem CMT2. V poslední řádce normální sekvence nepostížené členky rodiny.

Ve skupině CMT2 jsem dále identifikovala několik polymorfismů – již popsány c.1212C>T (Ser404Ser) (1/45) (Jordanova et al., 2003) a dále dva intronové polymorfismy IVS 2+111T>G (1/45) a IVS 2-13T>C (5/45) zachycené již ve skupině CMT1 (sekvence nejsou zobrazeny).

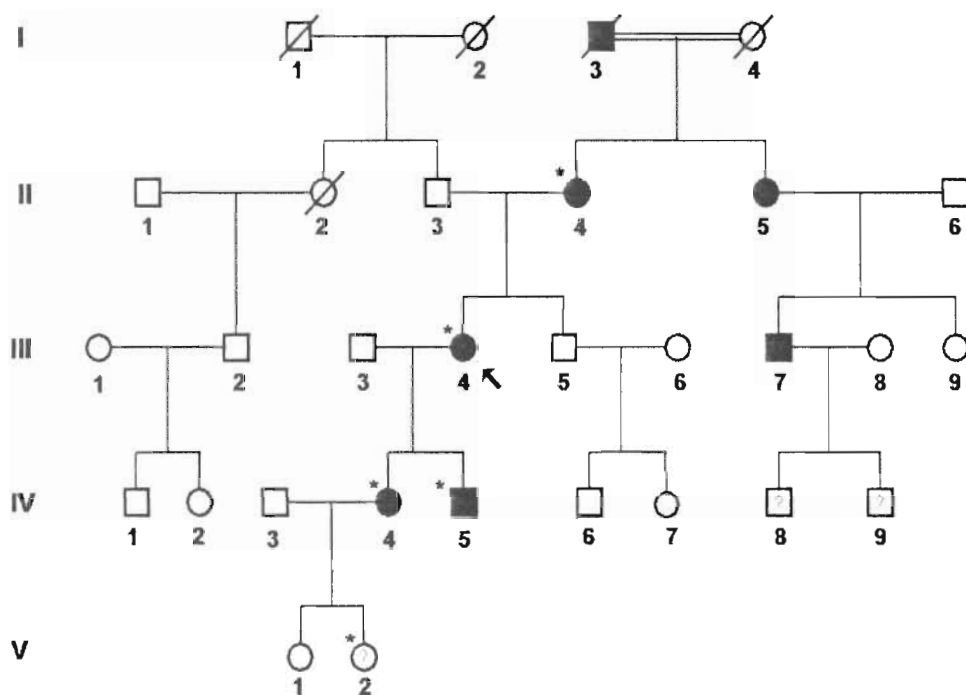
Celkový přehled všech sekvenčních variant (polymorfismů a kauzálních mutací) zachycených v genu *NEFL* je uveden v tabulce 6.

Tab. 6. Přehled námi zachycených mutací a polymorfismů v genu *NEFL*. Počet rodin se zachycenou záměnou je uveden ve sloupečku vpravo (n/111).

	Exon 1/Intron 1		Exon 2/Intron 2		Exon 3		Exon 4	
Polymorfismy	Leu224Leu	1	IVS2+111T>G	2	Asp459Asn	1	Lys529Glu	1
	IVS1+46G>A	3	IVS2-13T>C	10	Ser404Ser	1		
Kauzální mutace	Tyr265Cys	1						

Rodina A: AD CMT2 rodina nesoucí mutaci Tyr265Cys v genu NEFL

Jedná se o rodinu s mutací Tyr265Cys zachycenou ve čtyřech po sobě následujících generacích u 5 žijících členů rodiny (II/4, III/4, IV/4, IV/5 a V/2) (sekvence na Obr. 19; rodokmen na Obr. 20). U 4 členů ze tří generací (II/4, III/4, IV/4, IV/5) je postižení dědičnou polyneuropatií typu CMT2 podrobně klinicky a EMG zdokumentováno. Členové rodiny II/5 a III/7 námi nebyly podrobně klinicky ani EMG vyšetřeni pro nesouhlas, avšak charakter poruchy chůze, atrofií a deformit na dolních končetinách svědčí pro postižení dědičnou neuropatií stejného charakteru, jako u ostatních příbuzných v rodině.

**Obr. 20.**

Rodokmen AD rodiny nesoucí mutaci **Tyr265Cys** v genu *NEFL*. Postižení je klinicky a EMG prokázáno ve 3 generacích; mutace je detekován celkem u 5 členů rodiny ze 4 generací (nosiči označení hvězdičkou). U jedinců s otazníkem není klinický a EMG fenotyp znám (u nosičky mutace VI/2 pro velmi nízký věk, jedinci IV/8 a IV/9 jsou dle údajů od otce zdraví).

Dle údajů rodiny byl poruchou chůze a deformitami nohou postižen maternální pradědeček probandky (I/3), Matka probandky II/4 (75 let) má těžkou deformitu nohy s kladívkovými prsty, poruchu chůze a nález těžké axonální léze na EMG. Její sestra (maternální teta probandky) má těžké postižení stejného charakteru, ale nebyla dosud vyšetřena molekulárně geneticky ani EMG. Její syn (maternální bratranec probandky) je také postižen a je v invalidním důhodu od 45 let pro poruchu chůze.

Probandka má 1 zdravého bratra a 2 děti postižené dědičnou neuropatií – syna (IV/2; 27 let) a dceru (IV/1; 28 let). Dcera a syn mají od dětství poruchu chůze, bolesti nohou, zkrácení Achillových šlach. Syn má bilaterální deformitu pes excavatus.

PROBANDCE (III/4) je v současné době 52 let. Periferní neuropatie se u ní začala projevovat ve věku 8 let věku bolestmi nohou a opakovanými výrony kotníků, asi v 10 letech se vytvořila bilaterální deformita pes excavatus s kladívkovými prsty a začala atrofovat lýtka. Ve škole nezvládala tělocvik (zvláště běh a skoky) pro silné bolesti nohou. Obtíže trvale pomalu

progredují a od 38 let je pacientka v plném invalidním důchodu. V současné době kromě poruchy chůze a stability udává subjektivně noční bolesti stehen a lýtek, parestezie nohou i rukou, poruchy taktilního čítí na ploskách doprovázené bolestí a poruchu termického čítí na dolních končetinách. Od 50 let pozoruje poruchu citlivosti na rukou. Od 38 let používala 1 francouzskou hůl, od 50 let používá obě trvale. Ve věku 51 let podstoupila korektivní ortopedickou operaci pravé nohy (op. sec. Steindler) a ve věku 52 let levé nohy (artrodéza sub talo) ke zmenšení deformity s velmi dobrým efektem na mobilitu a postavení nohou.

Při objektivním vyšetření ve věku 52 let měla fyziologický nález na mozkových nervech, horní končetiny (HK) bez nápadných svalových atrofií, kontrakturu pravého malíku, jemný akrální třes prstů, normální svalovou sílu na HK (MRC 5/5) (Obr. 21). Reflexy C5-C6 byly normálně výbavné, C7-C8 oslabené, taxe byla přesná, vibrační čítí (ladička) na prstech rukou bylo významně omezeno (prostředník 4/8, malík 2/8), monofilamentum 8-9/10 – zhoršení citlivosti na malíku obou rukou. Na dolních končetinách (DK) měla pacientka výrazné svalové atrofie zasahující do distální 1/3 stehen, oboustrannou deformitu pes cavus po operativní korekci (Obr. 21), zkrácené Achillovy šlachy (90 st.) a distální oslabení extenze a flexe palce (3/5). Reflexy L2-L4 byly zvýšené (3) s rozšířenou zónou, reflexy S1 normálně výbavné, vibrační čítí (ladička) bylo od polovin bérků níže vymizelé (0/8), pod koleny silně oslabeno (1/8), vnímání monofilamenta od poloviny bérků níže 0/10, na kolenou 3/10. Termické čítí pod koleny bylo vymizelé. Na špičky ani na paty se pacientka nepostaví, chůze je abnormální, možná pouze s oporou. Klinický obraz odpovídá polyneuropatickému syndromu s převahou postižení DK nad HK, s postižením motoriky i sensitivity.



Obr. 21.
 Probandka III/4 nesoucí mutaci Tyr265Cys v genu *NEFL*. **A** – Stav deformat pes excavatus a pes equinovarus před operacemi. **B, C a D** – stav po operacích s výbornou nápravou varozity. **E a F** – ruce bez nápadných atrofií, kontraktura pravého dig. V., lehce omezená špetka.

DCEŘI PROBANDKY (IV/4) je 28 let. Její časný psychomotorický vývoj byl normální, chodila od 14 měsíců. Počátek obtíží s CMT udává v 10 letech, kdy měla opakované distorze kotníků a objevily se obtíže s během („plácání“ nohama). Od 25 let má po ránu silné bolesti plosek nohou při prvním kontaktu s podložkou, v těhotenství měla přechodně brnění nohou, jinak parestezie neudává, poruchy čítí subjektivně nemá, bolest cítí dobře. Obtíže na rukou zatím nepozoruje.

Při objektivním vyšetření ve věku 28 let měla pacientka fyziologický nález na mozkových nervech, horní končetiny bez atrofií s normální svalovou silou (MRC 5/5), normální špetku, reflexy C5-C6 zvýšené (3), C7-C8 snižené (1), přesnou taxi, zkrácené vibrační čítí (ladička) na prstech (6/8), vnímání monofilamenta 10/10. Dolní končetiny měla bez patrných atrofií, s normální svalovou silou (MRC 5/5), bez pes cavus, pouze kladívkovité prsty a varozitu nohou (Obr. 22). Achillovy šlachy má pacientka zkráceny (dorsální flexe max. do dx/sin 95/85 st.), reflexy L2-L4 jsou v normě, reflexy S1 jsou vymizelé, vibrační čítí (ladička) na palcích vymizelé (0/8) a výše je výrazně oslabeno (4/8), vnímání

monofilamenta na ploskách dx/sin 6/10, 7/10. Na špičky se postaví, na paty ne, dřep svede. Chůze je samostatná s normálním došlapováním na paty. Termické čítí je neporušeno.



Obr. 22. Dcera probandky (pacientka IV/4) nesoucí mutaci Tyr265 Cys v genu *NEFL*,

A, B – dolní končetiny bez patrných atrofií.

C, D a E – nohy s kladívkovými prsty ale bez deformity pes cavus, patrné zkrácení Achillových šlach při maximální extenzi nohy.

F – ruce bez nápadných atrofií a kontraktur.

SYNOVI PROBANDKY (IV/5) je nyní 27 let. Od dětství měl vyšší nártý, asi od 11 let byl pomalejší při běhu, měl obtíže se skoky do dálky a pocíval chladné prsty u nohou. Neurologicky a molekulárně geneticky byl poprvé vyšetřen v rámci sledování své matky. Má bolesti nohou po námaze, udává krátké přechodné bolesti a brnění plosek nohou ráno po došlápnutí na podložku (obdobně jako jeho sestra). Subjektivní poruchy čítí neudává, obtíže na rukou nepozoruje. EMG bylo vyšetřeno opakovaně s nálezem primárně axonálního typu periferní neuropatie (Tab. 8).

Při objektivním vyšetření ve věku 27 let měl pacient fyziologický nález na mozkových nervech, horní končetiny byly bez atrofií a s normální svalovou silou (MRC 5/5), s jemným akrálním třesem prstů, reflexy bicipitové i tricipitové byly snižené (1), taxe přesná, vibrační čítí (ladička) na prstech HK bylo zkráceno (5/8), vnímání monofilamenta 10/10; na DK byly patrné atrofie až do 1/3 lýtek, zkrácení

Achillových šlach (90 st.), oboustranná deformita pes cavus s kladívkovými prsty (Obr. 23). Dorsální flexi svedl maximálně do 100 stupňů. Měl distální svalovou slabost (oslabená extenze pravé nohy (MRC 3-4/5) a extenze obou palců (MRC 2/5), reflexy patellární i reflexy Achillových šlach nebyly vybavitelné, vibrační cití (ladička) na palcích DK bylo vymizelé (0/8), na vnitřních kotnících i pod koleny oslabené (4/8), vnímání monofilamenta na prstech a chodidlech 5/10. Chůzi a stoj spatný (II) měl pacient nestabilní, na špičky postavil, na paty ne, dřep byl možný s oporou. Taktilní a termické cití bylo dle orientačního vyšetření neporušeno. EMG vyšetření bylo provedeno ve 24 letech (Tab. 8).



Obr. 23. Syn probandky (pacient IV/5) nesoucí mutaci Tyr265Cys v genu *NEFL*.

A, B, C – dolní končetiny s patrnými atrofiemi do 1/3 lýtek.

D a E – nohy s kladívkovými prsty s mírnou deformitou pes cavus, patrné zkrácení Achillových šlach při maximální extenzi (dorsální flexi) nohy.

F, G, H – ruce bez nápadných atrofií a kontraktur.

MATCE PROBANDKY (II/4) je nyní 75 let a je také nosičkou mutace Tyr265Cys. Od mládí udává deformity nohou a zvýšenou únavnost při chůzi. Neurologicky byla vyšetřena pro narůstající obtíže až ve 48 letech a krátce na to jí byl přiznán invalidní důchod. Francouzské hole používá od 50 let. Bolesti ani parestezie neudává, na ruku pozoruje zhoršenou citlivost. Pacientka užívá chronickou medikaci pro astma bronchiale a hypertenzi.

Při objektivním vyšetření ve věku 75 let měla fyziologický nález na mozkových nervech, patrné svalové atrofie rukou, jemný akrální třes prstů, mírně oslabenou svalovou sílu stisku rukou a extenze zápěstí (MRC 4/5). Reflexy C5-C6 a C7-C8 byly nevýbavné, špetka byla výrazně omezená, vnímání vibračního cití (ladička) na prstech rukou bylo významně zkráceno (3/8). Na dolních končetinách měla výrazné svalové atrofie zasahující až do distálních 1/3 stehen, oboustrannou deformitu nohou pes cavus (bez nápadně zvýšené klenby) ale s výraznými kladívkovými prsty, zkrácené Achillovy šlachy (90 st.) a distální svalovou slabost na DK (extenze nohou a palcou (2/5)). Reflexy L2-L4 a S1 byly nevýbavné, vibrační cití (ladička) bylo vymizelé na celých DK včetně na spina iliaca ant. sup. (0/8), monofilamentum na ploskách nevnímala (0/10). Na špičky ani na paty se pacientka nepostaví, dřep nesvede, chůze je abnormální, možná pouze s oporou.

EMG vyšetření svědčí pro těžkou motorickou a sensitivní primární axonální lézi (hodnoty zde nejsou uvedeny).

Další členové rodiny nebyli molekulárně geneticky ani podrobně neurologicky vyšetřeni. Bratr probandky byl vyšetřen neurologicky i EMG a je zdrav.

Přehled klinického stavu a neurologického vyšetření u matky probandky (II/4) probandky (III/4) a jejich dvou postižených dětí (IV/4 a IV/5) je uveden v tabulce 7. Výsledky EMG kondukčních studií u jedinců III/4, IV/4, IV/5 a II/4 jsou znázorněny v tabulce 8.

Tab. 7. Přehled klinického stavu čtyř neurologicky vyšetřených nosičů mutace Tyr265Cys v genu *NEFL* (rodina A). (Tabuška v angličtině do připravované publikace o vyšetření *NEFL* genu u českých CMT pacientů.)

Patient		III/4	IV/4	IV/5	II/4	
Genotype		Tyr265Cys	Tyr265Cys	Tyr265Cys	Tyr265Cys	
Age(yr)/ Gender		54 / F	28 / F	26 / M	75 / F	
Initial symptoms		Recurrent ankle sprains; lower extremity pain	Recurrent ankle sprains; slapping feet	High arched feet; weakness in LE; cold feet	Foot deformities; weakness in LE	
Age of onset (yr)		8	10	<10	<10	
Foot deformity		Severe pes cavus and equinovarus with hammer toes	Feet varosity and hammer toes	Mild pes cavus with hammer toes	Severe pes cavus and hammer toes	
Motor	LE	<i>Weakness distal or proximal (MRC)</i>	No	No	Distal weakness; great toe extension 2/5, foot dorsiflexion 4/5	Distal weakness; great toe extension 2/5, foot dorsiflexion 3/5
		<i>Atrophy</i>	Severe, up to distal thirds of thighs	No	Mild, up to distal thirds of calves	Severe, up to distal thirds of thighs
	UE	<i>Weakness distal or proximal (MRC)</i>	No	No	No	Mild distal weakness (4/5)
		<i>Atrophy</i>	No	No	No	Hands
Walking ability		Crutches	No support	No support; unstable	Crutches	
Reflexes	LE	L2-L4 increased with enlarged reflexogenic zone; L5-S1 normal	L2-L4 normal; L5-S1 absent	L2-L4 absent; L5-S1 absent	L2-L4 absent; L5-S1 absent	
	UE	C5-C6 normal; C7-C8 decreased	C5-C6 increased; C7-C8 decreased	C5-C6 decreased; C7-C8 decreased	C5-C6 absent; C7-C8 absent	
Sensory	<i>Touch sense/pain</i>		Severe loss up to knees	Moderate loss at feet	Moderate loss up to knees	Severe loss at feet
	<i>Vibration sense (x/8)</i>		Reduced at fingers at UE (4/8); reduced up to distal thighs at LE (2/8)	Reduced up to knees (4/8)	NA	Reduced up to elbows at UE (4/8); absent up to spina iliaca ant. sup. at LE (0/8)
	<i>Monofilament testing</i>		Absent at soles, reduced up to knees	Reduced at soles	NA	Absent at soles
	<i>Thermal sense</i>		Absent up to knees, reduced up to hips	Mild loss at feet	NA	NA
Other		Contracture of right hand dig. V	No	Keratoconus bilaterally	No	

M, male; F, female; LE, lower extremities; UE, upper extremities; MRC, Medical Research Scale; NA not available

Tab. 8. Výsledky kondukčních studií motorických a sensitivních vláken u pacientů III/4, VI/4 a IV/5 nesoucích mutaci Tyr265Cys (pedigree A) v genu *NEFL* odpovídají motorické a sensitivní, primární axonální lézi. Nálezy u pacientky nesoucí variantu Lys529Glu (pedigree B) v genu *NEFL* odpovídají primární motorické axonální lézi. Výsledky u jejího otce (M/38) jsou fyziologické. (Tabulka v angličtině do připravované publikace o vyšetření *NEFL* genu u českých CMT pacientů.)

			Normal	Pedigree				
				Case/sex/years				
				A	A	A	B	B
				III:4 F/52	IV:4 F/24	IV:5 M/24	F/14	M/38
Motor nerves	Median nerve	DML (ms)	≤ 4.0	6,1	5,7	4,9	3,3	3,8
		MNCV (m/s)	≥ 51	50	48	42	62,9	62
		Amplitude (mV)	≥ 4.2	3,5	7,5	3,7	10,7	9,1
		F-wave (ms)	≤ 30	34,4	32	36,4	18,4	23,6
	Ulnar nerve	DML (ms)	≤ 2.8	4,15	5,2	3,4	2,8	2,7
		MNCV (m/s)	≥ 50	49,4	50	59	68,7	55,3
		Amplitude (mV)	≥ 5.5	4,6	3,1	2,3	4,9	5,1
		F-wave (ms)	≤ 30	35,6	NA	34,3	20	28,4
	Peroneal nerve (m. TBA)	DML (ms)	≤ 5.0	5,4	11,7	6,5	3,3	4,0
		MNCV (m/s)	≥ 39	40	37	42,7	40,1	48,5
		Amplitude (mV)	NA	1,9	0,5	0,6	0,7	7,6
	Tibial nerve	DML (ms)	≤ 5.5	7,9	10,2	7,4	4,5	4,3
MNCV (m/s)		≥ 40	36	35	18	39,2	43,4	
Amplitude (mV)		≥ 2.5	0,3	0,4	0,1	1,2	11,4	
Sensory nerves	Median nerve	SNCV (m/s)	≥ 48	43,2	45	52	58,5	71,7
		Amplitude (uV)	≥ 10	9,2	7,1	13	26	11
	Ulnar nerve	SNCV (m/s)	≥ 48	37,5	44	42	59,2	46,7
		Amplitude (uV)	≥ 10	4,3	4,7	7,5	19	2,9
	Sural nerve	SNCV (m/s)	≥ 38	5,9	N.R.	7	3,8	6,7
		Amplitude (uV)	≥ 4.4	4,8	N.R.	5	10	7,7
Needle EMG	m. TBA	Fibrillation and fasciculation		None	None	None	n.p.	n.p.
		Voluntary contraction pattern		Red. 4/5	Red. 4/5	Red. 4/5	n.p.	n.p.
		Amplitude MUP (mV)		4,0	5,6	3,7	n.p.	n.p.

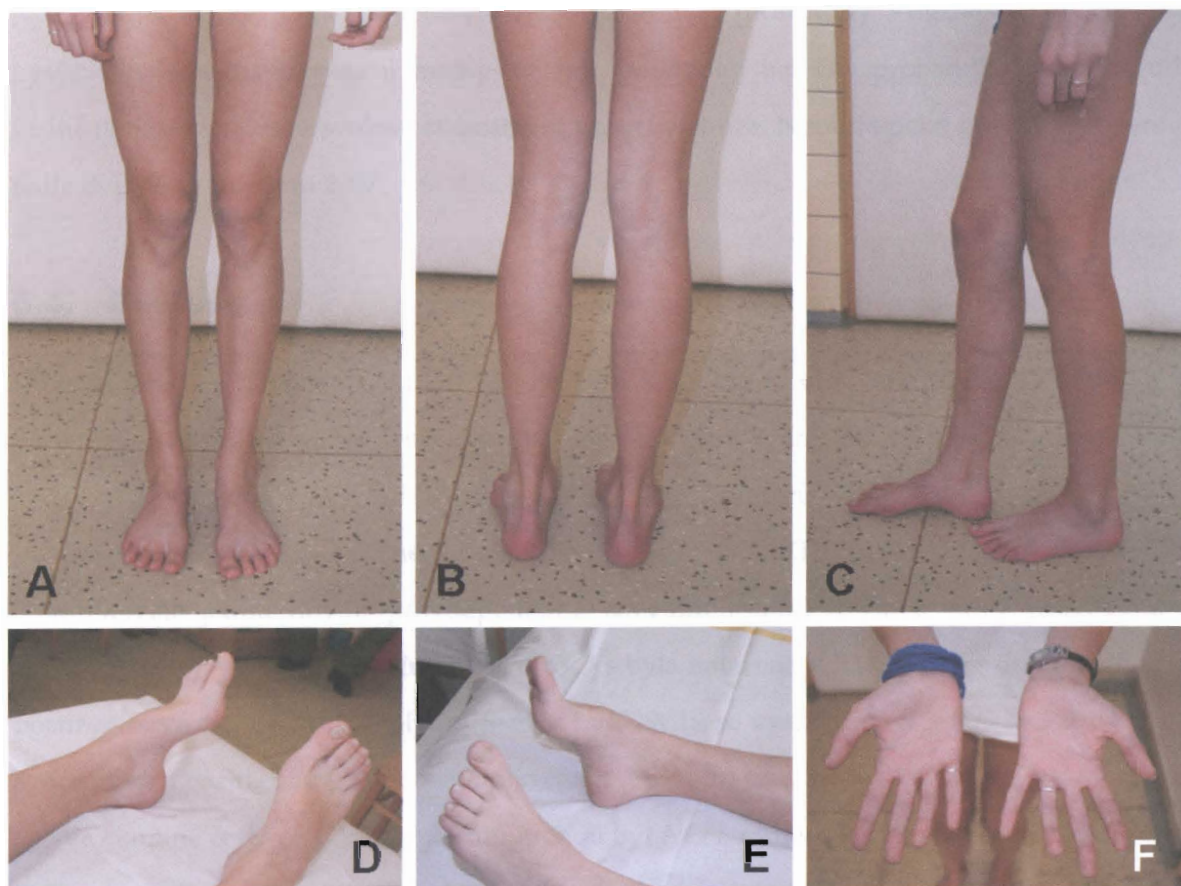
M, male; F, female; DML, distal motor latency; MNCV, motor nerve conduction velocity; SNCV, sensory nerve conduction velocity; m. TBA, m. tibialis anterior; N.R. not recordable; n.p. not performed; NA not available; Red., reduced; MUP, motor unit potential.

Rodina B: Rodina s výskytem mutace Lys529Glu v genu NEFL

Mutace Lys529Glu byla zachycena u 14-leté sporadicky postižené dívky, u které byla diagnostikována dědičná neuropatie typu CMT2 na Oddělení dětské neurologie Nemocnice v Novém Městě na Moravě (prim. MUDr. Součková). Je jediným dítětem zdravých rodičů. Již dříve byla vyšetřena na přítomnost mutací v genech *GDAP1* a *Cx32* s negativním výsledkem.

První obtíže u probandky začaly ve 2 letech. Po prodělaných planých neštovicích a následné viróze s horečkami měla bolesti dolních končetin a svalovou slabost, padala, zakopávala a na 1 den zcela přestala chodit. Stav se postupně během 2 týdnů upravil, ale v podobné formě se několikrát opakoval vždy po prodělaném běžném virovém onemocnění s teplotami (ve 4 a 10 letech). Pacientka zakopává při chůzi na rovném terénu a od 10 let má časté distorze kotníků (většinou mírné, 1x se sádrou fixací).

Při objektivním vyšetření ve 13 letech měla pohledový nystagmus do všech směrů, jinak fyziologický nález na mozkových nervech, živější reflexy C5-8 (2+), naznačenou deformitu pes cavus s kladívkovitými prsty (Obr. 24), mírně zkrácené Achillovy šlachy (85°), zvýšené reflexy L2-L4 (3) s rozšířenou zónou nad kolena, lehce snížené reflexy S1 (2-), oslabení síly extenze palců na DK (4/5), oslabené vibrační cití na DK (5/8) do výše kotníků. Chůze byla samostatná s abnormálním zvedáním prstů při došlápnutí (kompenzace zkrácení Achillových šlach). Taktilní cití bylo normálně zachováno.



Obr. 24. A, B, C – Vzhled dolních končetin bez zjevných atrofií u probandky nesoucí heterozygotní záměnu Lys529Glu v genu *NEFL*. Patrná je varozita pravé paty. **D, E** – naznačená mírná deformita pes cavus. **F** – ruce bez patrných atrofií.

Při EMG vyšetření v 10 letech byl nález na horních končetinách v normě, na dolních končetinách byl obraz axonální převážně motorické neuropatie (viz výše tabulka 8).

Následně byli vyšetřeni rodiče pacientky na DNA úrovni a stejná missense záměna byla nalezena u otce (38 let). Orientační neurologické vyšetření bylo u obou rodičů v normě. Při podrobné analýze osobních dat otce se ukázalo, že ve věku 7 let prodělal příušnice a poté byl asi měsíc hospitalizován s podezřením na encefalititu (opakovaně vyšetřená lumbální punkce byla však normální). S týdenním odstupem po ukončení hospitalizace se u něj rozvinula celková porucha hybnosti – přestal zcela chodit a nebyl se schopen pro slabost ani posadit a otáčet na lůžku. Stav trval asi 10 dní, poté se začal spontánně upravovat a odezňel do 3 týdnů při současně prováděné rehabilitaci. Příčina stavu nebyla objasněna, ale k jeho opakování v této míře již nikdy nedošlo. V dospělosti se u otce objevuje (cca 1x za 2 roky) během horečnatých onemocnění přechodně trvající slabost a bolesti dolních končetin (1 den). Nedávno provedené kondukční studie u něj byly zcela v normě (bez známek axonální léze motorických vláken jako u dcery) (viz výše tabulka 8).

V dalším kroku jsem vyšetřila DNA od prarodičů probandky z otcovy strany a záměna Lys529Glu byla detekována u matky (68 let) (paternální babičky probandky), která neudává žádné obtíže charakteru svalové slabosti ani poruchy chůze. Neurologické a EMG vyšetření u ní bude doplněno v červnu 2007.

6.4. Diskuse

Ukázala jsem, že mutace v genu *NEFL* jsou pravděpodobně velmi vzácné mezi českými CMT1 pacienty. Ve skupině 66 pacientů s prokazatelným postižením CMT1 a s vyloučenou formou CMT1A nebyl identifikován ani jeden pacient s kauzální mutací v *NEFL*.

Dále jsem vyšetřila 45 nepříbuzných pacientů z CMT2 rodin a v této skupině jsem identifikovala jednu novou pravděpodobně kauzální mutaci a jeden nový pravděpodobně nepatogenní polymorfismus. Mutace Tyr265Cys byla nalezena v AD rodině s dokumentovaným postižením ve 4 generacích. Polymorfismus Lys529Glu se vyskytuje ve 3 generacích v rodině se sporadickým postižením CMT2 u jednoho člena.

Ve skupině českých CMT2 pacientů mohou být *NEFL* mutace zodpovědné asi za 2% případů (2,2%; 1 ze 45 testovaných rodin) a jejich testování je opodstatněné zejména u AD případů. Významnější se zdá i časnější věk začátku v 1. dekádě (rodina A) a poměrně variabilní tíže postižení v rodině. Celková frekvence mutací *NEFL* mezi pacienty s CMT1 i CMT2 formami je přibližně 0,9% (1 pozitivní nález mezi celkově 111 testovanými rodinami). Tato nízká frekvence zhruba odpovídá celkové frekvenci *NEFL* mutací udávané v jiné rozsáhlejší studii na kavkazské populaci (Jordanova et al., 2003), ve které byla záchytnost 1,9% (6 z celkového počtu 323 vyšetřených rodin s CMT1, CMT2 i bez specifikovaného typu neuropatie a po vyloučení nejčastějších forem). Je ovšem překvapivé, že MNCV na n. medianus ve všech 6 rodinách s detekovanými mutacemi v této studii jsou nižší než 38 m/s a spadají tak do rozmezí pro CMT1. V jiné studii provedené na asijské populaci, která ovšem nespécifikuje elektrofyziologický typ vyšetřované skupiny, byl celkový záchyt *NEFL* mutací (po vyloučení CMT1A) 2 ze 42 rodin, tedy 4,8%. (Choi et al., 2004) Zcela nedávno vyšla rozsáhlá studie mutací v *NEFL* u 177 CMT pacientů (76 s CMT1 a 101 s CMT2), ve které bylo detekováno celkem 5 kauzálních mutací, z toho 3 u forem CMT2 (určeno dle NCV n. med) a 2 u forem CMT1. (Fabrizi et al., 2007) Celková frekvence mutací *NEFL* ve skupině CMT1 i CMT2, po vyloučení nejčastějších mutací, tak odpovídá 2,8%; frekvence pouze ve skupině CMT1 odpovídá 2,8%; frekvence pouze ve skupině CMT2 3%. Toto je jediná publikovaná studie s dostupným údajem o frekvenci výskytu *NEFL*

mutací pouze ve skupině CMT2 pacientů. Námí zjištěná frekvence 2,2 % je velmi podobná tomuto výsledku. (Fabrizi et al., 2007)

CMT v důsledku NEFL mutací začíná typicky v 1. nebo ve 2. dekádě svalovou slabostí na dolních končetinách a poruchami chůze. (Züchner a Vance, 2006) Někteří pacienti měli velmi časný začátek onemocnění (Jordanova et al., 2003), který byl v případě nosiče mutace Asn97Ser dále komplikován opožděním psychomotorického vývoje. (Züchner a Vance, 2006) Svalová slabost na dolních končetinách dosahuje u pacientů různého stupně, od mírného oslabení až po kompletní parézu. (De Jonghe et al., 2001; Züchner a Vance, 2006) Poruchy cití jsou typicky přítomné u nosičů mutací v NEFL a zahrnují všechny modality. U většiny pacientů je přítomna deformita nohy pes cavus (Tab. 9). Rodiny s mutacemi v NEFL vykazují často poměrně velkou variabilitu tíže postižení. Horní končetiny jsou většinou pouze mírně postiženy. (Fabrizi et al., 2007) U dvou rodin s mutacemi Glu396Lys a 322Cys-326Asn in-frame delecí byla zaznamenána vazba epizodické ataxie na horečnatá onemocnění. (Fabrizi et al., 2007; Züchner et al., 2004)

Tab. 9. Přehled publikovaných údajů (dědičnosti, věku začátku, klinického a elektrofyziologického fenotypu) o pacientech s kauzálními mutacemi v genu NEFL.

NEFL mutace	Dědičnost	Zač. (věk)	Fenotyp	Klinika	Por. cití	Pes Cavus	MNCV n. med(m/s)/ Amp.(uV)	REF.
Pro8Arg (c.22C>A+23 C>G)	AD	2. dekáda	CMT2	Slabost (někde i paréza) a atrofie DK i HK	ano	NA	25-39 (1.4–3.8)	De Jonghe et al., 2001
Pro8Gln	Spor.	<5	CMT1 (Těžký)	Slabost a atrofie DK i HK, kontraktury DK	ano	ano	21 (1)	Jordanova et al., 2003
Pro8Arg (c.23C>G)	Spor.	7-13	CMT1 (Těžký)	Slabost a atrofie DK i HK	ano	ano	38 (4.9)	Jordanova, 2003
Pro8Leu	Spor.	<2	CMT1 (Těžký)	Slabost a atrofie DK i HK, třes, opožděná chůze	ne	ano	15 (2)	Jordanova et al., 2003
Pro22Thr	AD	18, 24	CMT1 (Těžký/ Středně těžký)	Slabost a atrofie DK i HK	sev./m od	NA	36 (0.01) 29 (0.74)	Yoshihara et al., 2002
Pro22Ser	AD	1. dekáda	CMT2 (Mírný/ Středně těžký)	Slabost a atrofie DK a později HK	ano	ano	21-54 (0.8-4.6)	Georgiou et al., 2002
	AD	Pozdní dětství	CMT2 (Středně těžký)	Slabost a atrofie DK i HK	ano	ano	21-43 (2-7.4)	Fabrizi et al., 2004
Glu89Lys	Spor.	<2	Středně těžký	Slabost a atrofie DK i HK	ano	ano	26 (3.9)	Jordanova et al., 2003

Pokračování Tab. 9.

NEFL mutace	Dědičnost	Zač. (věk)	Fenotyp	Klinika	Por. čítí	Pes Cavus	MNCV n. med(m/s)/ Amp.(uV)	Citace
Asn97Ser	Spor.	<1	CMT1 (Těžký)	Slabost a atrofie DK i HK, opožděný PM vývoj	NA	ano	26 (7.4)	Jordanova et al., 2003
	Spor.	15	CMT1 (Středně těžký)	Slabost a atrofie DK i HK	mild	NA	22 (0.52)	Yoshihara et al., 2002
Ala148Val	Spor.	33	Nespec. CMT (Mírný)	Slabost a atrofie DK i HK	mild	NA	NA	Yoshihara et al., 2002
Leu268Pro	AD	1.-5. dekáda	CMT2 (Mírný/ Středně těžký)	Slabost a atrofie DK a méně HK; někde hluchota	ano – vibr. čítí	NA	38-55 (3.2-8.7)	Fabrizi et al., 2007
del322Cys_326Asn	AD	1. dekáda	CMT2 (Mírný/ Středně těžký)	Slabost a atrofie DK a méně HK; někde hluchota a sensorická ataxie	ano – vibr. čítí	NA	39-49 (6.9-17.2)	Fabrizi et al., 2007
Gln333Pro	AD	2.-3. dekáda	CMT2 (Středně těžký)	Slabost a atrofie DK	ano	ano	38-52	Mersiyanova et al., 2000
Leu334Pro	Spor.	NA	CMT2	NA	NA	NA	NA	Choi et al., 2004
Glu397Lys	AD	4-46	CMT2 (Mírný/ Středně těžký)	Slabost a atrofie; hluchota (1 pac.)	mild/ sev.	ano/ ne	57 – 63 (10–14)	Züchner et al., 2004
	AD	NA	CMT1	NA	NA	NA	NA	Choi et al., 2004
	AD	1.-2. dekáda	CMT1 (Středně těžký)	Slabost a atrofie DK i HK; hluchota (1 pac.)	ano – vibr. čítí	NA	29-30 (2.1)	Fabrizi et al., 2007
Glu528del	AD	12	CMT1 (Mírný)	Slabost a atrofie DK	ano	ano	30 (11.5)	Jordanova et al., 2003

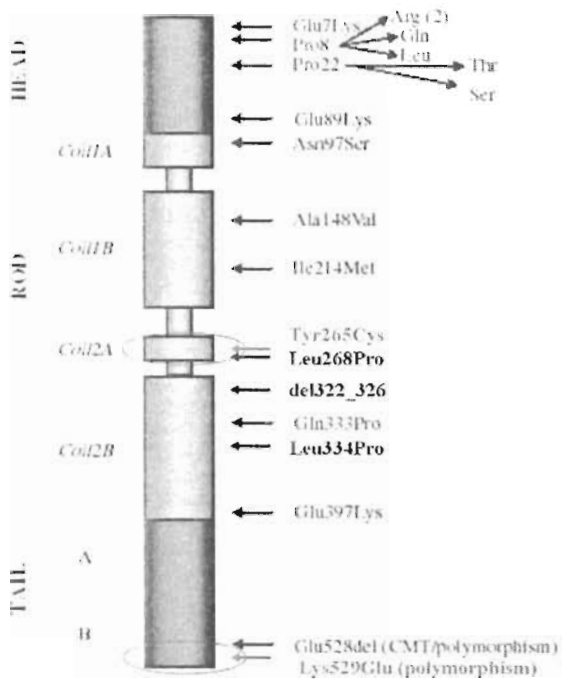
HK, horní končetiny; **DK**, dolní končetiny; **MNCV**, rychlost vedení motorickými vlákny; **Amp.**, amplituda motorické odpovědi; **AD**, autozomálně dominantní přenos; **mild**, mírné postižení; **mod.**, středně těžké postižení; **sev.**, těžké postižení; **PM**, psychomotorický vývoj; **NA**, hodnota nebo údaj není k dispozici

Jak vyplývá ze souhrnné tabulky 9, rychlosti vedení motorickými vlákny n. medianus (MNCV) jsou poměrně variabilní od výrazně snížených (v pásmu CMT1), přes hraničně snížené, až po hodnoty normální u dvou publikovaných mutací (Gln333Pro, Glu397Lys). (Mersiyanova et al., 2000; Züchner et al., 2004) Amplitudy motorické odpovědi n. medianus (Amp., CMAP) jsou většinou středně až výrazně snížené. Snížení MNCV může být spíše sekundární, primárně jde pravděpodobně většinou jen o axonální postižení.

Rodina A

Postižení pacientů z námi zachycené rodiny A, nesoucí mutaci Tyr265Cys, není zcela identické s žádným z ostatních dokumentovaných CMT2E případů. Poměrně vysokými motorickými rychlostmi vedení n. medianus (MNCV), které ani u jednoho postiženého člena rodiny neklesají pod 38 m/s (43 – 48 m/s), se elektrofyziologický fenotyp rodiny A nejvíce blíží AD rodinám s mutacemi Glu397Lys a Gln333Pro. (Mersiyanova et al., 2000; Züchner et al., 2004) Klinické postižení u našich pacientů s mutací Tyr265Cys odpovídá polyneuropatickému syndromu s převahou postižení DK nad HK s postižením motoriky i sensitivity. Horní končetiny jsou u pacientů klinicky i elektrofyziologicky téměř nepostiženy, probandka má pouze lehkou kontrakturu malíku na pravé ruce bez známek svalové slabosti. V tomto je fenotyp odlišný od většiny CMT2E pacientů, u kterých je uváděna různá míra svalové slabosti a svalových atrofií i na horních končetinách (viz přehledná tabulka 9).

Mutace Tyr265Cys leží v centrální „tyčové“ doméně proteinu NF-L. Tato část je tvořena 4 spirálovitými subdoménami označovanými „coiled coil“ doména. (Mersiyanova et al., 2000; <http://expasy.org/uniprot/P07196>) Mutace Tyr265Cys leží v nejmenší z nich – coiled coil 2A – ve které byla doposud popsána pouze jedna kauzální mutace (Leu268Pro) (Obr. 25 a 26). (<http://expasy.org/cgi-bin/sprot-ft-details.pl?P07196@REGION@252@270>; Fabrizi et al., 2007) Centrální „rod“ doména je zodpovědná za vzájemnou agregaci neurofilament v axonu. (Mersiyanova et al., 2000; Carpenter a Ip 1996) Vzhledem k charakteru záměny Tyr265Cys, kde tyrosin (Tyr; molekulová hmotnost MW 181) je mírně polární aminokyselina s heterocyklickým jádrem a cystein (Cys; MW 121) naproti tomu aminokyselina obsahující –SH skupinu náchylnou k oxidaci a lehce tvořící hydrofobní disulfidické můstky, lze předpokládat významný dopad této mutace na zmíněný proces agregace neurofilament. Aminokyselina tyrosin v pozici 265 je vysoce konzervovaná jak v rámci široké skupiny lidských intermediálních filament, tak mezidruhově (Obr. 27).

**Obr. 25.**

Schematické znázornění domén polypeptidu NEFL. Nově nalezená mutace Tyr265Cys leží v centrální doméně v podjednotce „coiled coil 2A“. Varianta c.1585A>G, Lys529Glu leží na konci „tail“ domény. (Upraveno dle Kabzinska *et al.*, 2006)

```

1 mssfsyepyy stsykrryve tprvhissvr sgystarsay ssysapvsss lsvrrsysss
61 sgslmpslen ldlsqvaais ndlksirtqe kaqlqdlndr fasfiervhe leqqnkvlae
121 ellvlrqkhs epsrfralye qeirdlrlaa edatnekqal qgeregleet lrnlqaryee
181 evlsredaeg rlmearkgad eaalaraele kridslmdei sflkkvheee iaqlqagiqy
241 aqisvemdvt kpdlsaalkd iragyeklaa knmqnaeewf ksrftvltes aakntdavra
301 akdevsesrr llkaktleie acrgmneale kqlqeledkq nadisamqdt inklenelrt
361 tksemarylk eyqdllnvkm aldieiaayr klllegeetrl sftsvgsits gysqssqvfg
421 rsaygglqts sylmstrsfp syytshvqee qieveetiea akaeekdep psegeaeeee
481 kdkeaeaeeee aaaeaeaeake eseakeeeee qgegeegqet keaeekkkv eqageeqaak
541 kkd

```

Obr. 26. Aminokyselinové složení proteinu NEFL. Jednoduchým podtržením je zvýrazněn rozsah subdomény coiled coil 2A, ve které leží mutace Tyr265Cys. Dvojitým podtržením je zvýrazněna subdoména B koncové (tail) domény, ve které leží varianta Lys529Glu.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=62511894>

	170	180	190	200	210	220	230	240				
*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....											
gi 125961	188	RRVDAENRLQTLKEE	ELFQKN	IYSEELRE	TKRRHETR	-----LVEIDNGR	RqqefESKLA	EALQDLRR	QHE	DQIRHYRD	260	
query	205	ARALEKRIDSLMDE	ISFLK	KVHEEE	IAELQAQIQYA	q-----iSV	ENDVT	-----KPDLS	AALKD	IRAQYE	KLAAKNHQ	274
gi 549452	203	NRLQLEKKVESLLDE	IAFLR	KVHEEE	IAELQASVQEA	q-----iSV	ENDVVS	-----KPDLT	AALK	KEIRMQ	YEVLSARNQQ	273
gi 1703221	209	ARLDLEKKVESLLDE	IAFVR	QVHDEE	VAELLATLQAS	Ssga-aaeVD	VAVA	-----KPDLT	SALRE	IRAQY	ESLAAKNLQ	281
gi 128146	211	MRAELDKKVSQSLQDE	EVAF	LRGNHEE	EVAELLAQLQAS	h-----aTV	KRDYL	-----KTDLT	TALKE	IRAQLE	CQSDHNNH	281
gi 33302611	212	ARVDLQKKAQALQEE	ECGY	LRHHQEE	EVGELLGQIQGS	gaaqaqmQA	ETRDAL	-----KCDV	TALRE	IRAQLE	GHAVQSTL	287
gi 138531	209	ARLDLERKVESLDE	IAFL	KKLHDEE	IAELQASVQEA	q-----iQV	DHVS	-----KPDLT	AALRD	VVRQY	ENVAARNLS	278
gi 118453	212	ARLDLERKIESLQEE	IAFL	KKVHEEE	IRELQAQLQE	qh-----iQV	ENDIS	-----KPDLT	AALRD	IRAQY	ESIAAKNIA	281
gi 124212	210	ARLDLERKIVETLQEE	IMFL	KKLHDEE	IAELQAQIRDS	q-----fKV	ENDVV	-----RPDLT	AALQ	DVRSQ	FDKLASKNIA	279
gi 121135	182	ARLDLERKIESLEEE	IRFL	RKIHEE	EVRELQEQLAR	q-----vHV	ELDV	-----KPDLT	AALKE	IRTQY	EAMASSNNH	251
gi 400800	193	ARLELERKIESLDE	IEFL	KKHDEE	IQDVQVSVQSQ	q-----mK	MEVETS	-----RPDLT	GALRD	IRAQY	ESIAATKNLS	278
gi 129822	207	SRLELERKIESLHDE	IEFL	KKLHEE	ELRDLQVSVES	q-----vQ	VEVEATv	-----KPELT	AALRD	IRAQY	ENIAAKNLQ	278
gi 125116	224	RKSDLEANSEALIQE	IDFL	RRLYQEE	IRVLQANISDT	S-----vIV	KDMSR	-----DLN	MD	IVAEI	KAQYDDIASRSRA	294
gi 2506774	206	NKVELESRLGLTDE	INFL	RQLYEE	EIRELQSQISDT	S-----vV	LSDMSR	-----SLD	HDS	IAEV	KAQYEDIANRSRA	276
gi 124740	224	NKVELEAKLESLSDE	INFL	RQIFEE	EIRELQSQIKDS	h-----vV	VENDMSR	-----NLD	HDA	IAEV	RAQYEDIANRSRA	294
gi 20178293	207	SKVELEAKVDALNDE	INFL	RLTNETE	LTQLSQSISDT	S-----vV	LSDMSR	-----SLD	LDG	IAEV	KAQYENAKCSRA	277
gi 125105	285	NKVELEAKVDALNDE	INFM	KMFFDA	ELSQQHSHVSDT	S-----vV	LSDMNR	-----NLD	DS	IAEV	KAQYEEIANRSRT	355
gi 547752	300	NKVELEAKVDSLTD	EVFL	RLTLYEME	LSQMSHASDT	S-----vV	LSDMNR	-----CLD	LS	IAEV	RTQYEEIAQRSKS	370
gi 20141510	268	NKVELEAKVDSLND	EVFL	KLVYDA	ELSQQHSHVSDT	S-----vV	LSDMNR	-----NLD	DS	IAEV	RAQYEEIAQRSKA	338
gi 547754	301	IKVELQSKVDLLNQE	IEFL	KLVYDAE	ISIQIHQSVTDT	n-----vI	LSDMSR	-----NLD	DS	IAEV	KAQYEEIAQRSKE	371
gi 547750	205	KKEHQEEVDGLH	KKHLGNT	[2].V.[1].VDA	[2].GLNLG	VIHNEH	RQYEV	HAQKNLQ	EAKE	QFERQ	TAVLQQQVTV	274
gi 547748	288	KKNHKEEHSQ	LTGQNSGD	[2].V.[1].INV	[2].GKDL	TKTLNDH	RQYEQ	LIAKNNK	DIENQ	YEQIT	IQIEHEVSS	357
gi 125063	214	KKNHEEVRGLQ	QAQIASS	[3].V.[1].VDA	[2].SQDL	LAKIMAD	IRAQY	DELARKN	RELDK	YVSQ	IEESTTVVTT	284
gi 125956	202	KNVFEEIRETR	RRKHEHR	[1].V.[1].VDT	[6].ENK	HAQALD	LNQHD	EQVKL	YKMELE	QTYQAK	LENAILASDQ	274
gi 125952	208	KNVYEEIKET	RRKHETR	[1].V.[1].VDS	[6].EYK	LAQALKE	IREQHD	AQVKL	YKKELE	QTYSS	LENIROSSEM	280
gi 125959	207	KNIHTQEVKE	IKRRHETR	[1].V.[1].IDS	[6].ESK	LAELQEL	PRDHE	QQILE	YKHEH	EKHF	SARLENAQLAAK	279
gi 266616	273	KDVHAQELKEL	AALAYRD	[2].A.[1].NRE	[2].RNEL	LAQAIRD	IQQYD	AKCDQ	RGRD	IEATY	NLKVQEFRTGATK	342

Obr. 27. Vysoce konzervovaná oblast v proteinu NEFL v rámci široké rodiny lidských intermediálních filament i mezidruhově. Šipkou je znázorněn kodon 265, ve kterém leží mutace Tyr265Cys. [gi 125961](#) – Lamin A Gallus Gallus, [gi 549452](#) XNIF_XENLA Low molecular weight neuronal intermediate filament (XNIF), [gi 1703221](#) - AINX_RAT Alpha-internexin (ALPHA-INX)[Rattus norvegicus], [gi 128146](#) - NFM_CHICK Neurofilament triplet M protein (160 kDa neurofilament protein) (Neurofilament medium polypeptide) (NF-M) [Gallus gallus], [gi 33302611](#) - NFH_HUMAN Neurofilament triplet H protein (200 kDa neurofilament protein) (Neurofilament heavy polypeptide) (NF-H) [Homo sapiens], [gi 138531](#) - VIM1_XENLA Vimentins 1 and 2, [gi 118453](#) - DESM_CHICK Desmin [Gallus gallus], [gi 124212](#) - IF3T_TORCA Type III intermediate filament, [gi 121135](#) - GFAP_HUMAN Glial fibrillary acidic (432 aa), [gi 400800](#) - PLST_CARAU Plastacin, [gi 129822](#) - PERI_RAT Peripherin, [gi 125116](#) - K2M2_SHEEP Keratin, Type II Microfibrillar, [gi 2506774](#) - K2C8_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8) (K8) (CK 8) [Homo sapiens], [gi 124740](#) - ION3_CARAU Intermediate filament protein ON3, [gi 20178293](#) - K2C7_HUMAN Keratin type II cytoskeletal 7 Cytokeratin 7 K7 CK 7 Sarcolectin, [gi 125105](#) - K2C5_HUMAN KERATIN, Type II Cytoskeletal 5 (Cytokeratin 5) (K5) (CK 5) (58 KDA Cytokeratin), [gi 547752](#) - K22O_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 oral (Cytokeratin 2P) (K2P) (CK 2P) [Homo sapiens], [gi 20141510](#) - K2C4_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 4 (Cytokeratin 4), [gi 547754](#) - 22E_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin 2e), [gi 547750](#) Keratin, type I cytoskeletal 20 (Cytokeratin 20) (K20) (CK 20), [gi 547748](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin 9) (K9) (CK 9), [gi 125952](#) Lamin B1, [gi 125959](#) Lamin L(III) (Lamin B3), [gi 266616](#) 60 kDa neurofilament protein (NF60), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/conserveddomains>

Rodina B

Klinický obraz CMT u sporadicky postižené pacientky z rodiny B, nesoucí pravděpodobně nepatogenní mutaci Lys529Glu v genu *NEFL*, odpovídá axonální, převážně motorické, neuropatii s velmi časným začátkem, postihující zejména dolní končetiny. Začátek onemocnění i jeho průběh je poměrně atypický. Onemocnění se poprvé projevilo ve 2 letech výraznou svalovou slabostí DK navazující na prodělané plané neštovice a nasedající virózu, která pacientce přechodně zcela znemožnila chůzi. Mimo tyto řídké ataky je pacientka minimálně postižena a progrese je velmi pomalá. Ve věku 14 let má zcela zachovanou a téměř normální chůzi, má hyperreflexii na dolních i horních končetinách. Podle EMG se jedná o axonální převážně motorickou neuropatii postihující pouze dolní končetiny. Rychlosti vedení motorickými vlákny n. medianus (MNCV) byly ve věku 14 let normální a amplitudy CMAP výrazně sniženy. Jde proto jednoznačně o typ CMT2. Stejná záměna Lys529Glu byla následně nalezena u otce, který je klinicky zdravý, nicméně v jeho osobní anamnéze je několik epizod svalové slabosti DK v souvislosti s horečnatým onemocněním. Na rozdíl od probandky jsme však v jeho případě při EMG vyšetření detekovali normální rychlosti vedení a amplitudy odpovědí a tak nelze mluvit o periferní neuropatii. Paternální babička probandky, u které byla identifikována stejná záměna Lys529Glu, neudává žádné podobné obtíže. **Na základě těchto poznatků nelze považovat missense záměnu Lys529Glu za kauzální mutaci. Jde spíše o vzácný polymorfismus v genu NEFL. Tím ovšem není vyloučena možnost existence jiného dědičného podkladu podobných epizod svalové slabosti u probandky a jejího otce.**

Zajímavou zůstává podobnost klinického obrazu a průběhu CMT u naší probandky s pacienty nesoucími kauzální mutace Glu396Lys a 322Cys-326Asn in-frame delecí, u kterých byla zaznamenána vazba rekurentních epizod nestabilní chůze (ataxie) na horečnatá onemocnění v dětství. (Fabrizi et al., 2007; Züchner et al., 2004)

Missense mutace Lys529Glu je lokalizována na konci subdomény B koncové (tail) domény proteinu NF-L (<http://expasy.org/cgi-bin/sprot-ft-details.pl?P07196@REGION@443@542>) (Obr. 25 a 26). I přes obecně významný charakter záměny – lysin (Lys; MW 146) je zásaditá aminokyselina, naproti tomu glutamová kyselina (Glu; MW 147) je kyselá se schopností vazby na kovové ionty a tvorby solných můstků – nelze očekávat významnější efekt na funkci proteinu. Tento předpoklad je v souladu s popsanou postradatelností koncové domény při procesu agregace neurofilament a s publikovaným případem nekauzální out-of-frame nonsense delecí v posledním exonu *NEFL* – viz dále. (Yamamoto et al., 2004; Lee et al., 1993; Andriago et al., 2005)

Ve stejné doméně byla dále v literatuře popsána delece Glu528del. V jedné studii byla označena za kauzální mutaci, jelikož segregovala s postižením v AD CMT1 rodině. (Jordanova et al., 2003) V pozdější studii, provedené na asijské populaci, je ukázáno, že se jedná patrně o vzácný nepatogenní polymorfismus. (Yamamoto et al., 2004) Dále byla v subdoméně B koncové domény (exon 4 *NEFL*) popsána vzácná nepatogenní out-of-frame jednobázová inserce 1576insG, která v uvedené rodině nesegregovala s fenotypem CMT2. (Andrigo et al., 2005) Vzhledem k tomu, že tato inserce vede k předčasnému zařazení stop kodonu a leží blíže k začátku exonu 4, než námi detekovaná mutace Lys529Glu, je velmi nepravděpodobné, že by mutace Lys529Glu měla kauzální efekt.

V této studii jsem identifikovala dvě nové záměny v genu *NEFL*. Obě varianty leží ve dvou subdoménách proteinu NF-L s dosud nejmenším počtem detekovaných mutací a polymorfismů. V obou rodinách se vyskytuje axonální typ neuropatie, ale pouze u jedné z detekovaných záměn se nám podařilo prokázat její segregaci s CMT2 svědčící pro kauzální vliv na vznik tohoto postižení (forma CMT2E). Pro definitivní objasnění by bylo třeba provést funkční studie a analýzu na úrovni mRNA či proteinu.

Mutace Tyr265Cys v genu *NEFL* byla nalezena u členů AD rodiny s časným začátkem CMT v dětském věku. **Vzhledem k charakteru postižení v této rodině (rodina A) lze shrnout, že testovat gen *NEFL* má význam u pacientů s jednoznačně axonální neuronální lézí se začátkem onemocnění v první (ev. druhé) dekádě, u kterých nejsou významně sníženy rychlosti vedení motorickými vlákny n. medianus. Testování je opodstatněné především u AD rodin.**

7. Testování genu pro small integral membrane protein of the lysosome/late endosome (SIMPLE)

7.1. Úvod

Na počátku roku 2002 byly v literatuře popsány dvě CMT rodiny, které vykazovaly vazbu na chromosom 16p13.1. Tato forma byla označena jako CMT1C. (Street et al., 2002) Stejná skupina autorů později určila, že onemocnění je způsobeno různými missense mutacemi v genu pro small integral membrane protein of the lysosome/late endosome (SIMPLE), dříve označovaném LITAF/SIMPLE. (Houlden a Reilly, 2006; Street et al., 2003) Gen SIMPLE má 3 exony a kóduje protein o velikosti 161 AMK, který hraje roli při degradaci proteinů. Je přítomný v cytoplasmě Schwannových buněk. (Bennett et al., 2004) Celkem bylo dosud popsáno 10 kauzálních missense mutací v tomto genu (Tab. 10).

Tab. 10. Přehled dosud publikovaných patogenních mutací a polymorfismů v genu SIMPLE. Upraveno a doplněno dle <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>

Mutace (v cDNA)	Změna v proteinu	Fenotyp	Citace
1 c.146C>T	Thr49Met	CMT2	Saifi et al., 2005
2 c.220+38T>C		- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
3 c.222T>C	Ile74Ile	- (polymorfismus)	Bennett et al., 2004
4 c.274A>G	Ile92Val	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
5 c.330C>T	Asn110Asn	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
6 c.332C>G	Ala111Gly	CMT1	Latour et al., 2006
7 c.334G>A	Gly112Ser	CMT1	Street et al., 2003 Bennett et al., 2004 Saifi et al., 2005 Latour et al., 2006
8 c.344C>A	Thr115Asn	CMT1	Street et al., 2003
9 c.344G>A + CMT1A	Gly112Ser + CMT1A	CMT1 - těžké	Meggouh et al., 2005
10 c.346T>G	Trp116Gly	CMT1	Street et al., 2003
11 c.364C>G	Leu122Val	CMT1	Saifi et al., 2005
12 c.403C>T	Pro135Ser	CMT1	Latour et al., 2006
13 c.403C>A	Pro135Thr	CMT1	Latour et al., 2006
14 c.378-29C>T		- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
15 c.477G>A	Lys159Lys	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
16 c.539C>G	3'UTR	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
17 c.585C>T	3'UTR	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
18 c.629C>T	3'UTR	- (polymorfismus)	Saifi et al., 2005
19 c.671T>C	3'UTR	CMT1	Saifi et al., 2005

Existovalo mnoho teorií o funkci SIMPLE (a LITAF) proteinu a o patogenním působení mutací v SIMPLE. Původně byly popsány dva transkripty genu kódující dva rozdílné proteiny LITAF („lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor α factor“ – LITAF) a SIMPLE (Houlden a Reilly, 2006), ale nedávná studie ukázala, že jediným transkriptem genu je protein SIMPLE a že předpoklad existence proteinu LITAF byl založen na sekvenčním omylu. (Saifi et al., 2005) Protein SIMPLE je E3 ubiquitin ligáza lokalizovaná v membráně pozdních endosomů a lysozomů v cytoplasmě Schwannových buněk. Účastní se procesu třídění a degradace proteinů označených ubiquitinem. (Bennett et al., 2004) Ačkoli je SIMPLE exprimován ve všech buňkách, je zajímavé, že projevy mutací jsou patrně izolovány pouze na periferní nervový systém. Možným vysvětlením je vysoká citlivost Schwannových buněk na overexpresi (nesprávnou dávkou) a poruchy skládání proteinů. Nejčastější formou CMT1 je CMT1A způsobená zvýšenou dávkou (a overexpresí) genu pro periferní myelinový protein 22 (PMP22). (Lupski 1999) Protein PMP22 je hlavní strukturální komponentou periferního kompaktního myelinu. Jeho skládání je obtížné a s tím souvisí fakt, že až 80% nově syntetizovaného proteinu je v buňce rychle degradováno. (Notterpek et al., 1999) Mutace v SIMPLE mohou narušovat degradaci ubiquitinem mediované degradace PMP22 a tím vést ke klinickému rozvoji demyelinizační neuropatie. (Notterpek et al., 1999; Bennet et al., 2004)

7.2. Pacienti a metody

Pacienti

Vyšetřili jsme celkem 107 pacientů ze 104 rodin s demyelinizační formou CMT1. U všech pacientů byla v předešlém testování vyloučena přítomnost nejčastější CMT1A duplikace / HNPP delece pomocí sady mikrosatelitových markerů. (Sceman et al., 2000) U některých pacientů byly navíc vyloučeny mutace v genech *Cx32*, *MPZ* a *PMP22*. K vyšetření byli vybíráni pacienti s dominantním nebo sporadickým výskytem CMT, u kterých byl klinický nálezný typický pro CMT1 a kteří měli snížené rychlosti vedení (NCV) motorickými vlákny n. medianus a/nebo n. ulnaris pod 38 m/s.

Molekulární analýza

Vzorky genomové DNA a vzorky kontrolní DNA byly vyšetřeny přímým sekvenováním celé kódující a přilehlých nekódujících oblastí genu SIMPLE (viz kapitola 3.3).

7.3. Výsledky

V souboru vyšetřených 104 rodin resp. nepříbuzných pacientů s CMT1 byly zachyceny celkem 3 různé kauzální mutace ve 4 rodinách. Dříve popsaná missense mutace **Gly112Ser** (c.334G>A), (Obr. 28) byla detekována v heterozygotním stavu ve dvou AD CMT1 rodinách celkem u 5 postižených jedinců (rodiny A a B). (Street et al., 2003; Bennett et al., 2004) Mutace nebyla zachycena v 64 kontrolních chromosomech dosud vyšetřených přímým sekvenováním.

Druhou zachycenou missense mutací je dosud nepopsaná **Pro58Leu** (c.173C>T) v heterozygotním stavu (Obr. 29) u sporadicky postižené pacientky (kazuistika C).

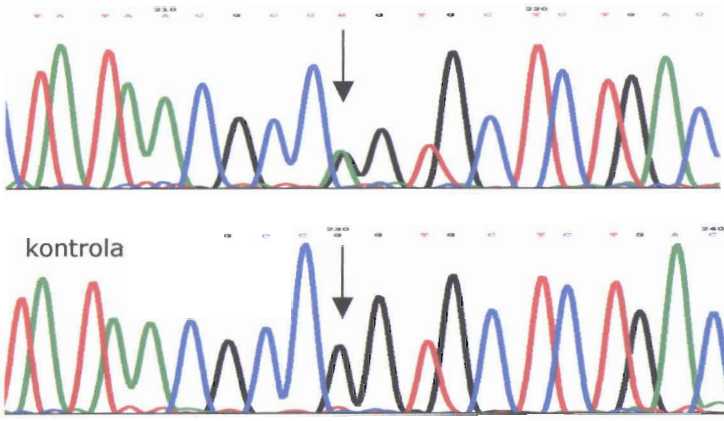
Třetí detekovanou missense mutací je také dosud nepopsaná **Leu114Gln** (c.341T>A) v heterozygotním stavu (Obr. 30) u pacienta s pravděpodobně AD přenosem postižení v rodině (rodina D). Mutace nebyla zachycena v 64 kontrolních chromosomech dosud vyšetřených přímým sekvenováním.

V testovaném souboru bylo dále identifikováno velké množství polymorfismů, z nichž některé jsou velmi časté: Ile92Val (c.274A>G) (Saifi et al., 2005) (Obr. 31); Thr78Thr (c.238G>A) (Latour et al., 2006); c.220+42C>T (IVS2+42C>T) v heterozygotním i homozygotním stavu (Latour et al., 2006) (Obr. 32); Asn110Asn (c.340C>T) (Saifi et al., 2005); c.220+65T>C (IVS2+65T>C) v heterozygotním stavu; c.378-30C>T (IVS-30C>T) v heterozygotním i homozygotním stavu.

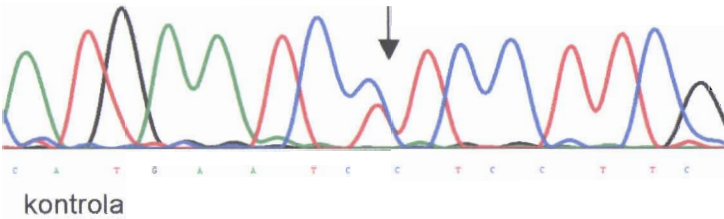
Přehled námi zachycených mutací a polymorfismů v SIMPLE je uveden v tabulce 11 a poloha mutací v proteinu SIMPLE je znázorněna na obrázku 33.

Tab. 11. Přehled zachycených mutací a polymorfismů v genu SIMPLE. Vpravo je vždy uveden počet rodin se zachycenou záměnou (n/104).

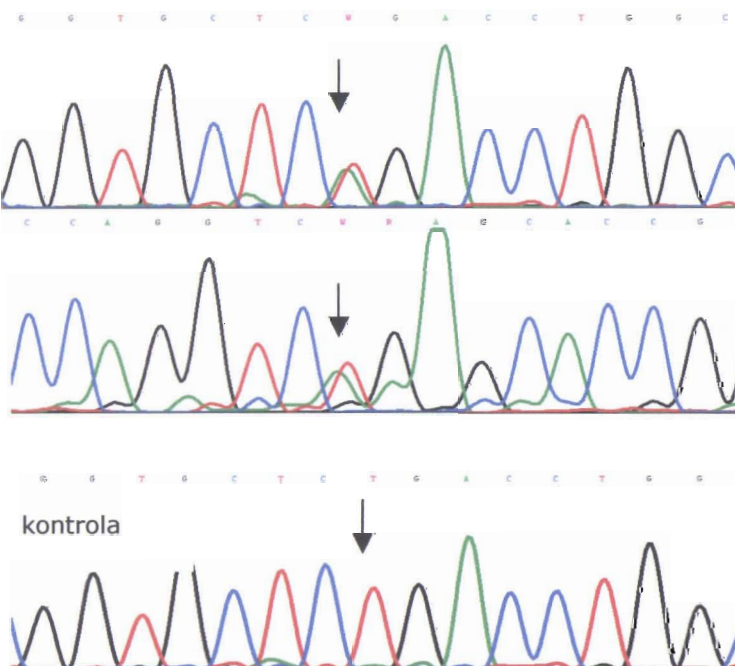
	Exon 2 / Intron 2		Exon 3		Exon 4 / Intron 3	
Polymorfismy	c.220+42C>T het.	45	Ile92Val het.	30	c.378-30C>T het.	11
	c.220+42C>T hom.	20	Ile92Val hom.	10	c.378-30C>T hom.	3
	c.220+65T>C het.	3	Thr78Thr het.	6		
			Asn110Asn het.	1		
Kauzální mutace	Pro58Leu het.	1	Gly112Ser het.	2		
			Leu114Gln het.	1		



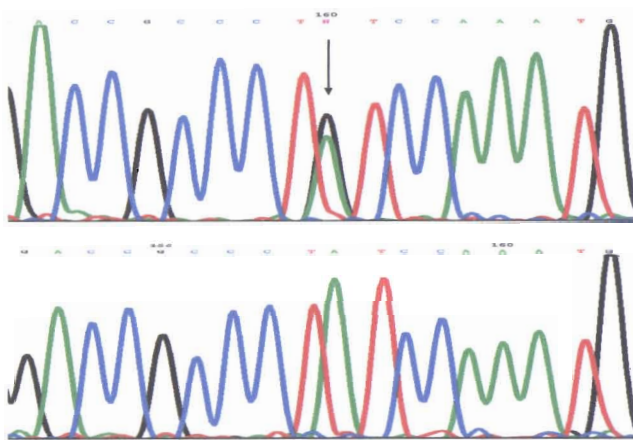
Obr. 28.
Heterozygotní mutace **Gly112Ser** na forward sekvenci v genu *SIMPLE* detekovaná v našem souboru pacientů u 3 členů AD CMT1C rodiny. Dole kontrolní sekvence.



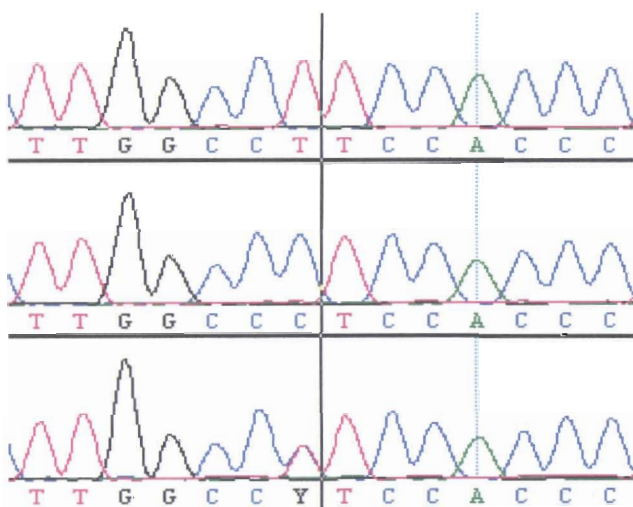
Obr. 29.
Heterozygotní mutace **Pro58Leu** v genu *SIMPLE* u sporadicky postižené pacientky. Dole kontrolní sekvence.



Obr. 30.
Heterozygotní mutace **Leu114Gln** v genu *SIMPLE* u probanda z AD CMT rodiny. Dole kontrolní F sekvence.



Obr. 31.
Četný polymorfismus c.274A>G,
Ile92Val v genu *SIMPLE*.
Nahoře forward sekvence
heterozygota pro záměnu, dole
kontrolní sekvence.



Obr. 32.
Mutace v intronu 2 genu *SIMPLE*
IVS 2+42C>T. Mutace se v našem
souboru pacientů vyskytuje jak
v heterozygotním tak v homozygotním
stavu. Ve spodním řádku je pro porovnání
zachycena i wt sekvence.

```

1 MSVPGPYQAA TGPSSAPSAP PSYEETVAVN SYYP TPPAPM PGPTTGLVTG PDGKGMNPPS
61 YYTQPAPIPN NNPITVQTVY VQHPITFLDR PIQMCCPSCN KMIVSQLSYN AGALTWLSCG
121 SLCLLGCIAG CCFIPFCVDA LQVDVHYCPN CRALLGTYKR L

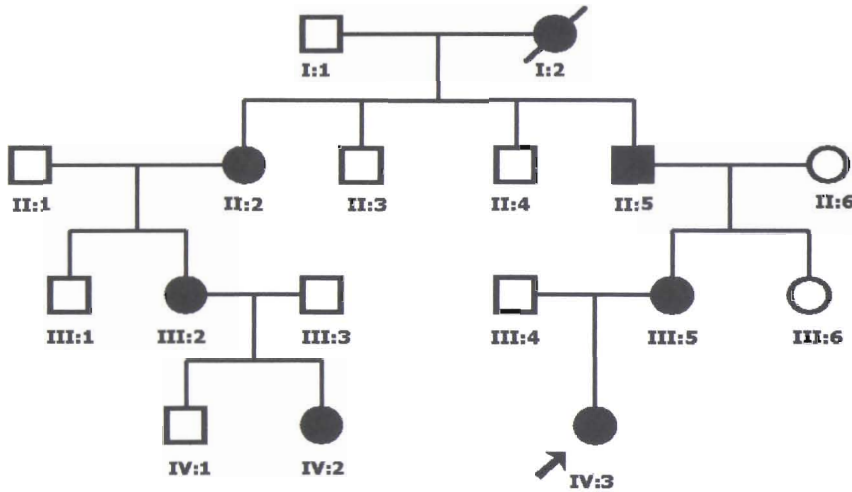
```

Obr. 33. Aminokyselinové složení proteinu *SIMPLE*. Dvojitým podtržením jsou zvýrazněny kodony 58, 112 a 114, ve kterých jsme detekovali tři kauzální mutace.

<http://www.expasy.org/cgi-bin/sprot-ft-details.pl?Q99732@CHAIN@1@161>

A. AD rodina nesoucí mutaci Gly112Ser v genu *SIMPLE*

Jedná se o rodinu s molekulárně geneticky potvrzeným postižením CMT1 ve třech po sobě jdoucích generacích (viz rodokmen na obr. 34). Probandce je v současné době 18 let.



Obr. 34.

Rodokmen AD CMT1C rodiny nesoucí mutaci Gly112Ser v genu *SIMPLE*. Podobné postižení měla údajně matka maternálního dědečka probandky; dále je podobně postižena sestra maternálního dědečka, dále její dcera (r. 1970) a i její dcera (r. 1996). Tito postižení členové rodiny nebyli neurologicky ani geneticky vyšetřeni. Otec probandky je zdravý.

MATKA PROBANDKY (III/5; 41 let, neurologicky vyšetřena ve 37 letech) je subjektivně bez obtíží, slabost nepociťuje, mívá pouze bolesti lýtek při změně počasí. Má hypotrofie drobných svalů rukou, naznačenou bilaterální kontrakturu 5. prstu, na dolních končetinách hypotrofie lýtek a drobných svalů nohy, deformitu nohou typu pes cavus a zkrácení Achillových šlach (Obr. 35). Pacientka má areflexii C5-C8 a L2/4 a L5/S2 a mírné oslabení dorsální flexe planty i palce (4/5 bilat.). Chůzi po patách nesvede, chůzi po špičkách svede ale zvyrazňuje se deformita pes cavus. Taktilní cití je bez výpadků.



Obr. 35.

Postižená matka probandky nesoucí mutaci **Gly112Ser** v genu *SIMPLE*. Jsou patrné atrofie dolních končetin, deformita nohou pes cavus zvyrazněná při stojí na špičce a atrofie drobných svalů rukou. (Foto P. Seeman)

EMG nález odpovídá difúzní neurogenní lézi senzitivních a motorických vláken na HK a DK s primárním postižením myelinu (Tab. 12).

Dalším anamnesticky zjištěným postiženým a molekulárně geneticky vyšetřeným členem rodiny je maternální dědeček probandky (84 let). Má lehké atrofie drobných svalů nohy, deformitu pes cavus,

snížení svalové síly na dolních končetinách, areflexii L2/4 a L5/S2 a ponožkovitou hypestesii. Chůzi po patách svede nedokonale. EMG vyšetření nebylo provedeno.

PROBANDKA je subjektivně téměř bez obtíží. CMT u ní bylo diagnostikováno náhodně při hospitalizaci pro bolesti zad. První příznaky onemocnění CMT se u ní objevily asi v 5 letech zhoršenou lokomocí – hůře běhala, skákala a nemohla se postavit na paty. Obtíže se výrazněji projeví na základní škole, kdy nezvládala cviky tak dobře, jako ostatní. Dvakrát prodělala distorzi levého kotníku. Od 14 let pozoruje horší jemnou hybnost na obou rukou. Podezření na dědičnou neuropatii bylo vysloveno ve 14 letech a bylo potvrzeno EMG vyšetřením a obdobným neurologickým nálezem u matky probandky a maternálního dědečka probandky.

Při objektivním vyšetření v 15 letech měla pacientka na horních končetinách lehkou hypotrofii drobných svalů ruky, naznačené kontraktury na 5. prstu bilaterálně (jako u matky), mírně oslabenou svalovou sílu na celých horních končetinách (4-5/5) a hyporeflexii C7-C8. Na dolních končetinách měla hypotrofii drobných svalů nohy, lehké deformity typu pes cavus (Obr. 36), mírně oslabenou svalovou sílu distálně i proximálně na DK (4-5/5) a areflexii L5/4 a L5/S2. Nesvedla chůzi po patách. Taktilní a vibrační cití bylo neporušeno.



Obr. 36.
Naznačená deformita nohy pes cavus u pacientky nesoucí heterozygotní mutaci Gly112Ser ve genu SIMPLE.
(Foto P. Seeman)

EMG vyšetření bylo u probandky provedeno v 15 letech se závěrem **primárně demyelinizační polyneuropatie sensitivních a motorických nervů s převahou na dolních končetinách** (Tab. 12).

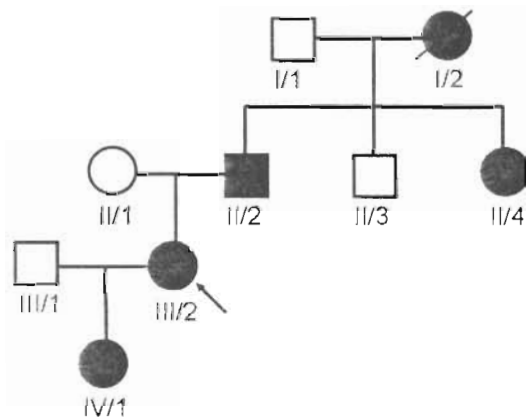
Tab. 12. Výsledky kondukčních studií motorických a sensitivních vláken u probandky (III/1) a její matky (II/2) nesoucí mutaci Gly112Ser v genu *SIMPLE* odpovídají primární demyelinizační lézi.

			Norma	III/1	II/2
Motorická vlákna	n. Medianus	MNCV (m/s)	≥ 51	30	26
		Amplituda (mV)	≥ 4.2	6,2	5,7
	n. Ulnaris	MNCV (m/s)	≥ 50	24	29
		Amplituda (mV)	≥ 5.5	3,8	5,2
	n. Peroneus (m. tibialis ant.)	MNCV (m/s)	≥ 39	17	22
		Amplituda (mV)	NA	1,5	0,5
n. Tibialis	MNCV (m/s)	≥ 40	17	19	
	Amplituda (mV)	≥ 2.5	1,1	0,7	
Sensitivní vlákna	n. Medianus	SNCV (m/s)	≥ 48	35	24
		Amplituda (uV)	≥ 10	8	11
	n. Ulnaris	SNCV (m/s)	≥ 48	28	28
		Amplituda (uV)	≥ 10	5	5
	n. Suralis	SNCV (m/s)	≥ 38	ND	ND
		Amplituda (uV)	≥ 4.4	ND	ND

MNCV, motor nerve conduction velocity – rychlost vedení motorickými vlákny; **SNCV**, sensory nerve conduction velocity – rychlost vedení sensitivními vlákny; **NA**, not available – hodnota není k dispozici. **ND**, not detected - neměřitelné. **Patologické hodnoty jsou tučně.**

B. AD rodina nesoucí mutaci Gly112Ser v genu SIMPLE

Také druhá rodina se zachycenou mutací Gly112Ser v *SIMPLE* vykazuje známky AD přenosu postižení (Obr. 37).



Obr. 37.
Rodokmen probandky nesoucí mutaci Gly112Ser v genu *SIMPLE*.

PROBANDCE (III/2) je v současné době 42 let. Onemocnění se u ní začalo projevovat ve 2. dekádě života. Ve věku 40 let měla deformity nohou pes cavus a distální svalovou slabost na dolních končetinách. Chůze po patách nebyla schopna a horní končetiny měla nepostížené. EMG vyšetření provedené ve 32 letech ukázalo **obraz těžké demyelinizační léze** (MNCV n. medianus 19,2 m/s; SNCV n. medianus 24 m/s; vedení na n. peroneus a n. suralis bylo nevybavné).

DCEŘI PROBANDKY (IV/1) je v současné době 18 let. První příznaky postižení periferní neuropatií se u ní začaly projevovat mezi 5. a 10. rokem věku. Pacientka má deformitu nohou pes cavus. Při vyšetření v 17 letech byla schopná chůze po patách a neměla známky distální svalové slabosti a atrofii na dolních ani na horních končetinách. EMG vyšetření provedené v 17 letech ukázalo obraz hraniční demyelinizační léze (MNCV n. medianus 40,4 m/s; SNCV n. medianus 36,3 m/s; MNCV na n. peroneus 28,3 m/s; SNCV n. suralis 20,3 m/s).

C. Sporadicky postižená pacientka nesoucí mutaci Pro58Leu v genu SIMPLE

Pacientce je v současné době 33 let. Je narozena z rizikového těhotenství ve 34. gestačním týdnu. Má jednoho mladšího zdravého bratra a zdravou dceru. Dle starších anamnestických údajů byli oba rodiče údajně po neurologické stránce zdraví a ani u nikoho dalšího v rodině se nevyskytuje podobné postižení jako u pacientky. Po narození byla zjištěna kombinace vývojových vad typických pro syndrom Beckwith-Wiedemann (BWS): exomfalos, makroglosie a gigantismus (dříve také EMG syndrom) (Obr. 38). Delece na krátkém raménku chromosomu 11, která je nejčastější příčinou syndromu BWS, ale nebyla u pacientky cytogenetickým vyšetřením technikou HRT prokázána. Psychomotorický vývoj byl u pacientky normální.



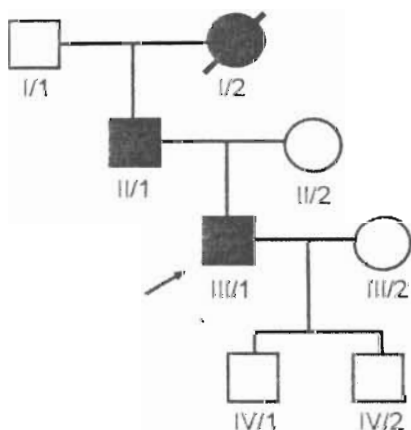
Obr. 38.

Pacientka s BWS syndromem. označovaným také jako EMG – exomphalos, makroglosie, gigantismus. Na obrázku je dobře patrný exomphalos. (Foto E. Seemanová)

Probandka chodila od 1 roku a od začátku měla sklon k chůzi po špičkách. V 15 letech věku si rodiče všimli deformit nohou typu pes cavus, zhoršení chůze a přepadávání špiček (více vlevo). Při objektivním neurologickém vyšetření v 15 letech na jiném pracovišti měla pacientka nystagmoidní záškuby očí v krajních polohách, na horních končetinách snížený svalový tonus, hyporeflexii a naznačenou hypotrofii interoseálních svalů. Na dolních končetinách měla oboustranně deformitu pes cavus, zkrácené Achillovy šlachy, nižší svalový tonus, hyporeflexii L2-L4, areflexii L5-S2. Chůze byla peroneální, na patách nesvedla. EMG vyšetření v 15 letech zaznamenalo sníženou rychlost vedení motorickými vlákny n. ulnaris (39m/s) a nevýbavné vedení motorickými vlákny n. peroneus.

D. Pacient nesoucí mutaci Leu114Gln v genu SIMPLE z AD CMT1 rodiny

Probandovi je v současné době 42 let. V jeho rodině je údaj o postižení paternální babičky, která ochrnula ve věku 40 let. Otec probanda má parestezie končetin a revmatismus. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o AD přenos postižení v rodině (rodokmen na Obr. 39). Sourozence proband nemá, má dva syny, u kterých se zatím nelze spolehlivě vyjádřit o přítomnosti postižení vzhledem k nízkému věku. Proband byl narozen předčasně v 7. měsíci s PH 1,85 kg. V osobní anamnéze má dětskou mozkovou obrnu (DMO) a pravostranný nystagmus. Prodělal ortopedickou prolongaci Achillovy šlachy a korekci deformity na pravé noze ve věku 12 let. Druhou ortopedickou operaci prodělal v 17 letech se zpevněním pravého zápěstí vnesením kostního štěpu z kyčle a prolongací šlach. Při třetí operaci ve 25 letech byla prodloužena šlacha m. extensor hallucis longus na pravé horní končetině. Pacient má bilaterální myopii (5,5D).



Obr. 39.
Rodina probanda nesoucího mutaci **Leu114Gln** v genu **SIMPLE**.

Ve 33 letech se u pacienta začalo objevovat, v souvislosti se změnou zaměstnání z kancelářské práce do výrobního provozu, mravenčení a mrtvění v dolních končetinách, které začínalo v prstech a šířilo se ke stehnům. Obtíže se stupňovaly s námahou. Budil se ze spaní pro bolesti, mravenčení a necitlivost v lýtkách. Na levé horní končetině pozoruje brnění a sníženou citlivost asi od 36 let věku.

Při objektivním vyšetření v 38 letech měl nepravidelné nystagmoidní záškuby očí všemi směry a hypestezii levé tváře. Na horních končetinách měl bilaterálně živé reflexy C5-C8 (více vpravo), pravou horní končetinu (PHK) s kladívkovými prsty, spastickou a retrahovanou bez možnosti ohybu v zápěstí a lokti a s omezením pohyblivosti v ramenním kloubu, LHK měl bez paréz. Na PHK měl zachované cití, na LHK měl hypestezii. Na PHK měl dystaxii, na LHK přesnou taxi. Na dolních končetinách měl oboustrannou deformitu pes cavus, reflexy L2-S1 symetrické a živé, bilaterálně byl pozitivní

Babinského příznak, taxe byla přesná, na PDK měl taktilní anestezii, na LDK hypestezií. Chůze byla samostatná, ale paraparetická, spastická a o široké bázi.

Při EMG vyšetření ve věku 38 let byl na HK i DK obraz těžké demyelinizační sensitivní a motorické polyneuropatie s výrazně sníženými rychlostmi vedení (Tab. 13). U studie sensitivních vláken byla zcela nevýbavná odpověď na n. suralis (Tab. 13).

Tab. 13. Výsledky kondukčních studií motorických a sensitivních vláken u pacienta nesoucího mutaci Leu114Gln v *SIMPLE* odpovídají primární demyelinizační lézi se sekundárním axonálním postižením.

			Norma	Pacient
Motorická vlákna	n. Medianus	MNCV (m/s)	≥ 51	26,3
		Amplituda (mV)	≥ 4.2	0,4
	n. Ulnaris	MNCV (m/s)	≥ 50	26,7
		Amplituda (mV)	≥ 5.5	4,9
	n. Peroneus (m. tibialis ant.)	MNCV (m/s)	≥ 39	19,7
		Amplituda (mV)	NA	0,5
n. Tibialis	MNCV (m/s)	≥ 40	13,2	
	Amplituda (mV)	≥ 2.5	0,8	
Sensitivní vlákna	n. Medianus	SNCV (m/s)	≥ 48	28,6
		Amplituda (uV)	≥ 10	0,9
	n. Ulnaris	SNCV (m/s)	≥ 48	30,8
		Amplituda (uV)	≥ 10	2,0
	n. Suralis	SNCV (m/s)	≥ 38	N.D.
		Amplituda (uV)	≥ 4.4	N.D.

MNCV, motor nerve conduction velocity – rychlost vedení motorickými vlákny; **SNCV**, sensory nerve conduction velocity – rychlost vedení sensitivními vlákny; **NA**, not available – hodnota není k dispozici. **ND**, not detected - neměřitelné. **Patologické hodnoty jsou tučně.**

Zrakové evokované potenciály (VEP) měly oboustranně prodloužené latence vlny P100, což odpovídá lézi zrakové dráhy. Výsledky vyšetření sluchových evokovaných potenciálů (BAEP) byly v mezích normy. Motorické evokované potenciály (MEP) měly extrémně prodloužené latence v periferní části motorické dráhy bilaterálně. Sensitivní evokované potenciály (SEP) n. medianus svědčily pro oboustrannou lézi sensitivní dráhy v periferním úseku, SEP n. tibialis byly bez výbavné odpovědi.

Klinický obraz u pacienta odpovídá kombinaci postižení v rámci DMO (spastická triparéza DK a PHK) a CMT demyelinizačního typu s klinicky dominujícími algoparestéziemi dolních končetin a levé horní končetiny.

7.4. Diskuse

V této studii jsme identifikovali 3 různé kauzální mutace v genu *SIMPLE* u 4 rodin ze souboru 104 českých nepříbuzných CMT1 pacientů (rodin) s vyloučenou formou CMT1A. Frekvence mutací je tedy přibližně 3,8 % (4 pozitivní nálezy mezi 104 testovanými rodinami). V celkovém souboru 360 rodin (nepříbuzných jedinců) s dominantní demyelinizační formou CMT1 je zastoupení mutací v *SIMPLE* 1,1% (4/360). Frekvence mutací v *SIMPLE* udávané v jiných studiích jsou podobné: 3,75% (3/80) mezi CMT1 rodinami s vyloučením CMT1A a mutací v několika dalších dominantních genech (Bennett et al., 2004); v jiné studii je udávána frekvence 0,6% (6/968) mezi všemi AD CMT1 nepříbuznými rodinami. (Latour et al., 2006) Podle spektra zachycených rodin lze usuzovat, že záchyt mutace v *SIMPLE* je nejpravděpodobnější u AD rodin (3 ze 4 rodin jsou AD), ale testování je opodstatněné i u sporadických CMT1 případů.

Fenotyp CMT1C s AD dědičností a věkem začátku obtíží v dětství je klinicky i elektrofyziologicky velmi podobný fenotypu CMT1A. Prvními projevy bývá deformita pes cavus nebo porucha chůze a dále obvyklé CMT příznaky jako distální svalová slabost, svalové atrofie, snížení až vymizení reflexů a poruchy senzitivity. EMG nálezy jsou ve většině dříve popsaných CMT1C rodin typické pro demyelinizační typ CMT1, pouze jedna rodina měla rychlosti vedení odpovídající formě CMT2. (Saifi et al., 2005) V biopsiích nervů pacientů s převažující demyelinizační formou CMT1C byly nalezeny „onion bulb“ formace typické pro demyelinizaci. (Bennett et al., 2004; Saifi et al., 2005) U pacientů z rodiny s axonální formou CMT1C byla popsána axonální ztráta. (Saifi et al., 2005)

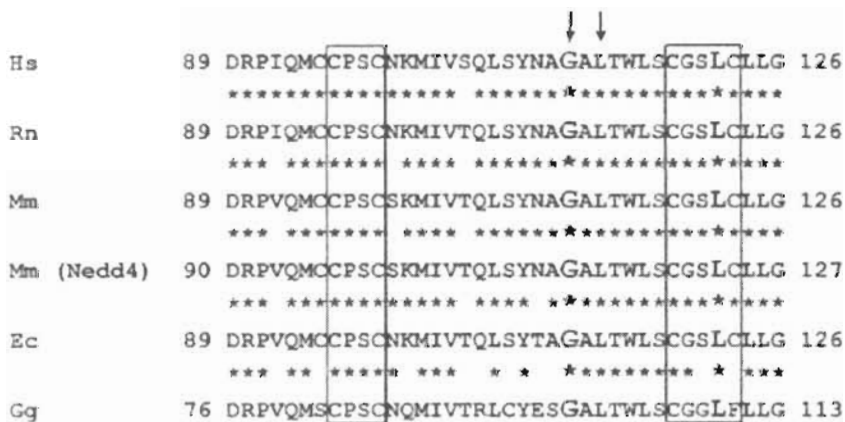
Charakterem příznaků se námi detekovaná rodina A s mutací **Gly112Ser** podobá dalším pěti popsaným evropským rodinám se stejnou mutací, i když se zdá, že subjektivní i objektivní příznaky jsou v naší rodině mírnější. (Bennett et al., 2004; Saifi et al., 2005; Street et al., 2003; Latour et al., 2006). Klinický obraz v publikovaných rodinách odpovídá klasickému obrazu CMT1 s distální svalovou slabostí a atrofiemi, hyporeflexií a poruchami cití. MNCV na n. medianus jsou u všech G112S pacientů velmi podobné a pohybují se v rozmezí 20 – 25 m/s. Věk nástupu onemocnění se pohybuje v rozmezí 3 – 34 let.

Charakter postižení v rodině B s mutací **Gly112Ser** je méně důkladně zdokumentován, ale podle dostupných údajů jde o typický obraz CMT1 podobný ostatním již zmíněným kazuistikám. (Bennett et al., 2004; Saifi et al., 2005; Street et al., 2003)

Zajímavostí je, že mutace Gly112Ser byla v literatuře dále popsána u pacienta z AD rodiny se souběžným výskytem s duplikovanou formou CMT1A. (Meggouh et al., 2005) Proband získal

mutaci Gly112Ser od otce a duplikaci *PMP22* od matky. Oba rodiče měli klinické postižení typické pro CMT1. U syna se onemocnění projevilo již ve věku 2 let, měl těžké deformity nohou, těžké svalové atrofie, slabost a areflexii. Závažný klinický průběh je připisován souběhu CMT1A a mutace v *SIMPLE*. U našich pacientů s mutacemi v *SIMPLE* však byla CMT1A duplikace již předem vyloučena.

Je pravděpodobné, že opakovaný záchyt mutace Gly112Ser je dán přítomností tzv. hot spot pro vznik mutací v genu *SIMPLE* v místě CpG dinukleotidu. (Saifi et al., 2005) Kodon 112 leží v oblasti genu *SIMPLE* o velikosti 38 aminokyselin (AMK), jejíž složení je vysoce konzervované napříč živočišnými druhy. Tato oblast je součástí ještě rozsáhlejší domény asi o 70 AMK, která je sice konzervovaná v menší míře, zato ale v rámci širší skupiny druhů. (Saifi et al., 2005) Míra konzervovanosti AMK v pozici 112 naznačuje významný funkční dopad mutace Gly112Ser na protein SIMPLE (Obr. 40).

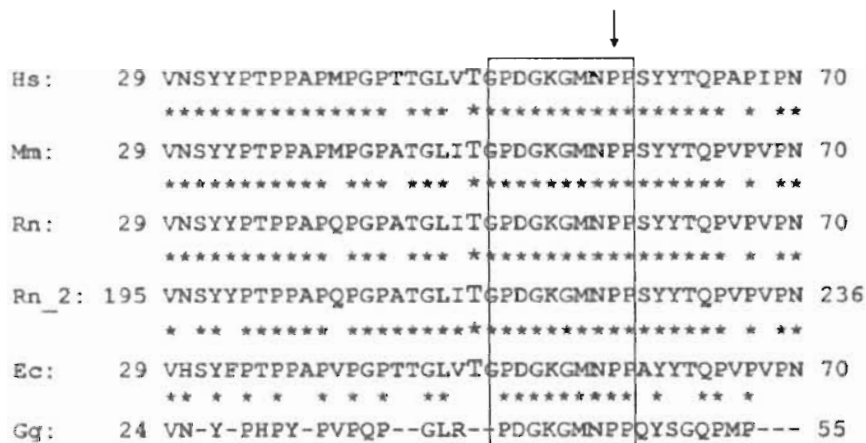


Obr. 40. Konzervovaná oblast v proteinu SIMPLE. Šipkami jsou znázorněny kodony 112 a 114, ve kterých jsme detekovali mutace Gly112Ser a Leu114Gln. (Hs, Homo sapiens; Rn, Rattus norvegicus; Mm, Mus musculus; Ec, Equus caballus; Gg, Gallus gallus)

Druhá detekovaná mutace **Pro58Leu** (kazuistika C) nebyla dosud jinými autory popsána. Jak je patrné z obrázku 41, leží v další konzervované oblasti proteinu SIMPLE. Vzhledem k charakteru záměny - prolin (Pro; MW 115) je lehce kyselá aminokyselina s výjimečnou heterocyklickou strukturou obsahující sekundární amino skupinu a leucin (Leu; MW 131) naproti tomu aminokyselina alifatická a hydrofobní - lze očekávat významný funkční dopad.

Dostupné údaje z dokumentace pacientky svědčí pro typický průběh onemocnění CMT1. Pacientku bohužel zatím nebylo možné od nálezů mutace nově vyšetřit z důvodu jejího nesouhlasu a ani rodiče nebyli vyšetřeni na DNA úrovni k potvrzení segregace mutace s onemocněním (otec již

nežije). Předpokládáme ovšem, že se jedná o dominantní kauzální mutaci s de-novo vznikem u probandky.



Obr. 41. Další konzervovaná oblast v proteinu SIMPLE. Šipkou je znázorněn kodon 58, ve kterém jsme identifikovali mutaci Pro58Leu. (Hs, Homo sapiens; Rn, Rattus norvegicus; Mm, Mus musculus; Ec, Equus caballus; Gg, Gallus gallus).

Třetí nová detekovaná mutace **Leu114Gln** (rodina D) leží ve stejné konzervované oblasti jako mutace Gly112Ser (Obr. 40). V kodonu 114 SIMPLE zatím nebyla v literatuře popsána žádná další mutace. V sousedních dvou bázích v téže oblasti byly dříve popsány záměny Thr115Asn a Trp116Gly u AD rodin s typickým CMT1 postižením (Street et al., 2003; Bennett et al., 2004) a díky nápadnému soustředění několika missense mutací do malé oblasti pouze 6 aminokyselin v SIMPLE (kodony 111, 112, 115 a 116) byla vyslovena domněnka, že tato doména může být kritická pro periferní myelinizaci. (Bennett et al., 2004; Latour et al., 2006) Nálezem mutace Leu114Gln dále podporujeme tuto hypotézu a doplňujeme tak spektrum mutací v této významné oblasti genu SIMPLE. I podle charakteru záměny alifatické a hydrofobní aminokyseliny leucin (Leu; MW131) za polární glutamin (Gln; MW 146), vytvářející vodíkové můstky, lze u této mutace očekávat funkční dopad a kauzální vliv na vznik neuropatie.

V době sepisování práce je proband jediným klinicky a molekulárně geneticky vyšetřeným členem rodiny. Zhodnocení míry jeho klinického postižení v důsledku mutace v SIMPLE a i věku prvních klinických projevů neuropatie je do značné míry znesnadněno přítomností základního onemocnění DMO, jehož příznaky (deformita nohou a rukou, zkrácení Achillových šlach) se s CMT částečně překrývají. EMG vyšetření zůstává u tohoto pacienta jedinou objektivní metodou posouzení tíže CMT. Rychlost vedení motorickými vlákny n. medianus (26,3m/s) byla velmi podobná rychlostem zaznamenaným u pacientek z rodiny A s mutací Gly112Ser.

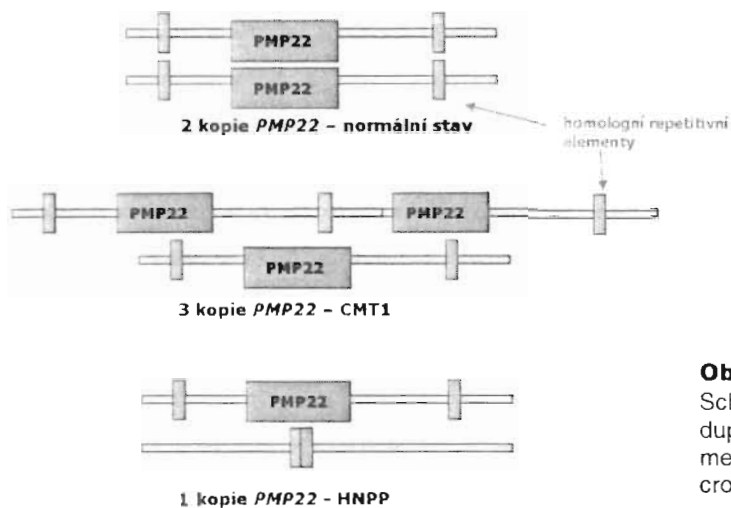
Z výsledků této práce vyplývá, že testování genu *SIMPLE* je smysluplné jak u rodin s AD tak u pacientů se sporadických postižením s typickým klinickým obrazem CMT1 a s rychlostmi vedení na n. medianus spíše v horní části spektra pro CMT1 (nejnižší detekovaná MNCV n. medianus u nosičů *SIMPLE* mutace byla 19,2 m/s a nejvyšší 34 m/s).

8. Testování CMT1A a HNPP pomocí real-time PCR

8.1. Úvod

V roce 1989 byla u rozsáhlého souboru CMT1 rodin prokázána vazba na chromosom 17p11.2 a tato forma byla pojmenována CMT1A. (Vance *et al.*, 1991; Houlden a Reilly, 2006) O dva roky později byla ve stejném chromosomálním pruhu, v oblasti 17p11.2-12, nalezena velká segmentální intrachromozomální duplikace o rozsahu 1,5 Mb (Lupski *et al.*, 1991; Houlden a Reilly, 2006) a následující rok byl v této duplikované oblasti zmapován gen pro periferní myelin protein 22 (*PMP22*). Domněnku, že právě on je zodpovědný za CMT1A, se podařilo potvrdit nálezem bodových mutací v *PMP22*, které měly podobný fenotypový projev, jako segmentální duplikace na 17p11.2. Dále byl objeven i zvířecí model CMT, tzv. Trembler-J mouse, s mutací v *PMP22* genu. (Suter *et al.*, 1992) Tyto objevy jsou považovány za historicky nejdůležitější přínos k porozumění molekulární genetiky CMT, jelikož tato tzv. duplikovaná forma představuje 50 % všech CMT případů a asi 70% všech CMT1 případů a je tedy nejčastější formou dědičných neuropatií vůbec. (Nelis *et al.*, 1996; Houlden a Reilly, 2006) Klinicky se CMT1A projevuje příznaky typickými pro dědičné neuropatie (viz kap. 1).

Delece *PMP22* ve stejné 1,5 Mb oblasti nezpůsobuje difusní demyelinizaci jako u CMT1A, ale segmentální asymetrickou dysmyelinizační / demyelinizační polyneuropatii - tzv. hereditární neuropatii se sklonem k tlakovým parézám (HNPP), neboli tomakulózní neuropatii, která je druhým nejčastějším typem dědičných neuropatií (Obr. 42). Jedná se o postižení s epizodami přechodných nervových motorických a sensitivních paréz a díky mírnější tíži postižení ve srovnání s CMT1A zůstává pravděpodobně mnoho pacientů s HNPP nezachyceno. (Shy *et al.*, 2002)

**Obr. 42.**

Schema vzniku *PMP22* duplikace a delecce mechanismem nerovnoměrného crossing-over.

Protein PMP22 je hlavní strukturální komponentou periferního kompaktního myelinu. (Suter a Scherer, 2003) Zvýšení genové dávky *PMP22* (nadbytečná kopie genu) u CMT1A vede přibližně k dvojnásobné expresi PMP22 v periferním myelinu ve srovnání s kontrolními vzorky nervů a ta pravděpodobně k zmenšení strukturální stability myelinu. (Lupski, 1997; Vallat et al., 1996) Nové teorie předpokládají, že nově syntetizovaný PMP22 má i za normálních podmínek velmi krátký poločas a většina je rychle degradována. Detailní molekulární mechanismus vzniku CMT1A však není dosud objasněn. (Shy et al., 2002) CMT1A může být způsobeno také poměrně vzácnými bodovými mutacemi *PMP22*. Molekulární mechanismy působení bodových mutací jsou odlišné od CMT1A a zahrnují poruchy transportu, prostorového uspořádání a agregace proteinu PMP22. U formy HNPP dochází naopak ke snížení exprese a snížení relativního obsahu PMP22 v periferním myelinu přibližně na 60% ve srovnání s kontrolními vzorky nervů. (Vallat et al., 1996; Suter a Scherer, 2003)

Rutinní vyšetřování CMT1A a HNPP v České republice využívá fragmentovou analýzu sady mikrosatelitových markerů lokalizovaných v okolí genu *PMP22* na chromozomu 17 (tzv. mikrosatelitová analýza). (Seeman et al., 2000) Tato metoda je ale při narůstajícím množství vzorků a použitím 17 markerů relativně pracná a časově i finančně náročná.

Pomocí této metody bylo v době sepisování práce v DNA laboratoři kliniky dětské neurologie celkem vyšetřeno již 1800 osob, přičemž bylo detekováno 440 pacientů (z 243 rodin) s CMT1A duplikací a 243 pacientů (ze 133 rodin) HNPP delecí. CMT1A je potvrzeno nálezem 3 alel alespoň u jednoho z použitých mikrosatelitových markerů. HNPP je prokázána nálezem pouze jedné alely ve všech použitých markerech, ale jen v kombinaci s vyšetřením dalších

přímých příbuzných pacienta nebo obdobně postižených osob v rodině, kde lze prokázat chybění alelického přenosu od postiženého rodiče na postiženého potomka.

U malého procenta CMT1A pacientů (3-4%) však nacházíme pouze zvýšenou intenzitu jedné alely některého z vyšetřených markerů bez nálezu 3 různých alel a dále je řada HNPP pacientů, kteří byli vyšetřeni jako jediné osoby v rodině. Diagnóza je u těchto pacientů s podezřením na CMT1A/HNPP stanovena s vysokou pravděpodobností, nemůže však být úplně potvrzena.

Kvantitativní real-time PCR nabízí jednak možnost další nezávislé metody k potvrzení sporných vzorků, ale hlavně možnost rychlé a cílené detekce dávky *PMP22*. Proto jsme se rozhodli zavést tuto metodu pro rutinní diagnostické použití a v neposlední řadě i k zpřesnění záchytu CMT1A a HNPP a k možnosti kontroly starších závěrů analýzy mikrosatelitových markerů alternativní metodou. Další významnou motivací k zavedení této metody bylo získání nástroje k průkazu duplikací a delecí *PMP22* genu u pacientů s podezřením na CMT1A duplikaci atypického rozsahu, které bylo vysloveno z výsledků mikrosatelitové analýzy, a umožnit tím stanovení frekvence těchto atypických menších duplikací. (Thiel et al., 2003a)

8.2. Cíle studie

1. Vypracování spolehlivého real-time PCR protokolu k detekci duplikací a delecí genu *PMP22* za účelem:
 - Přešetření souboru pacientů se zřejmou klinickou diagnózou CMT, ale dosud bez molekulárně geneticky potvrzené diagnózy (tzv. „nepotvrzená skupina“). Tito všichni pacienti byli vyšetřeni pomocí mikrosatelitové analýzy, která nepotvrdila ani CMT1A duplikaci ani HNPP delecí.
 - Dovyšetření pacientů s vysoce pravděpodobnou (nikoli jistou) přítomností HNPP delecce a CMT1A duplikace.
2. Zjištění relativního výskytu atypických CMT1A duplikací/HNPP delecí v české populaci ve srovnání s typickými duplikacemi a delecemi.
3. Porovnání úspěšnosti obou diagnostických metod (mikrosatelitová analýza vs. real-time PCR) v záchytu atypických HNPP delecí a CMT1A duplikací v oblasti 17p11.2-12; stanovení podílu vzorků, které mohou zůstat při mikrosatelitové analýze nezachyceny či nesprávně diagnostikovány.

4. Zavedení kvantitativní real-time PCR do rutinního diagnostického procesu pro CMT1A a HNPP.

8.3. Pacienti a metody

Pacienti

Kvantitativní multiplexní real-time PCR metoda byla zavedena a ověřena pomocí retrospektivního testování 158 referenčních DNA vzorků pacientů, kteří byli v minulosti vyšetřeni mikrosatelitovou analýzou s využitím 8-17 markerů: HNPP pacienti – 1 *PMP22* kopie (n=54), zdravé kontroly – 2 *PMP22* kopie (n=44), CMT1A pacienti – 3 *PMP22* kopie (n=60). Referenční vzorky pocházely jak ze skupiny s nepochybně stanovenou diagnózou (HNPP s jednou alelou ve všech použitých markerech u více příbuzných v rodině a alespoň ve dvou po sobě jdoucích generacích; CMT1A pacienti se 3 alelami alespoň ve 2 markerech u více příbuzných v rodině a alespoň ve dvou po sobě jdoucích generacích a zdravé nepříbuzné osoby s normálním neurologickým a EMG nálezem), tak ze skupiny s pouze vysoce pravděpodobnou diagnózou (viz výše).

Dále bylo testováno 178 pacientů vybraných z „nepotvrzené“ skupiny, která zahrnuje pacienty s klinickými příznaky CMT, ale dosud bez molekulárně geneticky potvrzené diagnózy. Všechny vzorky byly dříve vyšetřeny pomocí analýzy mikrosatelitových markerů a touto metodou nebyla CMT1A duplikace ani HNPP delece prokázána. Většina těchto vzorků byla testována dále na přítomnost mutací v některém z CMT asociovaných genů bez nálezu molekulárně genetické příčiny onemocnění.

Následně bylo pomocí real-time PCR testováno 236 nově zachycených CMT pacientů s klinickým podezřením na CMT1A nebo HNPP bez molekulárně geneticky potvrzené diagnózy souběžně s diagnosticky prováděným vyšetřením pomocí mikrosatelitové analýzy.

Genomová DNA byla izolována z periferní krve pomocí QIAamp DNA Blood Kit. (Qiagen GmbH)

Materiál

Specifické TaqMan primery a sondy byly navrženy pomocí Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems, USA) a jejich sekvence byly ověřeny pomocí nucleotide-nucleotide blast. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Primery a sondy byly objednány od Applied Biosystems (ABI). Gen pro lidský sérový albumin (*HSA*) byl použit jako endogenní kontrola. (Thiel et al.,

2003b) TaqMan sonda pro *HSA* exon 12 obsahovala excitační fluorofor 5'-VIC (reporter) a 3'-Tamra jako zhášedlo (quencher), sonda pro *PMP22* exon 3 obsahovala excitační fluorofor 5'-FAM a 3'-Tamra jako zhášedlo (quencher). Sekvence primerů a sond použitých ve studii jsou shrnuty v tabulce 14.

Tab. 14. Primery a TaqMan sondy pro exon 12 genu pro lidský sérový albumin (*HSA*) a exon 3 *PMP22* genu použité ve studii.

	forward primer (5'>3') reverse primer (5'>3')	TaqMan sonda
<i>HSA</i> exon 12	TGTTGCATGAGAAAACGCCA GTCGCCTGTTACCAAGGAT	5'-VIC-AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAG-TAMRA-3'
<i>PMP22</i> exon 3	TCTGTCCAGGCCACCATGA GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA	5'-6-FAM-CCTGTGCGATCATCTTCAGCATTCTGTCTCTG-TAMRA-3'

Real-time PCR reakce

Vzorky byly testovány jako triplikáty v multiplexní PCR reakci (tj. 2 páry primerů byly použity v jedné zkumavce) na přístroji ABI Prism 7000 (ABI).

Výsledný reakční objem byl 20 μ l v každé jamce. Složení PCR reakční směsi bylo: 1X qPCR Mastermix (ABI), 750 nM každý *HSA* primer a 750 nM každý *PMP22* primer, 100 nM *HSA* TaqMan sonda a 100 nM *PMP22* (exon 3) TaqMan sonda. Vstupní množství gDNA do reakce v každé jamce bylo 50-100 ng. Celkové množství DNA pro všechny 3 triplikáty jednoho vzorku bylo naředěno přes noc v 9 μ l H_2O a při přípravě PCR reakce smícháno s 58 μ l reakčního master mixu. Zkumavky byly pečlivě promíchány a 3 alikvoty po 20 μ l byly rozpipetovány pomocí automatické pipety do 96-jamkové destičky. Destičky byly překryty pomocí fólie „optical adhesive cover“ (ABI) a krátce zcentrifugovány při 4500 rpm.

PCR reakce jsou prováděny za podmínek dle TaqMan univerzálního PCR protokolu: pre-run 2 min. při 50°C a 10 min. při 95°C, 45 cyklů: 15 sec. při 95°C a 1 min. při 60°C (TaqMan Universal PCR Protocol, ABI).

V každé destičce byla vyšetřena vždy stejná DNA pacienta s HNPP (1 kopie *PMP22*), která byla použita jako kalibrátor pro potřeby hodnocení výsledků metodou $\Delta\Delta C_t$. Všechny reakce byly dále monitorovány vyšetřením 3 kontrolních vzorků s prokázanými třemi, dvěma a jednou kopií testovaného genu *PMP22* (1 HNPP pacient, 1 zdravá kontrola, 1 CMT1A pacient).

Analýza dat

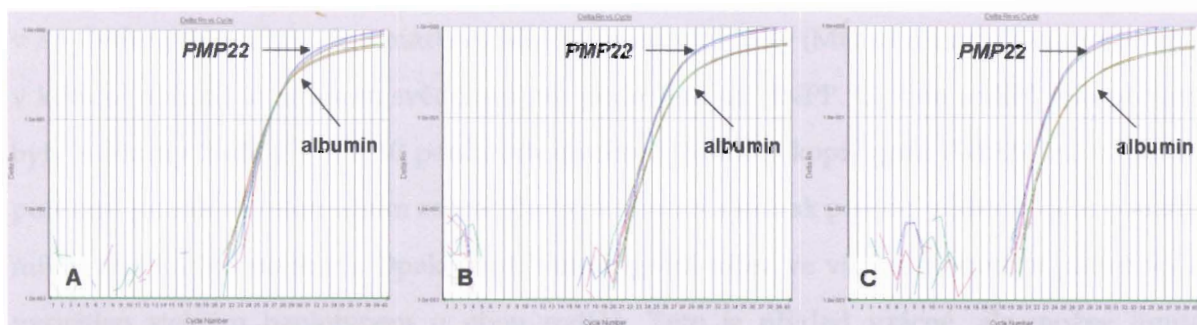
Kvantitativní real-time PCR zaznamenává již v průběhu PCR reakce míru amplifikace PCR produktu, která je přímo úměrná výchozímu počtu kopií vyšetřovaného genu. Testování počtu kopií genu *PMP22* spočívá v našem případě ve srovnání míry amplifikace produktu z *PMP22* vůči produktu z referenčního genu, kterým je vitálně nezbytný gen pro albumin (*HSA*). Vzájemné porovnávání vzorků je umožněno vztažením výsledků ke stejnému kalibračnímu vzorku, který je analyzován v každé reakci.

Určení výchozího počtu kopií genu *PMP22* je provedeno pomocí relativní komparativní metody (comparative threshold cycle; delta delta Ct; $\Delta\Delta Ct$), která u vzorků porovnává a matematicky zpracovává pořadová čísla dvou PCR cyklů („threshold cycle“; Ct), ve kterých dojde poprvé k detekovatelnému nárůstu fluorescence z oblasti genu *PMP22* a referenčního genu pro albumin. Množství kopií testovaného genu je stanoveno výpočtem: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, kde $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ albumin (kalibrátor)} - Ct \text{ PMP22 (kalibrátor)}] - [Ct \text{ albumin (testovaný vzorek)} - Ct \text{ PMP22 (testovaný vzorek)}]$. (*ABI PRISM User bulletin # 2*)

Konečné výsledky vyšetření jsou vyjádřeny hodnotami $\Delta\Delta Ct$, které při použití kalibrátoru s 1 kopií *PMP22* představují přímo počet kopií genu v testovaném vzorku. Výpočet $\Delta\Delta Ct$ hodnot byl prováděn pomocí programu RQ software, který je v příslušenství přístroje ABI PRISM 7000.

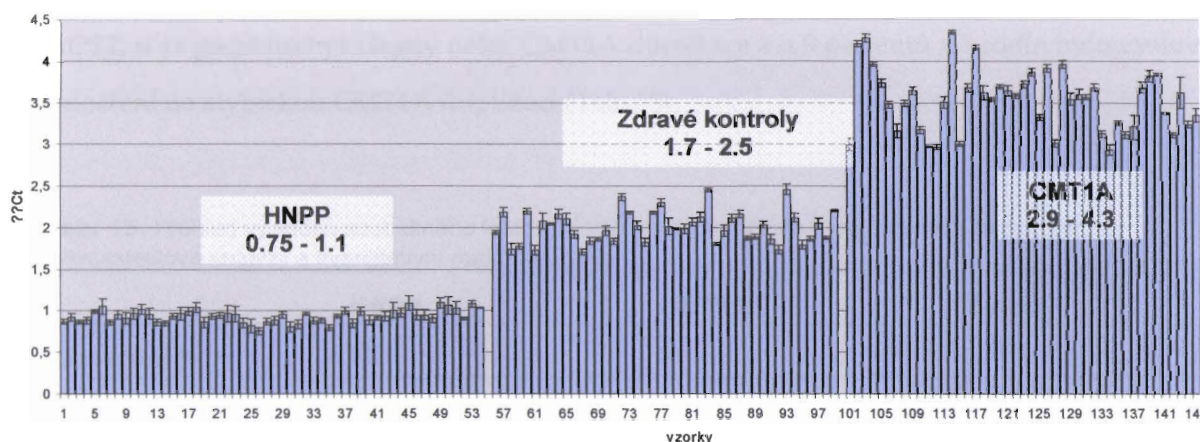
8.4. Výsledky

Optimalizací a přesným pipetováním jsem dosáhla velmi malého rozptylu paralelních amplifikačních křivek jednotlivých triplikátů stejného vzorku pro obě fluorescenční barvy (FAM a VIC). Typické příklady amplifikačních křivek u HNPP pacienta, zdravé kontroly a CMT1A pacienta jsou zobrazeny na obrázku 43.



Obr. 43. Amplifikační křivky exonu 3 *PMP22* a exonu 12 *HSA* genu v multiplexní kvantitativní real-time PCR reakci. Hodnoty ΔRn představují normalizovanou fluorescenci emitovanou při odpoutání fluoroforu z TaqMan sondy. (A) Typická amplifikační křivka u HNPP pacienta (1 *PMP22* kopie); (B) u zdravé kontroly (2 *PMP22* kopie); (C) u CMT1A pacienta (3 *PMP22* kopie). Pověšměte si relativního posunu křivky *PMP22* doprava u HNPP pacienta a posunu doleva u CMT1A pacienta ve srovnání se zdravou kontrolou.

Testování 158 referenčních vzorků umožnilo spolehlivé rozlišení vzorků do 3 dobře ohraničených skupin podle očekávaného počtu 1, 2 a 3 kopií *PMP22*. Zjištěná nepřekrývající se rozmezí $\Delta\Delta Ct$ hodnot pro jednotlivé skupiny jsou (Graf 4): < 1.1 pro HNPP delece (1 kopie *PMP22*), 1.7 – 2.5 pro zdravé pacienty (2 kopie *PMP22*), 2.9 – 4.3 pro CMT1A duplikace (3 kopie *PMP22*).



Graf 4. Hodnoty $\Delta\Delta Ct$ a standardní odchylky detekované pro 157 referenčních vzorků se známým genotypem. Patrná jsou tři dobře ohraničená rozmezí pro vzorky s 1, 2 a 3 kopiemi testovaného genu. Zleva doprava: hodnoty $\Delta\Delta Ct$ kolem 1 u pacientů s HNPP delecí, hodnoty kolem 2 u zdravých kontrol a hodnoty kolem 3 u CMT1A pacientů.

Testování referenčních vzorků umožnilo jejich spolehlivé a jednoznačné rozlišení do 3 dobře ohraničených skupin. Diagnostická rozmezí $\Delta\Delta Ct$ hodnot využívaná v dalších analýzách neznámých vzorků byla nastavena dle těchto výsledků.

Při testování referenčních vzorků jsme narazili na vzorek jedné pacientky s podezřením na HNPP, jejíž $\Delta\Delta Ct$ hodnota při vyšetření real-time PCR opakovaně svědčila pro 2 kopie. Jedná se o sporadicky postiženou pacientku s údajem o opožděném vývoji chůze, distální svalové slabosti a difusně snížených NCV. Dříve provedená mikrosatelitová analýza detekovala 1 alelu v 7 vyšetřených markerech, v markeru Mfd 41 nalezeny 2 alely (Mfd 41 ale neleží vždy spolehlivě v kritické oblasti) se závěrem svědčícím pro podezření na HNPP. U obou rodičů této pacientky byly nalezeny 2 alely v 7 z 10 použitých markerů. Nález 2 kopií genu *PMP22* byl u pacientky potvrzen jednak na referenčním zahraničním pracovišti a jednak pomocí většího počtu použitých mikrosatelitových markerů. Opakovaně homozygotní nález ve více markerech u pacientky byl vysvětlen stejným haplotypem u obou rodičů. Toto je příklad vzácné, ale možné limitace mikrosatelitové analýzy, především při nedostatečném počtu použitých markerů, která v případě náhodného homozygotního stavu pro vyšetřené markery nerozliší tento stav od delece.

Ve skupině 178 „nepotvrzených“ pacientů dříve testovaných mikrosatelitovou analýzou na CMT1A/HNPP s negativním výsledkem byli zachyceni dva pacienti, u kterých spadá hodnota $\Delta\Delta Ct$ do rozmezí pro CMT1A duplikace.

Ve skupině 236 pacientů testovaných souběžně pomocí real-time PCR a mikrosatelitové analýzy bylo identifikováno 57 případů HNPP delecí, 51 případů CMT1A duplikace a 128 případů s normálním počtem 2 kopií genu *PMP22*. Pomocí mikrosatelitové analýzy byl ve stejné skupině detekován stejný počet HNPP pacientů a případů s normálním počtem kopií genu *PMP22*, u 42 pacientů byl zřejmý nález CMT1A duplikace a u 9 pacientů z 5 rodin bylo vysloveno podezření na atypickou CMT1A duplikaci (Tab. 15).

Tab. 15. Přehled výsledků souběžného testování 236 nově přichozích vzorků pomocí rutinní metody mikrosatelitové analýzy a kvantitativní real-time PCR.

	HNPP	CMT1A	2 kopie
Real-time PCR	57	51	128
Mikrosatelitová analýza	57	42 9 pac. (z 5 rodin) podezření na atypickou duplikaci CMT1A	128

8.5. Diskuse

Tato studie vedla k zavedení a ověření spolehlivosti nové metody (multiplexní kvantitativní real-time PCR eseje na testování počtu kopií genu *PMP22* k detekci nejčastější genetické příčiny u choroby CMT). Výsledky testování 158 referenčních vzorků umožnily spolehlivé a snadné rozlišení vzorků s 1, 2 a 3 *PMP22* kopiemi a podle nich byla určena diagnostická rozmezí. Metoda je využitelná pro rychlé a spolehlivé testování CMT pacientů. Celkem jsem v průběhu studie pomocí real time PCR vyšetřila 572 DNA vzorků. Jak bylo již uvedeno, u jedné pacientky z referenční skupiny s podezřením pro HNPP jsme detekovali pomocí real-time PCR 2 kopie genu *PMP22*. Předešlý výsledek byl tedy v této skupině potvrzen v 99,3% (157/158).

První ze dvou pacientů s $\Delta\Delta Ct$ hodnotou odpovídající CMT1A duplikaci ze skupiny 178 nepotvrzených pacientů byl přešetřen sadou v současné době 17 dostupných markerů a dále pomocí metody MLPA a byla potvrzena duplikace celého *PMP22* genu resp. CMT1A duplikace atypického (menšího) rozsahu. Jedná se o starší vzorek, který byl vyšetřován v počátku výzkumného zavádění metody k detekci CMT1A duplikací a HNPP delecí pomocí menšího počtu markerů, který neumožnil průkaz duplikace menšího než typického rozsahu. Jedná se tedy

o případ CMT1A atypické duplikace, který byl objasněn a korigován díky metodě real time PCR a potvrzen i nově provedenou mikrosatelitovou analýzou s použitím více markerů a modernějšího přístroje a dále i a metodou MLPA.

Ve skupině 236 pacientů testovaných souběžně pomocí real-time PCR a mikrosatelitové analýzy byla pomocí real time PCR potvrzena duplikace *PMP22* genu u 5 rodin, u kterých výsledky mikrosatelitové analýzy svědčily pro atypický (menší) rozsah CMT1A duplikace.

Celkem jsme pomocí real-time PCR potvrdili CMT1A duplikaci atypického rozsahu v 6 rodinách. V celkovém souboru 243 rodin s detekovanou CMT1A duplikací v naší laboratoři představuje již nyní tato skupina nezanedbatelný počet. Zdá se pravděpodobné, že CMT1A duplikace atypického rozsahu jsou častější, než jsme dříve předpokládali. Podle dosavadních výsledků by mohly být zodpovědné za 2-3% všech CMT1A případů. Jejich potvrzení vyžadovalo zavedení další metody k přímému průkazu počtu kopií genu *PMP22* a tím byla real-time PCR a následně i MLPA.

Tato studie potvrdila předpoklad, že souběžné testování CMT1A/HNPP pomocí kvantitativního real-time PCR a mikrosatelitové analýzy umožní detekci a potvrzení CMT1A duplikací atypického rozsahu.

Metoda real time PCR k detekci počtu kopií *PMP22* genu byla evaluována retrospektivním testováním 158 referenčních vzorků a v této skupině potvrdila předešlý výsledek mikrosatelitové analýzy v 99,3 %. Potvrdily se tím známé limitace metody v rozlišení homozygotity vyšetřovaných markerů od HNPP dalece či CMT1A duplikace se zvýšením intenzity signálu. Dle našich výsledků lze usuzovat, že spolehlivost mikrosatelitové analýzy v detekci atypické CMT1A duplikace závisí na počtu vyšetřených markerů, tj. že při použití menšího počtu polymorfních markerů může být spolehlivost, zejména v případě atypicky krátké CMT1A duplikace, omezena. Naopak záchyt atypicky krátké HNPP delecce je pomocí mikrosatelitových markerů téměř nemožný. Z těchto důvodů může být použití real time PCR pro CMT1A a HNPP diagnostiku zřejmě dokonce výhodnější a spolehlivější.

Vzorek z nepotvrzené skupiny s atypickou duplikací CMT1A byl původně vyšetřen sadou 8 markerů a duplikace nebyla zachycena. Naopak u všech 5 rodin s atypickými CMT1A duplikacemi, které byly testované sadou 17 markerů, bylo vysloveno podezření a nález byl současně potvrzen pomocí real-time PCR. V celkovém počtu 572 vyšetřených vzorků pomocí real-time Q-PCR byl pomocí real-time PCR upřesněn nebo korigován nález počtu kopií genu *PMP22* stanovený mikrosatelitovou analýzou u 3 vzorků (1 vzorek s 2 kopiemi v HNPP referenční skupině a 2 vzorky se 3 kopiemi v nepotvrzené skupině. Podíl vzorků, které mohou

zůstat při mikrosatelitové analýze nezachyceny či nesprávně diagnostikovány je tedy přibližně 0,3% (2/572).

Využití kvantitativní real-time PCR metody k testování CMT1A/HNPP bylo již dříve popsáno několika autory za použití různých přístrojů.. (Aarskog a Vedeler, 2000; Thiel et al, 2003; Patitucci et al., 2005; Choi et al., 2005). Výhodou této metody oproti dalším dříve navrženým metodám pro rutinní testování HNPP a CMT1A (Rowland et al., 2001) (kvantitativní Southernův blotting; fluorescenční in situ hybridizace (FISH); pulsní gelová elektroforéza (PFGE)), je zejména rychlost a opakovaně ověřená vysoká spolehlivost. Bylo ukázáno, že real-time PCR je stejně nebo i více senzitivní pro záchyt CMT1A duplikace, než použití sady mikrosatelitových markerů, (kde došlo nezachycení vzorku v začátku používání metody při použití výrazně menšího a tím nedostatečného počtu markerů) a naše výsledky se shodují s tímto závěrem. (Thiel et al., 2003b; Patitucci et al., 2005) Další dříve využívanou metodou byla REP-PCR - PCR rekombinovaného junkčního fragmentu (CMT1A-REP) vzniklého rekombinací proximálního a distálního repetitivního elementu, které ohraničují 1,5 Mb oblast. Jedná se sice o metodu poměrně rychlou a jednoduchou, nicméně i v jejím případě existují doklady o nižší sensitivitě ve srovnání s real-time PCR. (Patitucci et al., 2005; Choi et al., 2005) Další metodou teprve v nedávné době navrženou k testování CMT1A a HNPP je multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). (Schouten et al., 2002; Slater et al., 2004) Spolehlivost této metody byla srovnávána s FISH a byla prokázána vysoká senzitivita a specificita metody. Jedná se o metodu poměrně levnou. Velkou výhodou real-time PCR ve srovnání s MLPA ale zůstává mnohem větší rychlost (2 hodiny oproti 2 dnům k získání výsledku pomocí MLPA).

9. Závěr CMT

V této studii jsem pomocí přímého sekvenování genů *EGR2*, *NEFL* a *SIMPLE* a pomocí metody real-time PCR při testování forem CMT1A a HNPP objasnila charakter postižení CMT na molekulární úrovni celkem u 12 rodin z našeho rozsáhlého souboru.

U 6 rodin byly nalezeny kauzální mutace – čtyři dosud nepopsané (1 v genu *EGR2*, 1 v genu *NEFL* a 2 v genu *SIMPLE*) a dále v genu *SIMPLE* u dvou rodin dříve popsaná mutace. Celkový záchyt mutací ve třech testovaných genech odpovídá asi 2,3% (6 identifikovaných mutací v celkovém počtu 261 vyšetřených rodin). U rodin s nalezenými mutacemi mohlo být upřesněno genetické riziko přenosu vloh na potomky a bylo nabídnuto testování dalším postiženým členům či osobám v riziku. Důležitým přínosem je i vyloučení známých příčin – mutací ve vyšetřených genech u velkého počtu českých pacientů a rodin s CMT.

Výsledky této studie společně s dalšími výsledky DNA laboratoře ukazují na omezený diagnostický význam testování některých genů spojených s CMT pro nedostatečný záchyt mutací. Opodstatněnost testování může být v některých případech podpořena malou velikostí těchto genů a tím nižšími náklady na testování.

V 6 rodinách s potvrzenými atypickými duplikacemi CMT1A mohlo být spolehlivě stanoveno genetické riziko přenosu mutace na potomky.

CMT choroby jsou progresivní onemocnění zpravidla nezkracující normální délku života pacientů a mírná závažnost postižení není obecně medicínskou indikací k prenatální diagnostice. Tato je však na přání pacientů se známou kauzální mutací nyní principiálně možná.

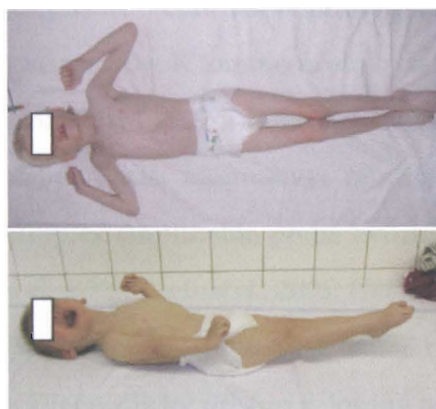
Znalost kauzální mutace je důležitá při plánování rehabilitační léčby i pro doporučení (byť dosud velmi omezených) možností farmakoterapie, jako je podávání vitamínu C u formy CMT1A. (*Passage et al., 2004*)

B CHOROBA PELIZAEUS-MERZBACHER

10. Úvod

Choroba Pelizaeus-Merzbacher (PMD) (OMIM 312080) a k ní alelická tzv. spastická paraplegie typu 2 jsou gonosomálně recesivní (X-vázané) poruchy myelinizace centrálního nervového systému (CNS) způsobené mutacemi genu pro proteolipid protein 1 (PLP1). (Willard a Riordan, 1985; Hudson et al., 1989) Gen *PLP1* leží na chromosomu Xq22.2, zahrnuje oblast velikosti ~17 kb a má 7 kódujících exonů. (Inoue 2005) *PLP1* kóduje dva hlavní proteiny centrálního myelinu, integrální membránový protein PLP1 a jeho o 35 aminokyselin kratší isoformu DM20, vznikající alternativním sestřihem z místa v exonu 3. (Nave et al., 1987)

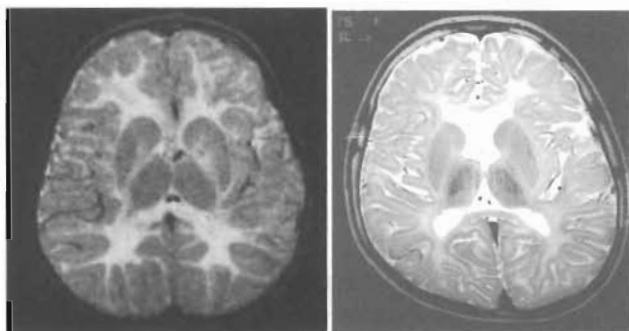
PMD je typicky onemocnění chlapců; u žen – přenašeček *PLP1* duplikace – většinou k projevům onemocnění nedochází. PMD je tradičně klasifikováno dle tíže postižení (Seitelberger, 1970) Častější klasická forma se projevuje brzy po narození nebo od kojeneckého věku nystagmem a hypotonií, která se později mění v progresivní spasticitu, a dále výraznou cerebelární ataxií a psychomotorickou retardací, více v oblasti motorické než mentální. (Seeman et al., 2003) Fenotyp pacientů a typický nález na MR jsou znázorněny na obrázcích 44 a 45 (Bouloche a Aicardi, 1986) Vzácnější a těžší kongenitální forma je spojena s chyběním psychomotorického vývoje a vede většinou k úmrtí v raném věku.



Obr. 44.

Dva PMD pacienti z našeho souboru. Patrná je spasticita na horních i dolních končetinách. Nahore pacient s bodovou mutací v *PLP1*, dole pacient s nejčastější duplikovanou formou. (Foto P. Seeman)

Na molekulárně genetické úrovni je zdaleka nejčastější příčinou PMD (~60-70 %) chromozomální tandemová duplikace různého rozsahu na Xq22 obsahující vždy celý gen *PLP1*. (Sisternans *et al.*, 1998; Woodward *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1999) Vzácnější příčinou jsou různé bodové mutace *PLP1* (Garbern *et al.*, 1999) a také vzácné delece *PLP1*. (Raskind *et al.*, 1991) Hlavním mechanismem vzniku PMD je tedy zvýšení dávky *PLP1* vedoucí k overexpresi *PLP1/DM20* proteinů a ta k nestabilitě centrálního myelinu (myelinové deficienci). (Ellis and Malcolm, 1994; Inoue 2005)



Obr. 45.

T2-vážené MRI obrazy u 2 PMD pacientů s *PLP1* duplikací. Je patrná hyperintenzita signálu v bílé hmotě mozku. U většiny pacientů je redukován objem bílé hmoty. (Plecko *et al.*, 2003)

PMD pacienti nesoucí *PLP1* duplikaci mají obvykle klasickou formu PMD a jejich postižení je většinou mírnější než u pacientů s bodovými mutacemi v *PLP1*. (Inoue *et al.*, 1999; Seeman *et al.*, 2002; Seeman *et al.*, 2003) Bodové mutace *PLP1* genu způsobují celé spektrum fenotypů PMD od nejtěžších konnatálních forem až po mírné formy SPG2. (Seeman *et al.*, 2002) I přes tuto znalost není však určení genotypu jen na základě klinického obrazu spolehlivé díky překrývání klinických symptomů u pacientů s různými genotypy. (Inoue 2005) Z tohoto důvodu jsou všichni pacienti s klinickým podezřením na PMD a také předpokládané ženy přenašečky testovány v první řadě na přítomnost nejčastější příčiny PMD – *PLP1* duplikace. Detekce tandemové genomické duplikace velmi variabilního rozsahu je výzvou jak pro molekulárně genetické tak i cytogenetické metody. K tomuto účelu byla již vyvinuta řada postupů – kvantitativní Southern blotting, kvantitativní PCR a interfázní FISH. (Inoue 2005) V nedávné době k těmto klasickým metodám přibyly další alternativy: multiplex ligation-dependent probe amplification assay (MLPA), multiplex amplifiable probe hybridization assay (MAPH) a real-time PCR. (Gao *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2005; Regis *et al.*, 2005; Hübner *et al.*, 2005; Combes *et al.*, 2006)

Odesílající kliničtí lékaři obvykle žádají rychlý výsledek testování na PMD u novorozenců a malých dětí. Diagnostický přístup založený na kvantitativním fluorescenčním multiplexním PCR (QFM-PCR), který v současnosti rutinně využíváme v naší laboratoři, je v porovnání s možnostmi real-time PCR relativně časově náročný a vyžaduje několikeré opakování reakcí.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zavést další nezávislou metodu na detekci *PLP1* duplikace, která by byla spolehlivá a hlavně rychlá a levná. Real-time kvantitativní PCR (Q-PCR) je rychlou metodu, která se v poslední době stává rozšířenou pro kvantifikaci nukleových kyselin. (Aarskog a Vedeler, 2000; Regis et al., 2005; Thiel et al., 2003b; Wilke et al., 2000; Heid et al., 1996). Optimalizovala jsem dvě multiplexní Q-PCR reakce cílené na dva nesousedící exony z opačných stran genu *PLP1* a tyto reakce jsem validizovala vyšetřením vzorků s již známým genotypem.

11. Pacienti a metody

Pacienti

Celkově jsem za účelem validace dvou multiplexních reakcí cílených na exon 3 (esej A) a na exon 6 genu *PLP1* (esej B) použila 110 referenčních vzorků genomové gDNA se známým počtem kopií genu.

Nejdříve jsem testovala 67 vzorků jedinců, kteří byli v minulosti vyšetřeni na PMD v naší laboratoři. Tato skupina zahrnovala: 12 klinicky a geneticky diagnostikovaných PMD pacientů (2 *PLP1* kopie), 19 žen přenašeček (3 *PLP1* kopie), 15 zdravých mužů (1 *PLP1* kopie) a 21 zdravých žen příbuzných PMD pacientům (2 *PLP1* kopie). Všechny tyto vzorky byly testovány pomocí dvou kvantitativních fluorescenčních multiplexních PCR reakcí (QFM-PCR). V první PCR se koamplifikuje exon 4 *PLP1* genu a exon 4 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) genu; druhá koamplifikuje exon 4 *PLP1* genu a exon 48 genu pro dystrophin. (Mimault et al., 1999; Woodward et al., 1998; Seeman et al., 2003) Dále byly tyto vzorky testovány pomocí mikrosatelitové analýzy dinukleotidového polymorfismu (CA repeatu) uvnitř prvního intronu *PLP1* (Mimault et al., 1995) a vzorky s detekovanou duplikací *PLP1* dále analýzou 3 mikrosatelitových markerů přiléhajících k *PLP1* (DXS1106, DXS8096 a DXS1191) k určení rozsahu duplikovaného úseku (nepublikované výsledky Mgr. I. Sakmaruové). (Woodward et al., 2003)

Obě testované reakce byly dále ověřovány na 43 kontrolních DNA vzorcích nepříbuzných zdravých jedinců, kteří nebyly dříve testováni na přítomnost *PLP1* duplikace (24 nepříbuzných zdravých žen a 19 nepříbuzných zdravých mužů testováno reakcí pro *PLP1* exon 3; 23 zdravých žen a 20 zdravých mužů testováno reakcí pro *PLP1* exon 6).

Genomová DNA (gDNA) byla izolována z periferní krve pomocí standardních metod.

Materiál

TaqMan primery a sondy byly navrženy pomocí Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems, USA) a jejich sekvence byly ověřeny pomocí nucleotide-nucleotide blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Primery a sondy byly objednány od Applied Biosystems (ABI). Gen pro lidský sérový albumin (HSA) byl použit v obou reakcích jako endogenní kontrola.

(Thiel et al., 2003b) TaqMan sonda pro HSA exon 12 obsahovala excitační fluorofor 5'-VIC (reporter) a 3'-Tamra jako zhášedlo (quencher). Obě sondy pro *PLP1* exon 3 a exon 6 obsahovaly excitační fluorofor 5'-FAM a nefluorescenční zhášedlo. Sekvence primerů a sond použitých ve studii jsou shrnuty v tabulce 16.

Tab. 16. Primery a TaqMan sondy pro exon 12 genu pro lidský sérový albumin (*HSA*), exon 3 a exon 6 proteolipid protein 1 genu (*PLP1*) použité ve studii.

	forward primer (5'>3') reverse primer (5'>3')	TaqMan sonda
HSA exon 12	TGTTGCATGAGAAAACGCCA GTCGCCTGTTACCAAGGAT	5'-VIC-AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAG-TAMRA-3'
PLP1 exon 3	GGCGCAGTCAGGCAGATC CCCTTGCCGCAGATGGT	5'-6-FAM-TTGGCGACTACAAGAC-MGB-3'
PLP1 exon 6	TCCAAATGACCTTCCACCTGTT CTTGCCAAGATCATTCAAAGTCAAC	5'-6-FAM-TACTGGTTTCCCTGGTG-MGB-3'

Real-time PCR reakce

Na začátku projektu jsem provedla pilotní studii optimalizující koncentrace primerů a sond a pro obě reakce jsem vypracovala stejné parametry a reakční podmínky.

Vzorky byly testovány jako triplikáty v multiplexní PCR reakci na přístroji ABI Prism 7000 (ABI). Výsledný reakční objem byl 20 μ l v každé jamce. Složení PCR reakční směsi bylo identické pro obě reakce (kromě *PLP1* primerů a sond): uvedeny jsou výsledné koncentrace: 1X qPCR Mastermix (Eurogentec, Belgium), 750 nM každý HSA primer a 750 nM každý *PLP1* (exon 3 nebo 6) primer, 100 nM HSA TaqMan sonda a 100 nM *PLP1* (exon 3 nebo 6) TaqMan sonda. Vstupní množství gDNA do reakce v každé jamce bylo 50-100 ng. Celkové množství DNA pro všechny 3 triplikáty jednoho vzorku bylo naředěno přes noc v 9 μ l H₂O a při přípravě PCR reakce smícháno s 57 μ l reakčního mixu. Zkumavky byly pečlivě promíchány a 3 alikvoty po 20 μ l byly rozpipetovány pomocí automatické pipety do 96-jamkové destičky. Destičky byly překryty pomocí fólie „optical adhesive cover“ (ABI) a krátce zcentrifugovány při 4500 rpm.

PCR reakce probíhaly za těchto teplotních podmínek: pre-run 2 min. při 50°C a 10 min. při 95°C, 45 cyklů: 15 sec. při 95°C a 1 min. při 60°C (TaqMan Universal PCR Protocol, ABI).

V každé destičce byla vyšetřena vždy stejná DNA zdravého muže (1 *PLP1* kopie), která byla použita jako kalibrátor pro potřeby hodnocení výsledků metodou $\Delta\Delta C_t$. Každá reakce byla dále monitorována vyšetřením 4 kontrolních vzorků (1 PMD pacient, 1 zdravá příbuzná žena, 1 zdravý příbuzný muž a 1 žena – přenašečka *PLP1* duplikace).

Analýza dat

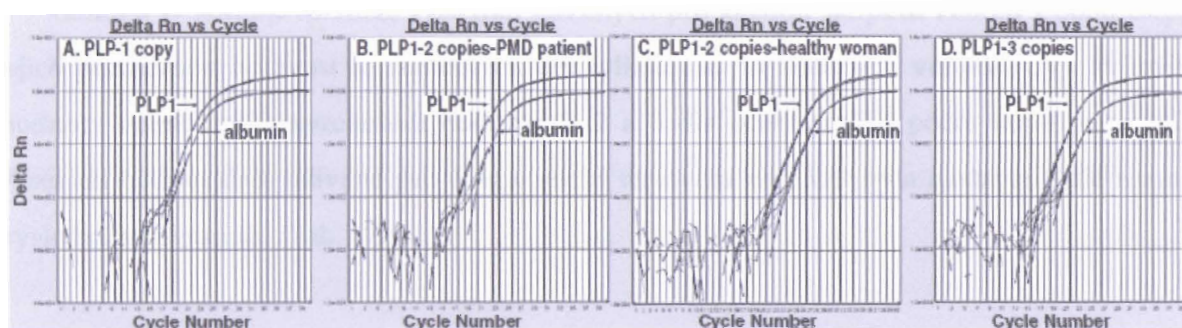
Metoda Q-PCR je založena na měření hodnot Ct během exponenciální fáze PCR amplifikace. Parametr Ct je definován jako číslo cyklu, ve kterém míra fluorescence v průběhu pokračující amplifikace překročí určitý práh. Prah byl v průběhu studie nastaven automaticky na 10 standardních odchylek nad průměrnou baseline fluorescenci a ve většině případů byla jeho pozice manuálně upravena v rozmezí logaritmické fáze amplifikační křivky.

Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí software přístroje ABI Prism 7000 Sequence Detection System a RQ software (ABI). Počet kopií genu *PLP1* byl stanoven relativní kvantitativní Ct komparativní metodou ($\Delta\Delta Ct$) s využitím *HSA* genu jako endogenní kontroly. (Thiel et al., 2003b; ABI PRISM User bulletin # 2) $\Delta\Delta Ct$ metoda normalizuje fluorescenční signál detekovaný z oblasti zkoumaného genu k endogennímu referenčnímu genu a následně porovnává signál z jednotlivých vzorků s kalibrátorem. Množství kopií testovaného genu je stanoveno výpočtem: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, kde $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ albumin (kalibrátor)} - Ct \text{ PLP1 (kalibrátor)}] - [Ct \text{ albumin (testovaný vzorek)} - Ct \text{ PLP1 (testovaný vzorek)}]$. (ABI PRISM User bulletin # 2)

Tímto výpočtem zjistíme relativní rozdíl mezi vzorky - výsledná hodnota tedy představuje poměr mezi počtem kopií *PLP1* genu v testovaném vzorku a v kalibrátoru. Vzhledem k tomu, že námi použitý kalibrátor je DNA zdravého muže s 1 *PLP1* kopií, výsledná hodnota představuje tedy jednoduše počet kopií *PLP1* genu (na buňku) v testovaném vzorku.

12. Výsledky

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat rychlou metodu na diagnostiku nejčastější mutace zodpovědné za onemocnění PMD – *PLP1* duplikace. Optimalizovala jsem dvě Q-PCR metody založené na použití Taqman reagensí a multiplexní amplifikaci endogenního kontrolního genu. V obou navržených reakcích jsem dosáhla velmi malého rozptylu paralelních amplifikačních křivek jednotlivých triplikátů stejného vzorku pro obě fluorescenční barvy (FAM a VIC). Typické příklady amplifikačních křivek u zdravého muže, PMD pacienta, zdravé ženy a ženy přenašečky jsou zobrazeny na obrázku 46.

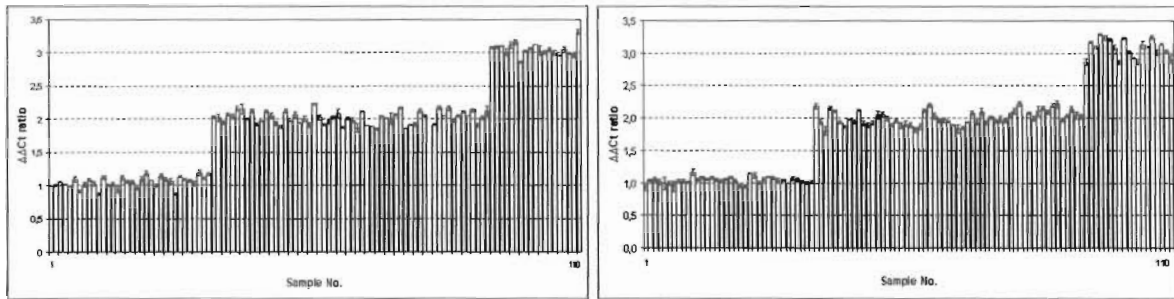


Obr. 46.

Amplifikační křivky exonu 6 *PLP1* a exonu 12 HSA genu v multiplexní kvantitativní real-time PCR reakci. Hodnoty ΔRn představují normalizovanou fluorescenci emitovanou při odpoutání fluoroforu z TaqMan sondy. (A) Typická amplifikační křivka u zdravého muže (1 *PLP1* kopie); (B) u PMD pacienta (2 *PLP1* kopie); (C) u zdravé ženy (2 *PLP1* kopie) a (D) u ženy přenašečky (3 *PLP1* kopie).

Zpracováním dat, jak je popsáno výše, dává metoda výsledek, který představuje absolutní počet kopií genu *PLP1*. V obou reakcích jsme získali 3 dobře ohraničené skupiny nepřekrývajících se hodnot odpovídající skupinám vzorků s očekávaným počtem 1, 2 a 3 *PLP1* kopií. Tyto 3 skupiny jsou jednoznačně odlišitelné a umožňují spolehlivé rozlišení testovaných vzorků. U všech 110 vzorků jsme získali výsledek shodný s naším očekáváním vzhledem k dříve provedené analýze nebo k jejich pohlaví a normálnímu klinickému nálezů. Esejí pro exon 3 jsme identifikovali 19 vzorků se třemi kopiemi, 57 vzorků se dvěma kopiemi a 34 vzorků s jednou kopií. Esejí pro exon 6 jsme identifikovali 19 vzorků se třemi kopiemi, 56 vzorků se dvěma kopiemi a 35 vzorků s jednou kopií.

Rozmezí detekovaná pro vzorky s 1, 2 a 3 *PLP1* kopiemi v esejí A byla 0.87-1.19, 1.85-2.23 a 2.86-3.32; rozmezí detekovaná v esejí B byla 0.92-1.16, 1.80-2.21 a 2.86-3.25 (Graf 5).



Graf 5.

Hodnoty $\Delta\Delta C_t$ a standardní odchylky detekované pro 110 vzorků se známým genotypem v esejí pro exon 3 genu *PLP1* (A) a v esejí pro exon 6 genu *PLP1* (B). V obou esejích jsme zachytili nepřekrývající se rozmezí hodnot pro vzorky s 1, 2 a 3 kopiemi testovaného genu. Zleva doprava: hodnoty $\Delta\Delta C_t$ kolem 1 u zdravých mužů s 1 *PLP1* kopií, zdravé ženy a PMD pacienti s hodnotami kolem 2 a ženy přenašečky s hodnotami okolo 3.

Tabulka 17 shrnuje rozmezí výsledků získaných pro každou skupinu vzorků v obou esejích, jejich průměrnou hodnotu se standardní odchylkou (SD) a koeficient variace (CV). Průměrné hodnoty velmi dobře aproximují hodnoty 1, 2 a 3 dle očekávaného počtu kopií genu *PLP1*. Rozmezí hodnot dále užívané pro diagnostické testování na PMD byla nastavena dle rozmezí výsledků v této studii (Tab. 17).

Tab. 17. Rozmezí a průměry $\Delta\Delta C_t$ hodnot detekované ve dvou multiplexních real-time PCR esejích pro exon 3 a 6 genu *PLP1*. Standardní odchylka, (STD); koeficient variace, (CV)

	Počet vz.	$\Delta\Delta C_t$ range	$\Delta\Delta C_t$ mean \pm STD	CV (%)
PLP1 exon 3				
Zdraví muži	34	0.87-1.19	1.04 \pm 0.08	7.69
PMD pacienti	12	1.92-2.16	2.05 \pm 0.09	4.26
Zdravé ženy	45	1.85-2.23	2.00 \pm 0.09	4.72
Ženy přenašečky	19	2.86-3.32	3.05 \pm 0.09	3.08
PLP1 exon 6				
Zdraví muži	35	0.92-1.16	1.03 \pm 0.05	5.08
PMD pacienti	12	1.96-2.21	2.09 \pm 0.08	3.69
Zdravé ženy	44	1.80-2.20	1.98 \pm 0.11	5.37
Ženy přenašečky	19	2.86-3.25	3.08 \pm 0.14	4.60

13. Diskuse

V této studii jsem zavedla a ověřila dvě multiplexní real-time Q-PCR eseje na záchyt nejčastější příčiny PMD pomocí testování dvou nesousedících exonů genu *PLP1*. Byla určena diagnostická rozmezí pro testování počtu kopií genu *PLP1* u suspektních PMD pacientů, která jsou nyní využívána k diagnostickému testování nejčastější mutace u PMD.

Výsledky obou esejí umožnily spolehlivé a snadné rozlišení vzorků s 1, 2 a 3 *PLP1* kopiemi. Obě reakce poskytly konzistentní výsledky a mají tedy srovnatelný význam pro testování PMD případů způsobených prevalentní duplikací zahrnující celý gen *PLP1*.

Multiplexní real-time Q-PCR metoda má ve srovnání s dalšími rutinně používanými metodami mnoho výhod. Jedná se o metodu velmi rychlou a poměrně velkým obratem vzorků; 25 vzorků může být vyšetřeno ve 2 hodinách. Na rozdíl od dalších kvantitativních PCR metod, jako je kvantitativní fluorescenční multiplexní PCR (QFM-PCR), komparativní multiplexní PCR (CM-PCR) a kvantitativní multiplexní PCR krátkých fluorescenčních fragmentů (QMPSF), není při real-time PCR nutné zpracovávat PCR produkty a tím odpadá riziko kontaminace budoucích reakcí. (Inoue et al., 1996; Mimault et al., 1999; Woodward et al., 1998; Vaurs-Barriere et al., 2005)

Důležitou diagnostickou metodou pro PMD, včetně prenatální diagnostiky, je na některých pracovištích interfázni FISH. (Inoue 2005) Metoda FISH je poměrně pracná a o mnoho časově náročnější než real-time PCR a má také svá omezení spolehlivosti v záchytu více než dvou *PLP1* kopií. (Woodward et al., 1998; Wolf et al., 2005)

Nezávno byly k testování počtu *PLP1* kopií navrženy další dvě metody, MLPA a MAPH, které zároveň umožní detekci malých intragenových *PLP1* přestaveb (demonstrováno pro MAPH) a detekci tří a více *PLP1* kopií (demonstrováno pro MLPA). (Wolf et al., 2005; Vaurs-Barriere et al., 2005; Combes et al., 2006) Možnost detekce částečných přestaveb pomocí jedné real-time Q-PCR reakce je omezena. Nicméně, současné testování dvou nesousedících exonů genu *PLP1* (jako v této studii) zvyšuje významně pravděpodobnost detekce možných *PLP1* intragenových přestaveb a tak představuje nástroj na velmi rychlé ověření genové integrity. Spolehlivost real-time Q-PCR v detekci více než tří *PLP1* kopií nebyla zatím v žádné studii ověřena, ale je pravděpodobné, že by tento stav vedl k odpovídajícímu zvýšení výsledného poměru dle počtu přítomných *PLP1* kopií. MLPA představuje levný a spolehlivý nástroj,

ale velkou předností real-time PCR je rychlost získání výsledku. (2 dny při MLPA a 2 hodiny při real-time PCR).

Nedávno byly popsány dvě real-time PCR eseje na detekci počtu kopií *PLP1* založené na použití metody standardních křivek. (Regis et al., 2005; Gao et al., 2005) V těchto studiích se amplifikace testovaného (*PLP1*) a autozomálního referenčního genu provádí v oddělených zkumavkách a v každé reakci je nutné analyzovat sadu standardních vzorků za účelem sestavení standardní křivky. Výsledná kapacita metody je významně nižší ve srovnání s multiplexní reakcí využívající $\Delta\Delta Ct$ metodu (analýza 11 oproti 25 vzorkům v každé reakci). (Regis et al., 2005) V jiné studii byl popsán záchyt *PLP1* delece (Gao et al., 2005) a další z nedávno publikovaných studií popisuje metodu multiplexní real-time PCR prováděné se systémem SYBR-Green PCR ověřené na 20 zdravých jedincích a použité pro detekci *PLP1* duplikace. (Hübner et al., 2005)

PLP1 duplikace u PMD představuje jakousi paralelu k dvěma nejčastějším typům dědičných neuropatií Charcot-Marie-Tooth (CMT1A a HNPP) způsobeným duplikacemi a delecemi dalšího dávkově sensitivního myelinového genu pro peripheral myelin protein 22 (PMP22). (Lupski, 1997) V diagnostice CMT1A a HNPP se metoda real-time PCR, založená jak na metodě standardní křivky tak na $\Delta\Delta Ct$ metodě, velmi osvědčila a v mnoha laboratořích, včetně naší, byla zavedena jako rutinní testovací metoda. (Mikesova et al., 2006; Aarskog a Vedeler, 2000; Thiel et al., 2003b)

Multiplexní real-time PCR je ze všech metod navržených k PMD testování nejrychlejší a pravděpodobně i nejjednodušší. Dle našich výsledků shrnujeme, že multiplexní real-time Q-PCR je metodou robustní, vysoce sensitivní a specifickou, využitelnou v testování počtu kopií genu *PLP1* u pacientů s onemocněním Pelizaeus-Merzbacher i u žen přenašeček. Představuje tedy užitečný nástroj k rutinní diagnostické detekci nejčastější *PLP1* mutace u PMD pacientů a u jejich příbuzných.

Po zavedení metody bylo do současné doby v naší laboratoři otestováno 47 vzorků suspektních PMD pacientů a jejich blízkých příbuzných. V této skupině byli pomocí metody real-time PCR identifikováni 2 PMD pacienti a 2 ženy přenašečky ze 2 různých rodin. Jejich výsledné $\Delta\Delta Ct$ hodnoty byly: 2,02 a 2,23; 2,88 a 2,93 a spadaly tak do určených diagnostických rozmezí. Tyto výsledky se shodují se souběžně prováděným testováním rutinní metodou.

C LITERATURA

- Aarskog NK and Vedeler CA (2000) Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Human Genetics* 107:494-498
- Ambler Z. *Neuropatie a myopatie*. Triton, Praha, 1999.
- Andrigo C, Boito C, Prandini P et al. A novel out-of-frame mutation in the neurofilament light chain gene (NEFL) does not result in Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Neurogenetics*. 2005;6:49-50
- Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria LL, Ajmar F, Mandich P. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat*. 1999;14:353-354
- Bennett CL, Shirk AJ, Huynh HM, Street VA, Nelis E, Van Maldergem L, De Jonghe P, Jordanova A, Guergueltcheva V, Tournev I, Van Den Bergh P, Seeman P, Mazanec R, Prochazka T, Kremensky I, Haberlova J, Weiss MD, Timmerman V, Bird TD, Chance PF. SIMPLE mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol*. 2004;55:713-720
- Boerkoel CF, Takashima H, Bacino CA, Daentl D, Lupski JR. EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics*. 2001;3:153-157
- Boulloche J and Aicardi J (1986) Pelizaeus-Merzbacher disease: clinical and nosological study. *Journal of Child Neurology* 1:233-239
- Carpenter DA, Ip W. Neurofilament triplet protein interactions: evidence for the preferred formation of NF-L-containing dimers and a putative function for the end domains. *J Cell Sci*. 1996;109 (Pt 10):2493-2498
- Charcot J-M, Marie P. Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pied et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med* 6: 97-138, 1886.
- Choi BO, Lee MS, Shin SH, Hwang JH, Choi KG, Kim WK, Sunwoo IN, Kim NK, Chung KW. Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean Charcot-Marie-Tooth neuropathy patients. *Hum Mutat*. 2004;24:185-186

- Choi JR, Lee WH, Sunwoo IN et al. Effectiveness of real-time quantitative PCR compare to repeat PCR for the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Yonsei Med J.* 2005;46:347-352
- Combes P, Bonnet-Dupeyron MN, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Bertini E, Rodriguez D, Armour JA, Boespflug-Tanguy O, and Vours-Barriere C (2006) PLP1 and GPM6B intragenic copy number analysis by MAPH in 262 patients with hypomyelinating leukodystrophies: identification of one partial triplication and two partial deletions of PLP1. *Neurogenetics* 7:31-37
- De Jonghe P, Timmerman V, Nelis E. Hereditary Peripheral Neuropathies. In: Deymeer F (ed). *Neuromuscular Diseases: From Basic Mechanisms to Clinical Management.* Monogr Clin Neurosci. Basel, Karger, 2000, vol 18, pp 128-146.
- De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Evgrafov O, Timmerman V. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol.* 2001;49:245-249
- Dyck PJ. Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory and autonomic neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH (eds). *Peripheral Neuropathy.* Philadelphia, WB Saunders Co. 1984, pp 1600-1642.
- Dyck PJ, Chance P, Leo R, Carney AJ. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral neuropathy*, 3rd edition. Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (eds). Philadelphia, WB Saunders Co. 1993; pp 1094-1136.
- Ellis D and Malcolm S (1994) Proteolipid protein gene dosage effect in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nature Genetics* 6:333-334
- Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Bertolasi L, Cabrini I, Ferrarini M, Rizzuto N. Giant axon and neurofilament accumulation in Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Neurology.* 2004;62:1429-1431
- Fabrizi GM, Cavallaro T, Angiari C, Cabrini I, Taioli F, Malerba G, Bertolasi L, Rizzuto N. Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, a disorder of the cytoskeleton. *Brain.* 2007;130:394-403
- Gao Q, Thurston VC, Vance GH, Dlouhy SR and Hodes ME (2005) Genetic diagnosis of PLP gene duplications/deletions in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Clinical Genetics* 68:466-467
- Garbern J, Cambi F, Shy M and Kamholz J (1999) The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Archives of Neurology* 56:1210-1214.

- Georgiou DM, Zidar J, Korosec M, Middleton LT, Kyriakides T, Christodoulou K. A novel NF-L mutation Pro22Ser is associated with CMT2 in a large Slovenian family. *Neurogenetics*. 2002;4:93-96
- Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*. 1980;103:259-280
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994
- Herrmann DN, Griffin JW. Intermediate filaments: a common thread in neuromuscular disorders. *Neurology*. 2002;58:1141-1143
- Houlden H, Reilly MM. Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006;8:43-62
- Hübner CA, Orth U, Senning A, Steglich C, Kohlschütter A, Korinthenberg R and Gal A (2005) Seventeen novel PLP1 mutations in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Human Mutation* 25:321-322
- Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J and Gencic S (1989) Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:8128-8131
- Inoue K, Osaka H, Sugiyama N, Kawanishi C, Onishi H, Nezu A, Kimura K, Yamada Y and Kosaka K (1996) A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *American Journal of Human Genetics* 59:32-39
- Inoue K, Osaka H, Imaizumi K, Nezu A, Takanashi J, Arii J, Murayama K, Ono J, Kikawa Y, Mito T, Shaffer LG, Lupski JR (1999) Proteolipid protein gene duplications causing Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular mechanism and phenotypic manifestations. *Annals of Neurology* 45:624-632
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1-16
- Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, Ceuterick C, Martin JJ, Butler IJ, Mancias P, Papasozomenos S, Terespolsky D, Potocki L, Brown CW, Shy M, Rita DA, Tournev I, Kremensky I, Lupski JR, Timmerman V. Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*. 2003;126:590-597
- Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, Jr., Acharya S, Shows TB, Rowley JD, Sukhatme VP. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene

- encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:7164-7168
- Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9:554-560
- Julien JP, Grosveld F, Yazdanbaksh K, Flavell D, Meijer D, Mushynski W. The structure of a human neurofilament gene (NF-L): a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family. *Biochim Biophys Acta*. 1987 Jun 6;909(1):10-20.
- Kabzinska D, Perez-Olle R, Goryunov D, Drac H, Ryniewicz B, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A, Liem RK. Is a novel I214M substitution in the NEFL gene a cause of Charcot-Marie-Tooth disease? Functional analysis using cell culture models. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11:225-231
- Latour P, Gonnaud PM, Ollagnon E, Chan V, Perelman S, Stojkovic T, Stoll C, Vial C, Ziegler F, Vandenberghe A, Maire I. SIMPLE mutation analysis in dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease: three novel mutations. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11:148-155
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol*. 1993;122:1337-1350
- Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA, Chakravarti A, Patel PI. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*. 1991;66:219-232
- Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease: a gene-dosage effect. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1997;32:83-84, 89-91, 94-85 passim
- Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy: duplication, gene dosage, and genetic heterogeneity. *Pediatr Res*. 1999;45:159-165
- Meggouh F, de Visser M, Arts WF, De Coo RI, van Schaik IN, Baas F. Early onset neuropathy in a compound form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol*. 2005;57:589-591
- Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:37-46
- Mikesova E, Huhne K, Rautenstrauss B, Mazanec R, Barankova L, Vyhnalek M, Horacek O, Seeman P. Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:764-767
- Mikesova E, Barankova L, Sakmaryova I, Tatarkova I, Seeman P. Quantitative multiplex real-time PCR for detection of PLP1 gene duplications in Pelizaeus-Merzbacher patients. *Genet Test*. 2006 Fall;10(3):215-20.

- Mimault C, Cailloux F, Giraud G, Dastugue B and Boespflug-Tanguy O (1995) Dinucleotide repeat polymorphism in the proteolipoprotein (PLP) gene. *Human Genetics* 96:236
- Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B and Boespflug-Tanguy O (1999) Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. *The Clinical European Network on Brain Demyelinating Disease. American Journal of Human Genetics* 65:360-369
- Murakami T, Garcia CA, Reiter LT, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75:233-250
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*. 2001;30:355-368
- Nardelli J, Gibson TJ, Vesque C, Charnay P. Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains. *Nature*. 1991;349:175-178
- Nave KA, Lai C, Bloom FE and Milner RJ (1987) Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5665-5669
- Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Lofgren A, Vandenberghe A, Latour P, Le Guern E, Brice A, Mostacciuolo ML, Schiavon F, Palau F, Bort S, Upadhyaya M, Rocchi M, Archidiacono N, Mandich P, Bellone E, Silander K, Savontaus ML, Navon R, Goldberg-Stern H, Estivill X, Volpini V, Friedl W, Gal A, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet*. 1996;4:25-33
- Niemann A, Berger P, Suter U. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006;8:217-242
- Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis*. 1999;6:450-460
- Numakura C, Shirahata E, Yamashita S, Kanai M, Kijima K, Matsuki T, Hayasaka K. Screening of the early growth response 2 gene in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *J Neurol Sci*. 2003;210:61-64
- Pareyson D. Charcot-marie-tooth disease and related neuropathies: molecular basis for distinction and diagnosis. *Muscle Nerve*. 1999;22:1498-1509

- Pareyson D, Taroni F, Botti S, Morbin M, Baratta S, Lauria G, Ciano C, Sghirlanzoni A. Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology*. 2000;54:1696-1698
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P et al. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med*. 2004;10:396-401
- Patitucci A, Muglia M, Magariello A et al. Comparison of different techniques for detecting 17p12 duplication in CMT1A. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:488-492
- Perez-Olle R, Jones ST, Liem RK. Phenotypic analysis of neurofilament light gene mutations linked to Charcot-Marie-Tooth disease in cell culture models. *Hum Mol Genet*. 2004;13:2207-2220
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord*. 1991;1:93-97
- Raskind WH, Williams CA, Hudson LD and Bird TD (1991) Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *American Journal of Human Genetics* 49:1355-1360
- Regis S, Grossi S, Lualdi S, Biancheri R and Filocamo M (2005) Diagnosis of Pelizaeus-Merzbacher disease: detection of proteolipid protein gene copy number by real-time PCR. *Neurogenetics* 6:73-78
- Rowland JS, Barton DE, Taylor GR. A comparison of methods for gene dosage analysis in HMSN type 1. *J Med Genet*. 2001;38:90-95
- Saifi GM, Szigeti K, Wiszniewski W, Shy ME, Krajewski K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A, Reeser S, Mancias P, Butler I, Lupski JR. SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat*. 2005;25:372-383
- Seeman P, Mazanec R, Zidar J, Hrusakova S, Ctvrtickova M, Rautenstrauss B. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): reliable detection of the CMT1A duplication and HNPP deletion using 8 microsatellite markers in 2 multiplex PCRs. *Int J Mol Med*. 2000;6:421-426
- Seeman P, Paderova K, Benes V Jr. and Sistrerians EA (2002) A severe congenital form of Pelizaeus-Merzbacher disease in a Czech boy caused by a novel mutation (725C>A, Ala242Glu) at the 'jimpy(msd) codon' in the PLP gene. *International Journal of Molecular Medicine* 9:125-129

- Seeman P, Krsek P, Namestkova K, Malikova M, Belsan T, Proskova M (2003) Detection of the most frequent mutation of the proteolipid protein gene in Czech patients and families with the classic form of PMD. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 66 (2), 95-104 (article in Czech)
- Seeman P, Mazanec R, Huehne K et al. Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation. *Neurology*. 2004;63:733-735
- Seitelberger F (1970) Pelizaeus-Merzbacher disease. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds) *Handbook of clinical neurology*. North Holland, Amsterdam, pp 150-202
- Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurol*. 2002;1:110-118
- Sistermans EA, de Coo RF, De Wijs IJ and Van Oost BA (1998) Duplication of the proteolipid protein gene is the major cause of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 50:1749-1754
- Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*. 1974;6:98-118
- Slater H, Bruno D, Ren H et al. Improved testing for CMT1A and HNPP using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) with rapid DNA preparations: comparison with the interphase FISH method. *Hum Mutat*. 2004;24:164-171
- Street VA, Goldy JD, Golden AS, Tempel BL, Bird TD, Chance PF. Mapping of Charcot-Marie-Tooth disease type 1C to chromosome 16p identifies a novel locus for demyelinating neuropathies. *Am J Hum Genet*. 2002;70:244-250
- Street VA, Bennett CL, Goldy JD, Shirk AJ, Kleopa KA, Tempel BL, Lipe HP, Scherer SS, Bird TD, Chance PF. Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*. 2003;60:22-26
- Suter U, Moskow JJ, Welcher AA et al. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:4382-4386
- Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:714-726
- Thiel C, Huehne K, Hueffmeier U, Surmann C, Rauch A, Ekici AB, Reis A, Rautenstrauss B. Identification of an atypical duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A. In *GfH ÖGH SGMG Tagungsband*. 2003;p.330. http://www.gfhev.de/abstracts_kongresse/2003Abstracts.pdf
- Thiel CT, Kraus C, Rauch A, Ekici AB, Rautenstrauss B, Reis A. A new quantitative PCR multiplex assay for rapid analysis of chromosome 17p11.2-12 duplications and deletions leading to HMSN/HNPP. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:170-178

- Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, De Vriendt E, Lofgren A, Nelis E, Warner LE, Lupski JR, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology*. 1999;52:1827-1832
- Tooth H. The peroneal type of progressive muscular atrophy. London, England: Lewis, HK, 1886.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*. 1994;371:796-799
- User bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, December 11, 1997 (updated 10/2001) <http://www.appliedbiosystems.com>
- Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E, Brice A. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol*. 1996;39:813-817
- Vallat JM. Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:699-714
- Vance JM, Barker D, Yamaoka LH, Stajich JM, Loprest L, Hung WY, Fischbeck K, Roses AD, Pericak-Vance MA. Localization of Charcot-Marie-Tooth disease type 1a (CMT1A) to chromosome 17p11.2. *Genomics*. 1991;9:623-628
- Vandenberghe N, Upadhyaya M, Gatignol A, Boutrand L, Boucherat M, Chazot G, Vandenberghe A, Latour P. Frequency of mutations in the early growth response 2 gene associated with peripheral demyelinating neuropathies. *J Med Genet*. 2002;39:e81
- Vaurs-Barriere C, Bonnet-Dupeyron MN, Combes P, Gauthier-Barichard F, Reveles XT, Schiffmann R, Bertini E, Rodriguez D, Vago P, Armour JAL, Saugier-veber P, Frebourg T, Leach RJ and Boespflug-Tanguy O (2006) Golli-MBP copy number analysis by FISH, QMPFSF and MAPH in 195 patients with hypomyelinating leukodystrophies. *Annals of Human Genetics* 70(Pt 1):66-77
- Verhamme C, van Schaik IN, Koelman JH et al. Clinical disease severity and axonal dysfunction in hereditary motor and sensory neuropathy Ia. *J Neurol*. 2004;251:1491-1497
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet*. 1998;18:382-384
- Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1245-1251

- Wilke K, Duman B and Horst J (2000) Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Human Mutation* 16:431-436
- Willard HF, Riordan JR. Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science*. 1985;230:940-942
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WI, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY and Woodward KJ (2005) Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain* 128:743-751
- Woodward K, Kendall E, Vetrie D and Malcolm S (1998) Pelizaeus-Merzbacher disease: identification of Xq22 proteolipid-protein duplications and characterization of breakpoints by interphase FISH. *American Journal of Human Genetics* 63:207-217
- Woodward K, Cundall M, Palmer R, Surtees R, Winter RM and Malcolm S (2003) Complex chromosomal rearrangement and associated counseling issues in a family with Pelizaeus-Merzbacher disease. *American Journal of Medical Genetics A* 118:15-24
- Yamamoto M, Yoshihara T, Hattori N, Sobue G. Glu528del in NEFL is a polymorphic variant rather than a disease-causing mutation for Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *Neurogenetics*. 2004;5:75-77
- Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, Ishihara H, Misu K, Hattori N, Chihara K, Sobue G. A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type I. *J Neurol Sci*. 2001;184:149-153
- Yoshihara T, Yamamoto M, Hattori N, Misu K, Mori K, Koike H, Sobue G. Identification of novel sequence variants in the neurofilament-light gene in a Japanese population: analysis of Charcot-Marie-Tooth disease patients and normal individuals. *J Peripher Nerv Syst*. 2002;7:221-224
- Zhou L, Griffin JW. Demyelinating neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2003;16:307-313
- Zuchner S, Vorgerd M, Sindern E, Schroder JM. The novel neurofilament light (NEFL) mutation Glu397Lys is associated with a clinically and morphologically heterogeneous type of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord*. 2004;14:147-157
- Zuchner S, Vance JM. Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006;8:63-74

D VLASTNÍ PUBLIKACE

PŮVODNÍ PRÁCE V ČASOPISECH S IF (součet IF 7,838; VIZ PŘÍLOHY)

- Mikešová E, Baránková L, Sakmaryová I, Tatarková I, Seeman P. Quantitative multiplex real-time PCR for detection of *PLP1* gene duplications in Pelizaeus-Merzbacher patients. *Genetic Testing*. 2006 Fall;10(3):215-20. (IF₂₀₀₅ = 1,158)
- Mikešová E, Hühne K, Rautenstrauss B, Mazanec R, Baránková L, Vyhnálek M, Horáček O, Seeman P. Novel *EGR2* mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis. *Neuromuscular Disorders* 2005 Nov;15(11):764-7. Epub 2005 Sep 29. (IF₂₀₀₅ = 3,340)
- Baránková L, Vyhnálková E, Züchner S, Mazanec R, Sakmaryová I, Vondráček P, Merlini L, Bojar M, Nelis E, De Jonghe P, Seeman P. *GDAP1* mutations in Czech families with early onset CMT. *Neuromuscular Disorders* 2007 Jun;17(6):482-9. Epub 2007 Apr 11. (IF₂₀₀₅ = 3,340)

PŘEDNÁŠKY NA MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

- E. Mikešová, K. Hühne, B. Rautenstrauss, R. Mazanec, O. Horáček, P. Seeman. Early growth response 2 gene (*EGR2*) sequencing in 50 Czech CMT1 patients revealed a novel missense mutation Arg359Gln. (přednáška) in First European and North American Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting July 8-10, 2004, Antwerpen, Belgie
- E. Mikešová, L. Baránková, P. Seeman. Využití real-time PCR k detekci duplikací a delecí genu *PMP22* u pacientů s onemocněním Charcot-Marie-Tooth. (přednáška) XV. Izakovičov memoriál – Celoštátní konferencia lékařské genetiky s mezinárodní účastí, Nitra, SK, 23.-24. 9. 2004.

POSTERY NA MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

- E. Mikesova, I. Sakmaryova, L. Barankova, P. Seeman. **The use of real-time PCR for detection of proteolipid protein-1 gene (PLP1) copy number in Pelizaeus Merzbacher patients.** Abstracts of the European Human Genetics Conference 2005, Prague, 7.-10.5. 2005. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13,Suppl.1:282. (IF₂₀₀₅ = 3,251)
- E. Mikesova, L. Barankova, I. Sakmaryova, J. Posadka, P. Seeman. **Use of microsatellite analysis and quantitative real-time PCR in CMT1A/HNPP testing allows detection of CMT1A of atypical size.** Abstracts of the 10th Congree of the EFNS, Glasgow, UK, Sept. 2-5, 2006. *European Journal of Neurology*. 2006;13,Suppl.2:151. (IF₂₀₀₅ = 2,244)
- L. Baránková, R. Mazanec, E. Mikešová, I. Sakmaryová, P. Vondráček, S. Züchner, P. Seeman. **GDAP1 gene mutations in five Czech CMT families with early onset axonal HMSN.** *Procesings of Clinical Neurosciences, Torquay, Devon, 7-9 Sept. 2005, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2006; 77:126-142 (IF₂₀₀₅ = 3,122)
- E. Mikešová, L. Baránková, I. Tatarková, J. Posádka, P. Seeman. **Detection of two most common forms of inherited neuropathies Charcot-Marie-Tooth (CMT) using quantitative multiplex real-time CR.** In Final program and abstracts of the 4th European-American School in Forensic Genetics and Mayo Clinic Course in Advanced Molecular and Cellular Medicine, Dubrovnik, Croatia, September 5-9, 2005;p.137.
- P. Seeman, R. Mazanec, J. Haberlová, J. Milučká, O. Horáček, A. Kobesová, I. Sakmaryová, L. Baránková, E. Mikešová. **Connexin 32 gene (Cx32) mutatis are frequent in familiar and rare sporadic cases with Charcot-Marie-Tooth disease – results from 22 Czech CMTX1 families.** *in First European and North American Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting July 8-10, 2004, Antwerpen, Belgie*
- Hladikova E, Hadacova I, Koudova M, Mikesova E, Vilimova S, Spalova I, Brandejska M, Petrak B, Krutilkova V, Hejtmankova M, Anguelova I, Fialova M, Soldatova I, Macek M, Macek M. **The influence of FV-Leiden, FII-20210G -> A and 677C -> T MTHFR gene mutations on prenatal development, risk of deep venous thrombosis and ischemic stroke in Czech children/adult patients.** *European Journal of Human Genetics* 10: 188-188 Suppl. 1, May 2002. (IF₂₀₀₂ = 3,136)

PŘEDNÁŠKY NA NÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

- E. Mikešová, N. Suchá, P. Seeman. Využití **real-time PCR** k detekci duplikací a delecí na chromosomu 17p11.2-12 u pacientů s onemocněním **CMT1A/HNPP**. 7. Celostátní konference DNA diagnostiky, Lékařský dům Praha, 11.12.2003
- E. Mikešová, I. Sakmaryová, P. Seeman. Využití **real-time PCR** k detekci dávky genu **PLP1** u onemocnění **Pelizaeus-Merzbacher**. V. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky, Hradec Králové, 14.4.2004
- E. Mikešová, K. Hühne, B. Rautenstrauss, R. Mazanec, L. Baránková, O. Horáček, P. Smetana, P. Seeman. Sekvenování genu **EGR2** u 46 českých pacientů s **CMT1** odhalilo novou lissense mutaci **Arg359Gln**. 8. Celostátní konference DNA diagnostiky, Brno, 8.-9.12. 2004
- E. Mikešová, K. Hühne, B. Rautenstrauss, R. Mazanec, O. Horáček, P. Seeman. Výsledky sekvenování genu **EGR2** u českých pacientů s demyelinizační formou **CMT**. Studentská vědecká konference 2. LF UK, 28.4. 2005
- Mikešová E., Suchá N., Seeman P. Využití **real-time PCR** k detekci počtu kopií genu **PMP22** u pacientů s onemocněním **Charcot-Marie-Tooth (CMT1A a HNPP)**. Studentská vědecká konference 2. LF UK 2004
- Mikešová E., Baránková L., Tatarková I., Seeman P. Dvě nejčastější formy onemocnění **Charcot-Marie-Tooth (CMT1A a HNPP)** lze detekovat metodou **real-time PCR**. XX. české a slovenské dny mladých neurologů 2005, Hradec nad Moravicí, 12.-14.5.2005
- Posádka J., Sakmaryová I., Mikešová E., Seeman P., Rautenstrauss B., Huehne K., Zapke V. Charakterizace atypické přestavby v oblasti 17p11.2-12 s duplikací **PMP22** genu u rodiny s onemocněním **CMT1A**. Studentská vědecká konference 2. LF UK, 28.4. 2005
- L. Baránková, E. Mikešová, I. Sakmaryová, S. Züchner, R. Mazanec, M. Bojar, P. Seeman. Výsledky vyšetřování genu **GDAP1** u českých **CMT** pacientů s již vyloučenou nejčastější mutací. 8. Celostátní konference DNA diagnostiky, Brno, 8.-9.12. 2004
- L. Baránková, R. Mazanec, E. Mikešová, I. Sakmaryová, P. Vondráček, S. Züchner, P. Seeman. **GDAP1 gene mutations in five Czech CMT families with early onset axonal hereditary motor and sensory neuropathy. in New frontiers in the research of PhD students, Hradec Králové 2005, p. 17-19, ISBN:80-239-6102-0**

POSTERY NA NÁRODNÍCH KONFERENCÍCH

- Mikešová E., Baránková L., Seeman P. **Detekce dvou nejčastějších forem onemocnění Charcot-Marie-Tooth (CMT1A a HNPP) pomocí metody real-time PCR.** (*poster*) In ABSTRAKTA - 19. český a slovenský neurologický sjezd a 26. český a slovenský epileptologický sjezd, Brno, 30.11.–4.12.2004. SOLEN, Brno 2004, p.46.
- Posádka J., Mikešová E., Sakmaryová I., Seeman P. **Užití metody MLPA při diagnostice chorob CMT1A a HNPP.** (*poster*) Studentská vědecká konference 2. LF UK, 24.5.-25.5. 2006
- Mikešová E., Baránková L., Sakmaryová I., Seeman P. **Kvantitativní multiplexní real-time PCR k detekci duplikací genu PLP1 u pacientů s onemocněním Pelizaeus-Merzbacher.** (*poster*) Studentská vědecká konference 2. LF UK, 24. – 25.5. 2006
- L. Baránková, O. Horáček, E. Mikešová, R. Mazanec, P. Smetana, P. Seeman, M. Bojar. **Výsledky dotazníkového průzkumu mezi českými pacienty s chorobou Charcot-Marie-Tooth (HSMN) zaměřeného na průběh onemocnění, léčbu a její přínos.** (*poster*) In ABSTRAKTA - 19. český a slovenský neurologický sjezd a 26. český a slovenský epileptologický sjezd, Brno, 30.11.–4.12.2004. SOLEN, Brno 2004, p.46.

ZVANÉ SEMINÁŘE

- E. Mikešová: **Dědičné periferní neuropatie.** Katedra antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty UK v Praze, 19.4.2005
- E. Vyhnálková: **Využití kvantitativních real-time PCR k detekci počtu kopií genů PMP22 a PLP1.** Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK, 30.1.2007

V Praze, 3. 6. 2007

MUDr. Emílie Vyhnálková

E CURRICULUM VITAE

Emilie Vyhnálková (roz. Mikešová), MUDr.

Na Pasece 3

160 00 Praha 6

emilie.vyhnalkova@seznam.cz

narozena: 14.12.1977

ZAMĚSTNÁNÍ

od 2004

Klinika dětské neurologie 2. LF UK a FNM, vědecký pracovník,
sekundární lékař

VZDĚLÁNÍ

od 2003

PhD studium, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

1996 – 2003

2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

1993 (1 semestr)

Hunter College High School, New York, USA

1992 – 1996

Česko-anglické Gymnázium Nad Alejí, Praha 6

ODBORNÉ STÁŽE

Září 2006

Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander Universität
Erlangen-Nürnberg, stipendium Neuro Euro Nadace Charty 77

Září 2005 – Únor 2006

INSERM U 679 - Neurologie et thérapeutique expérimentale,
Skupina pro výzkum CMT, Hôpital Universitaire Pitié-
Salpêtrière, Paris, stipendium Francouzské vlády

Leden – Únor 2005

Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander Universität
Erlangen-Nürnberg, Laboratoř pro nervosvalová onemocnění,
stipendium Projektu mobilit Leonardo da Vinci

Březen – Duben 2004

Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander Universität
Erlangen-Nürnberg, Laboratoř pro nervosvalová onemocnění

1999 – 2002

Fakultní nemocnice Motol, Praha, Odd. biologie a lékařské
genetiky

GRANTY

2004-2006

Hlavní řešitel grantu GAUK (72/2004)

2004-2005

Koordinátor projektu Mobilit Leonardo da Vinci

(CZ/04/A/PL/134164) oceněného Pečetí kvality EU projektů 16.5.07

2004-2006

Spoluřešitel grantu IGA MZ (1A8254)

KLINICKÉ STÁŽE

Červenec 2002

Charité – KEH, Berlín, Chirurgická klinika

Srpen 2001

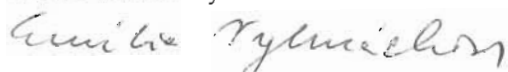
D. Eyluđ University hospital, Izmir, Turecko, Interní klinika

Březen 2001

Fakultní nemocnice Motol, Praha, Centrální dětský příjem

V Praze, 3.6.2007

MUDr. Emilie Vyhnálková



F PŘÍLOHY

1. Mikešová E, Hühne K, Rautenstrauss B, Mazanec R, Baránková L, Vyhnálek M, Horáček O, Seeman P. Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis. *Neuromuscular Disorders* 2005 Nov;15(11):764-7. Epub 2005 Sep 29. (IF₂₀₀₅ = 3,340)
2. Mikešová E, Baránková L, Sakmaryová I, Tatarková I, Seeman P. Quantitative multiplex real-time PCR for detection of *PLP1* gene duplications in Pelizaeus-Merzbacher patients. *Genetic Testing*. 2006 Fall;10(3):215-20. (IF₂₀₀₅ = 1,158)
3. Baránková L, Vyhnálková E, Züchner S, Mazanec R, Sakmaryová I, Vondráček P, Merlini L, Bojar M, Nelis E, De Jonghe P, Seeman P. *GDAP1* mutations in Czech families with early onset-CMT. *Neuromuscular Disorders* 2007 Jun;17(6):482-9. Epub 2007 Apr 11. (IF₂₀₀₅ = 3,340)



PERGAMON

Neuromuscular Disorders 15 (2005) 764–767



www.elsevier.com/locate/nmd

Case report

Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis

E. Mikešová^{a,*}, K. Hühne^b, B. Rautenstrauss^b, R. Mazanec^c, L. Baránková^c,
M. Vyhnálek^c, O. Horáček^d, P. Seeman^a

^aDepartment of Child Neurology, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, V Úvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

^bInstitut für Humangenetik der Universität Erlangen-Nürnberg, Schwabachanlage 10, D-91054 Erlangen, Germany

^cDepartment of Neurology, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, V Úvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

^dDepartment of Rehabilitation, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, V Úvalu 84, 15006 Prague, Czech Republic

Received 8 April 2005; received in revised form 25 July 2005; accepted 4 August 2005

Abstract

Mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) cause demyelinating neuropathies differing in severity and age of onset. We tested 46 unrelated Czech patients with dominant or sporadic demyelinating CMT neuropathy for mutations in the EGR2 gene. One novel de-novo mutation (Arg359Gln, R359Q) was identified in heterozygous state in a patient with a typical CMT1 phenotype, progressive moderate thoracolumbar scoliosis and without clinical signs of cranial nerve dysfunction. This patient is presently less affected compared to previously described Dejerine–Sottas neuropathy (DSN) patients carrying another substitution at codon 359 (Arg359Trp, R359W). This report shows that EGR2 mutations are rare in Czech patients with demyelinating type of CMT and suggests that different substitutions at codon 359 of EGR2 can cause significantly different phenotypes.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Peripheral neuropathy; Charcot-Marie-Tooth Disease; EGR2; HMSN Type I; Arg359Gln

1. Introduction

Hereditary motor and sensory neuropathies (HMSN) or Charcot–Marie–Tooth (CMT) diseases have been traditionally classified into more frequent demyelinating (CMT1 or HMSN I) and less frequent axonal (CMT2 or HMSN II) subtypes [1].

Mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) were reported to be rare causes of demyelinating HMSN including congenital hypomyelinating neuropathy (CHN), Dejerine–Sottas neuropathy (DSN) and demyelinating type of Charcot–Marie–Tooth disease—type 1 (CMT1) [1,2]. CMT1 caused by EGR2 mutations has been classified as CMT1D [1]. Only nine different pathogenic mutations and one silent mutation (polymorphism) have been reported in the EGR2 gene (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>).

Almost all the reported mutations are autosomal dominant or de novo heterozygous mutations, while only one was described to cause recessive CHN in homozygosis in a consanguineous family [2].

EGR2 encodes a zinc finger transcription factor [3] controlling early myelination of peripheral nerves. EGR2 is activated in the Schwann cells before the onset of myelination and its disruption blocks Schwann cells at an early stage of their differentiation [4].

The aim of this study was to establish the frequency of EGR2 mutations among Czech patients with demyelinating type of CMT and to extend our knowledge of CMT phenotype caused by EGR2 mutations.

2. Patients and methods

2.1. Patients

The study included 46 unrelated patients with demyelinating type of CMT. All were initially tested negative for the CMT1A duplication/HNPP deletion using a set of

* Corresponding author. Tel.: +420 224436816; fax: +420 224433322.
E-mail addresses: mikesova@yahoo.com (E. Mikešová).

13 microsatellite markers [5]. Mutations in the Cx32, MPZ, PMP22, SIMPLB and GDAP1 genes were excluded in some of the tested patients. Our selection criteria were: median motor NCV ≤ 40 m/s, dominant or sporadic occurrence of CMT in the family and age of onset before the age of 50.

2.2. Sequencing analysis

In all 46 patients, bidirectional direct sequencing of both coding exons of the EGR2 and flanking intron sequences was performed. Nine overlapping fragments were amplified by PCR using published primers [6]. PCR products were directly sequenced using the Big Dye Terminator V3.1 Kit and analyzed on the ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems, USA). The sequences were evaluated using SeqMan software (DNASTAR Inc., USA).

2.3. Restriction mutation analysis

Restriction enzyme BceAI (BioLabs Inc., USA) was used to test DNA samples of healthy controls for the occurrence of the Arg359Gln mutation.

2.4. Neurophysiology

All used neurophysiologic measurements performed according to standard procedures.

3. Results

3.1. DNA testing

We found one novel missense heterozygous mutation, c.1076G > A, predicting an aminoacid exchange Arg359Gln (R359Q). EGR2 mutation was detected in one of the 46 patients, thus representing approximately 2% of patients with non-duplicated demyelinating CMT.

The Arg359Gln mutation was not found in the parents and in the older sister of the patient who did not show any signs of peripheral neuropathy and have normal results in nerve conduction studies. Correct parentage of both parents was confirmed using a set of 10 microsatellite markers. This indicates that the mutation Arg359Gln originated de-novo.

Furthermore, the mutation was absent in 138 control chromosomes tested by restriction analysis with BceAI indicating that this variant is not a common polymorphism.

The previously described polymorphism c.1086A > C (Arg362Arg, R362R) [6–8] was additionally detected in heterozygous state in two of the 46 tested patients.

3.2. Clinical and electrophysiological features of the patient carrying the Arg359Gln mutation

The patient is now 17-years-old. She is the second child of healthy unrelated parents. Birth weight, postpartum

adaptation and early motor and intellectual development were all normal. No physical handicap was noticed until the age of 12.

At age 12.5, the patient showed recurrent ankle sprains, at age 13 she noticed an episode of weakness in her legs during sprinting and in the same period the family reported the first signs of gait disorder (shuffling type of gait). Bilateral pes cavus with hammer toe deformities and thoracolumbar scoliosis were detected on orthopedic examination. The progression of the gait disorder, the foot deformities and the scoliosis was fast in the first year after the onset of the symptoms, but then slowed down. Diagnosis of HMSN I was established at age 13 after detection of severe nerve conduction slowing in nerve conduction studies.

Neurological examination at age 17 showed no clinical signs of cranial nerve involvement. Muscle atrophies are mild and apparent only in the feet. We observed bilateral distal hypesthesia and mild distal muscle weakness of wrist flexors (4/5) and of extensor hallucis longus (4/5). The patient has bilateral pes cavus with restriction of maximum active (105°) and passive (90°) foot dorsiflexion (Fig. 1). She is unable to stand and walk on heels and has no evident signs of ataxia. Deep tendon reflexes were absent in all four extremities. She has moderate progressive thoracolumbar scoliosis with a right thoracic curve of 36° and a left lumbar curve of 24°. The lumbar curve progressed at 8° per past 18 months (Fig. 2). The patient has no respiratory problems at this moment.

Nerve conduction studies at age 17 showed overall slowing of motor and sensory nerve conduction velocities (MNCV, SNCV) (Table 1). The amplitudes of compound



Fig. 1. Lower limbs of the 17-years-old patient carrying the Arg359Gln mutation in EGR2. The picture shows bilateral pes cavus with hammer toes and minimal muscle atrophies. At age 15, varus of the left calcaneus was corrected surgically (op. sec. Steindler and Dwyer). The surgery improved the gait pattern and, therefore, a correction of the right foot deformity is planned.

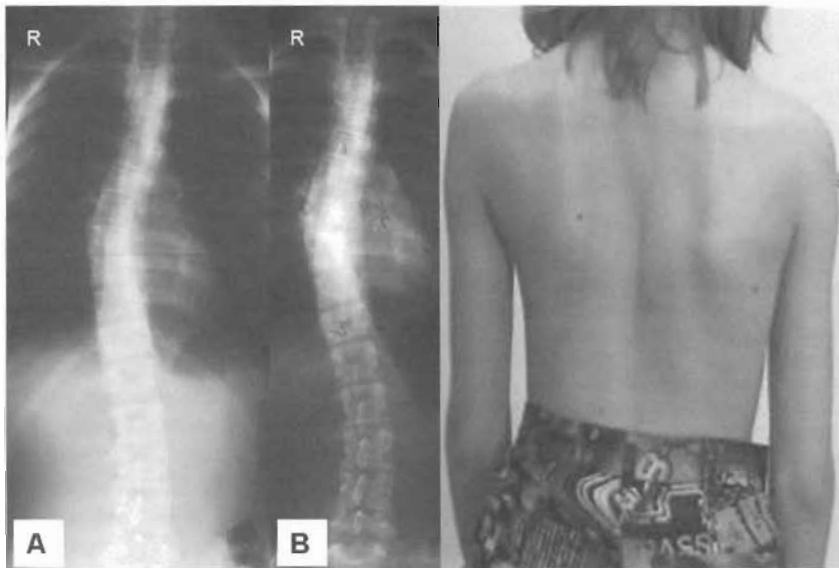


Fig. 2. AP radiographs and photograph of thoracolumbar scoliosis in the patient carrying the Arg359Gln mutation in EGR2. At age 15.5, she had a left lumbar curve of 16° (image A) and at the time of presentation (17 years), the lumbar deformity had progressed to 24° (image B). The thoracic curve of 36° did not show any progression in this period.

muscle action potentials and sensory nerve action potentials were at the lower limit of normal range in the upper limbs and significantly decreased or completely absent in the lower limbs (Table 1). Examination of the blink reflex showed demyelinating lesion of facial and trigeminal nerves. The wave latencies of the brain stem auditory evoked potentials (BAEP) and the visual evoked potentials (VEP) were normal. The CSF protein concentration was normal (310 mg/l).

4. Discussion

We show that mutations in EGR2 are very rare among Czech patients with demyelinating type of CMT. We examined 46 patients and found one novel missense mutation Arg359Gln. The number of EGR2 mutations found in our screening is similar to previous findings [2,6–9].

The age of onset and clinical phenotype in our patient carrying the Arg359Gln mutation is most compatible with

Table 1
Nerve conduction study in the patient carrying the R359Q mutation in EGR2 showing motor and sensitive primary demyelinating lesion

			Normal	Patient
Motor nerves	Median nerve	DML (ms)	≤4.0	8.9
		MNCV (m/s)	≥51	13
		Amplitude (mV)	≥4.2	5.2
	Ulnar nerve	F-wave (ms)	≤30	78.4
		DML (ms)	≤2.8	6.5
		MNCV (m/s)	≥50	11
	Peroneal nerve (m. tibialis ant.)	Amplitude (mV)	≥5.5	5.5
		F-wave (ms)	≤30	50.9
		DML (ms)	≤5.0	13.3
	Tibial nerve	MNCV (m/s)	≥39	16
		Amplitude (mV)	NA	2.5
		DML (ms)	≤5.5	14.3
Sensory nerves	Median nerve	MNCV (m/s)	≥40	9
		Amplitude (mV)	≥2.5	0.1
		SNCV (m/s)	≥48	16
	Ulnar nerve	Amplitude (uV)	≥10	5.0
		SNCV (m/s)	≥48	19
	Sural nerve	Amplitude (uV)	≥10	12
SNCV (m/s)		≥38	Not recordable	
		Amplitude (uV)	≥4.4	Not recordable

DML, distal motor latency; MNCV, motor nerve conduction velocity; SNCV, sensory nerve conduction velocity; NA, not available. Pathologic values are bold.

the classical CMT1 phenotype. The patient presented first signs of CMT1 and thoracolumbar scoliosis in her early teens. She shows marked slowing of nerve conduction velocities (NCVs), bilateral pes cavus with hammer toes deformities and very mild muscle atrophies. She shows no clinical signs of cranial nerve involvement.

In comparison with phenotypes caused by other EGR2 mutations, the age of onset and clinical manifestation in our patient resembles most closely to CMT1 phenotypes associated with the Asp355Val (sporadic case) and Arg409Trp (dominant CMT1 family) heterozygous substitutions in EGR2 [10,2]. Carriers of these mutations had very similar age of onset of CMT1 as our patient, but NCVs in our patient seem to be even more markedly reduced. Other two mutations in EGR2, both at codon 381, have been associated with CMT1 phenotype, but their phenotypes differ notably from the phenotype in our patient [11,12]. The carrier of the Arg381Cys heterozygous mutation had NCVs comparable with our patient but his age of onset of CMT was very late (59 years) [11]. The second mutation, Arg381His, was reported in heterozygous state in a family affected by severe CMT1 with a unique combination of cranial nerve deficits in one member [12]. It must be emphasized that another mutation at codon 359 of EGR2 (Arg359Trp, R359W) has been previously described in four patients with Dejerine–Sottas neuropathy [6,13,14]. They developed the first symptoms very early, their MNCV were below 8 m/s or undetectable and two of them died at a young age of respiratory failure. In three of them, clinical cranial nerve involvement was reported [6,13] and one of them developed severe thoracolumbar scoliosis [13]. Phenotype in our patient is undoubtedly milder. The Arg359Trp mutation was thought to consistently cause DSN, however, a recent study reports on two Arg359Trp carriers from a dominant CMT1 family [8,15]. Clinical findings in the patient described here further extend the knowledge of the phenotypic spectrum caused by EGR2 mutations.

The arginine residue 359 in EGR2 plays an essential role for DNA binding recognition and specificity [16] and the Arg359Trp mutation decreases DNA binding activity of EGR2 [17]. Different substitutions at codon 359 of EGR2 were found in patients with significantly different severity and age of onset indicating that the change to glutamine at codon 359 in our patient has probably less deteriorating effect on the EGR2 protein DNA binding than the change to tryptophan at this codon detected in DSN patients. Similarly at the codon 381 of EGR2, the phenotype of the Arg381Cys carrier was milder than that of the Arg381His carriers [7,11,12]. Multiple reports on changes at adjacent bases of codon 359 of EGR2 may reflect the presence of a mutation hot spot within EGR2 at this site of a CpG dinucleotide [13].

Mutations in EGR2 seem to occur frequently de novo and, therefore, patients with demyelinating type of CMT with sporadic occurrence should be included for EGR2 testing, although the probability of finding a causal mutation even in clinically carefully characterized cohort of patients seems to be generally very low.

Acknowledgements

This study was supported by the Czech Ministry of Health (grants IGA 1A8254 and MZO 00064203) and by the Charles University Prague (grant GAUK 72/2004 C).

References

- [1] Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(9):714–26.
- [2] Warner LE, Mancias P, Butler II, et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 1998;18(4):382–4.
- [3] Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with 'zinc-binding finger' structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(19):7164–8.
- [4] Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 1994;371(6500):796–9.
- [5] Seeman P, Mazanec R, Zidar J, Hrusakova S, Cvrteckova M, Rautenstrauss B. Charcot-marie-tooth disease type 1A (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): reliable detection of the CMT1A duplication and HNPP deletion using 8 microsatellite markers in 2 multiplex PCRs. *Int J Mol Med* 2000;6(4):421–6.
- [6] Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, et al. Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine–Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 1999;52(9):1827–32.
- [7] Vandenberghe N, Upadhyaya M, Gagnon A, et al. Frequency of mutations in the early growth response 2 gene associated with peripheral demyelinating neuropathies. *J Med Genet* 2002;39(12):e81.
- [8] Choi BC, Lee MS, Shin SH, et al. Mutational analysis of PMP22, MPZ, GJB1, EGR2 and NEFL in Korean charcot-marie-tooth neuropathy patients. *Hum Mutat* 2004;24(2):185–6.
- [9] Nishizawa C, Shirahata E, Yamashita S, et al. Screening of the early growth response 2 gene in Japanese patients with charcot-marie-tooth disease type 1. *J Neurol Sci* 2003;210(1–2):61–4.
- [10] Bellone E, Di Maria E, Soriani S, et al. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe charcot-marie-tooth type 1 disease. *Hum Mutat* 1999;14(4):353–4.
- [11] Yoshinara T, Kanda F, Yamamoto M, et al. A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset charcot-marie-tooth disease type 1. *J Neurol Sci* 2001;184(2):149–53.
- [12] Pareyson D, Taroni F, Botti S, et al. Cranial nerve involvement in CMT disease type 1 due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* 2000;54(8):1696–8.
- [13] Boerkoel CF, Takashima H, Bacina CA, Dacenti D, Lupski JR. EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine–Sottas neuropathy. *Neurogenetics* 2001;3(3):153–7.
- [14] Taroni F, Pareyson D, Botti S, Sghirlanzoni A, Nemmi R, Riva D. Mutations in the Schwann cell transcription factor EGR2/Krox20 in patients with severe hereditary demyelinating neuropathies. *Neurology* 1999;52(Suppl. 2):A258–A9.
- [15] Chung KW, Sunwoo IN, Kissa SM, et al. Two missense mutations of EGR2 R359W and GJB1 V136A in a charcot-marie-tooth disease family. *Neurogenetics* 2005;10 [Epub ahead of print].
- [16] Nardelli J, Gibson TJ, Vesque C, Charnay P. Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains. *Nature* 1991;349(6305):175–8.
- [17] Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 1999;8(7):1245–51.

GENETIC TESTING

Volume 10, Number 3, 2006

© Mary Ann Liebert, Inc.

Quantitative Multiplex Real-Time PCR for Detection of *PLP1* Gene Duplications in Pelizaeus–Merzbacher PatientsEMILIE MIKEŠOVÁ,¹ LUCIA BARÁNKOVÁ,² IVA SAKMARYOVÁ,¹ IVA TATARKOVÁ,¹
and PAVEL SEEMAN¹

ABSTRACT

Pelizaeus–Merzbacher disease (PMD) is an X-linked recessive disorder of central nervous system (CNS) myelination typically affecting males. A genomic duplication of variable size at Xq22.2, containing the entire proteolipid protein 1 gene (*PLP1*), is responsible for approximately 60–70% of PMD cases. The aim of this study was to develop a rapid and robust method for determination of *PLP1* gene dosage. We optimized two multiplex real-time quantitative PCR (Q-PCR) assays targeting exons 3 and 6 of the *PLP1* gene, and then validated these assays by retrospective analysis of a set of genomic DNAs from 67 previously tested patients and 43 normal controls. Samples were analyzed in multiplex PCR reactions using TaqMan chemistry and the ABI Prism 7000 Sequence Detection System. *PLP1* dosage was determined by the relative quantitative comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta Ct$) using the human serum albumin gene as the endogenous reference gene. Three clearly non-overlapping ranges of results, corresponding to the presence of one, two, or three *PLP1* copies, were detected in both assays. The results were completely concordant with gender and previous *PLP1* gene dosage testing based on quantitative fluorescent multiplex PCR and analysis of a dinucleotide polymorphism in the first intron of the *PLP1* gene. We conclude that multiplex real-time Q-PCR represents a fast and reliable tool for *PLP1* duplication testing in PMD families.

INTRODUCTION

PELIZAEUS–MERZBACHER DISEASE (PMD) (OMIM #312080) and its allelic disorder spastic paraplegia type 2 are X-linked dysmyelinating disorders of the central nervous system (CNS) caused by mutations involving the proteolipid protein 1 gene (*PLP1*) (Willard and Riordan, 1985; Hudson *et al.* 1989). The *PLP1* gene maps to chromosome Xq22.2, spans an ~17-kb genomic interval, and has seven coding exons (Inoue 2005). The *PLP1* gene encodes two major components of CNS myelin proteins, the integral membrane protein *PLP1* and its spliced isoform DM20 (Nave *et al.* 1987).

PMD typically affects males; carrier females usually show no clinical signs of the disease. PMD is traditionally classified according to disease severity (Seitelberger 1970). The more frequent classic form of PMD presents initially with nystagmus, psychomotor delay, and hypotonia; the patient then develops progressive spasticity and cerebellar ataxia (Bouloche and

Aicardi 1986). The rarer and more severe congenital form of PMD shows no psychomotor development and is usually fatal in infancy.

PMD can be caused by distinct types of *PLP1* gene point mutations (Garbern *et al.* 1999) and rarely by deletions involving the *PLP1* gene (Raskind *et al.* 1991), but by far the most frequent cause of PMD (~60–70%) is a genomic duplication at Xq22 containing the entire *PLP1* gene (Sistermans *et al.* 1998; Woodward *et al.* 1998; Inoue *et al.* 1999). Increased dosage of *PLP1*, leading to overexpression of the *PLP1*/DM20 proteins and to myelin deficiency, represents the major underlying cause of PMD (Ellis and Malcolm 1994; Inoue 2005).

PMD patients carrying a *PLP1* duplication present with the classic form of PMD and their phenotype is often milder than that in patients with a *PLP1* point mutation (Inoue *et al.* 1999; Seeman *et al.* 2002; Seeman *et al.* 2003). Despite this general correlation, reliable prediction of genotype based purely on clinical findings is not possible due to a large overlap in the sever-

¹Department of Child Neurology, DNA Laboratory, and ²Department of Neurology, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, Prague, Czech Republic.

ity of symptoms in patients with different genotypes (Inoue 2005). For this reason, the majority of patients with clinical suspicion for PMD and suspected carrier females are initially tested for the most frequent cause of PMD, which is *PLP1* duplication. Detection of genomic tandem duplications of very variable extent is a challenge for molecular genetic as well as molecular cytogenetic methods. Several diagnostic methods have been proposed including quantitative Southern blotting, quantitative PCR, and interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (reviewed in Inoue 2005). Recently, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), multiplex amplifiable probe hybridization assay (MAPH), and real-time PCR have been published as alternatives to the current diagnostic approaches (Gao *et al.* 2005; Hübner *et al.* 2005; Regis *et al.* 2005; Wolf *et al.* 2005; Combes *et al.* 2006).

Clinicians often demand rapid turnaround for PMD testing in small babies, including newborns. The diagnostic approach based on quantitative fluorescent multiplex PCR (QFM-PCR), which we are currently using, has relatively low throughput, is time consuming, and frequently the reactions have to be repeated. For these reasons, we needed to establish another method for rapid and reliable detection of *PLP1* duplication. We decided to try real-time quantitative PCR (Q-PCR) because it is becoming frequently used for quantification of nucleic acids and is very rapid (Heid *et al.* 1996; Aarskog and Vedeler 2000; Wilke *et al.* 2000; Thiel *et al.* 2003; Regis *et al.* 2005). We optimized two multiplex Q-PCR assays at two nonadjacent exons located on the opposite sides of the *PLP1* gene, and then we validated these assays.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Altogether, 110 gDNA reference samples with known *PLP1* gene copy number were used for validation of two multiplex assays targeted at exon 3 or at exon 6. Initially, 67 individuals previously referred to our laboratory for molecular studies of PMD were tested. This group included 12 clinically and genetically diagnosed PMD patients (2 *PLP1* copies), 19 carrier females (3 *PLP1* copies), 15 healthy males (1 *PLP1* copy), and 21 healthy females who were relatives of PMD patients (2 *PLP1* copies). All 67 individuals were tested using two QFM-PCR reactions: the first co-amplifying exon 4 of *PLP1* and exon 4

of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, and the second co-amplifying exon 4 of *PLP1* and exon 48 of the dystrophin gene (Woodward *et al.* 1998; Mimault *et al.* 1999; Seeman *et al.* 2003). Furthermore, all samples were tested using microsatellite analysis of a dinucleotide polymorphism (CA repeat) within the first intron of *PLP1* (Mimault *et al.* 1995). In patients with detected *PLP1* duplication, analysis of three microsatellite markers flanking *PLP1* (DXS1106, DXS8096, and DXS1191) was performed to evaluate the duplication size (Woodward *et al.* 2003).

Both real-time PCR assays were further evaluated on 43 control samples of unrelated healthy individuals who were not previously tested for *PLP1* duplication (24 unrelated healthy females and 19 unrelated healthy males tested by the *PLP1* exon 3 assay; 23 healthy females and 20 healthy males tested by the *PLP1* exon 6 assay).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen GmbH).

Materials

TaqMan primers and probes were designed using the Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems, USA). Their sequences were verified using the nucleotide-nucleotide blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and were purchased from Applied Biosystems (ABI). The human serum albumin gene (*HSA*) was used as the endogenous control gene in both assays (Thiel *et al.* 2003). The TaqMan probe for *HSA* exon 12 contained a fluorophore 5'-VIC as reporter and 3'-TAMRA as quencher. Both probes for *PLP1* exon 3 and exon 6 contained 5'-FAM as reporter and a nonfluorescent quencher. Sequences of primers and probes used in the study are described in Table 1.

Real-time PCR reaction

Initially, a pilot study optimizing primer and probe concentration was performed, and identical parameters and reaction conditions were set for both assays. Samples were run in triplicate in a multiplex PCR reaction on the ABI Prism 7000 instrument (ABI). The final reaction volume was 20 μ l in each well. PCR reaction mixes used in both assays were identical, except for the *PLP1* primers and probes, and consisted of (final concentrations): 1 \times qPCR Mastermix (Eurogentec, Belgium), 750 nM each *HSA* primer and 750 nM each *PLP1* (exon 3 or 6) primer, 100 nM *HSA* TaqMan probe, and 100 nM *PLP1* (exon 3 or 6) TaqMan probe. The input amount of gDNA used in each well was 50–100 ng. The total amount of DNA intended

TABLE 1. PRIMERS AND TAQMAN PROBES FOR HUMAN SERUM ALBUMIN GENE (*HSA*) EXON 12, PROTEOLIPID PROTEIN 1 GENE (*PLP1*) EXON 3, AND *PLP1* EXON 6 USED IN REAL-TIME PCR MULTIPLEX ASSAYS

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	TaqMan probe
<i>HSA</i> exon 12	TGTTGCATGAGAAAACGCCA	GTCGCCTGTTACCAAGGAT	5'-VIC-AAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGG-TAMRA-3'
<i>PLP1</i> exon 3	GGCGCAGTCAGGCAGATC	CCCTTGCCGCAGATGGT	5'-6-FAM-TTGGCGACTACAAGAC-MGB-3'
<i>PLP1</i> exon 6	TCCAAATGACCTTCCACCTGTT	CTTGCCAAGATCATTCAAAGTCAAC	5'-6-FAM-TACACTGGTTTCCCTGGTG-MGB-3'

for all three triplicates was diluted overnight in 9 μ l of H₂O and mixed with 57 μ l of the reaction mix. Tubes were mixed thoroughly, and three aliquots of 20 μ l each were dispensed into the 96-well optical reaction plate using an automated pipette. Plates were covered with an optical adhesive cover (ABI) and centrifuged briefly at 4500 rpm.

Thermal cycling conditions included a pre-run of 2 min. at 50°C and 10 min at 95°C, then 45 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C (TaqMan Universal PCR Protocol, ABI).

In each plate, DNA from a healthy male (1 *PLP1* copy) was analyzed and used as the calibrator sample for data evaluation using the $\Delta\Delta C_t$ method. Each reaction plate was further validated using four control samples (one PMD patient, one healthy related female, one healthy related male, and one *PLP1* duplication carrier female).

Data analysis

Q-PCR is based on measurement of C_t values during the exponential phase of amplification. The C_t parameter is defined as the cycle number at which the amplification plot passes a fixed threshold. The threshold for calculation of C_t was automatically set at 10 SD above the mean baseline fluorescence and in most experiments was manually adjusted within the logarithmic phase of the amplification plot.

Data evaluation was performed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System and the RQ software (ABI). *PLP1* copy number was determined by the relative quantitative comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta C_t$) using HSA as the endogenous control gene (Thiel *et al.* 2003; ABI PRISM User Bulletin # 2). The $\Delta\Delta C_t$ method normalizes the detected fluorescent signal to an endogenous reference gene and subsequently compares target signals in different samples to a calibrator sample. The amount of target is given by $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = [C_t \text{ albumin (calibrator sample)} - C_t \text{ PLP1 (calibrator sample)}] - [C_t \text{ albumin (patient sample)} - C_t \text{ PLP1 (patient sample)}]$ (ABI PRISM User Bulletin # 2).

The relative difference between samples is calculated and the resulting value therefore represents a ratio of *PLP1* gene

copy number between the specimen under study and the calibrator. Considering that the calibrator is a normal male DNA with 1 *PLP1* gene copy per cell, this ratio is simply the number of *PLP1* gene copies per cell in the patient specimen.

RESULTS

The purpose of this work was to develop and validate a rapid method for the diagnosis of the most common mutation in the *PLP1* gene that causes PMD, a duplication of the entire gene. We optimized two Q-PCR methods, both based upon Taqman chemistry with a multiplexed endogenous control gene. In both assays, the triplicates showed very good overlap of parallel amplification plots for both reporter dyes (FAM and VIC). Typical examples of amplification plots for a healthy male, PMD patient, healthy female, and carrier female are given in Fig. 1.

After processing the data as described in Materials and Methods, the assay gives the number of *PLP1* gene copies per cell. In both assays, three well-separated clusters of *PLP1* copy number results, corresponding to groups of samples with expected results of one, two, and three *PLP1* copies, were clearly distinguishable, widely spaced, and allowed reliable differentiation of tested samples (Fig. 1). All 110 specimens gave results consistent with their expected genotype known from previous analysis or their gender combined with their status as a normal control. For the exon 3 assay, this included 19 specimens with three copies, 57 with two copies, and 34 with one copy. For the exon 6 assay, this included 19 with three copies, 56 with two copies, and 35 with one copy.

The ranges detected for one, two, and three *PLP1* copies in assay A were 0.87–1.19, 1.85–2.23, and 2.86–3.32; the ranges detected in assay B were 0.92–1.16, 1.80–2.21, and 2.86–3.25. Figure 2 and Table 2 summarize the ranges of results obtained for each group of samples in both assays, their means, SD, and the coefficients of variation (CV). The mean values of *PLP1* copy number obtained in both Q-PCR assays approximate very well the expected values. Ranges used for subsequent diagnosis

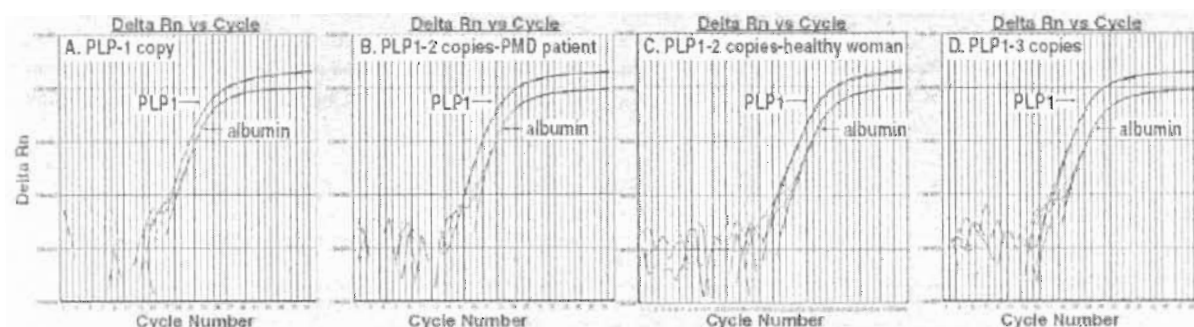


FIG. 1. Amplification plots of exon 6 of *PLP1* and exon 12 of the *HSA* gene in a single-tube multiplex real-time Q-PCR assay. The ΔRn value represents the normalized reported fluorescence emission as the reporter dye is released from the TaqMan probe. Typical amplification curves for: A: a normal healthy male (1 *PLP1* copy); B: PMD patient (2 *PLP1* copies); C: healthy female (2 *PLP1* copies); and D: carrier female (3 *PLP1* copies). In comparison to the standard amplification plots for the PMD patient (B) and healthy female (C), note a shift of the *PLP1* amplification plot to the right for the normal healthy male (A), and a shift to the left for the *PLP1* duplication carrier female (D), resulting in a decreased and increased *PLP1* copy number value, respectively.

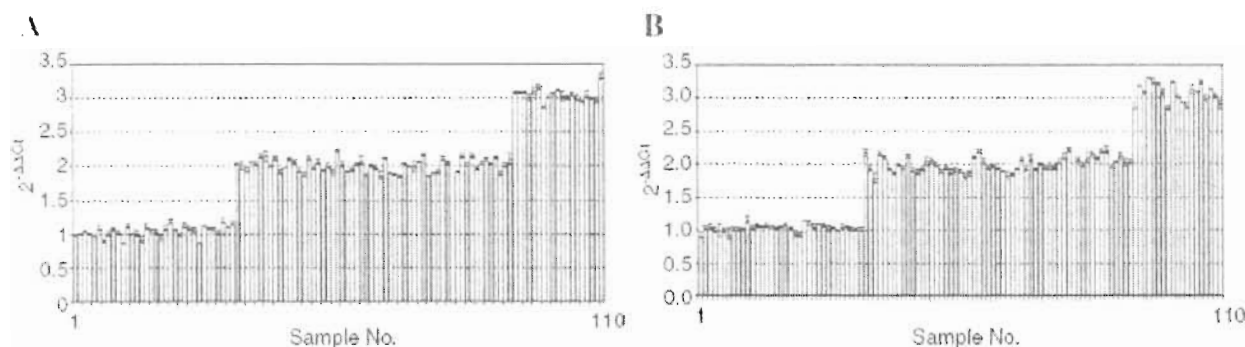


FIG. 2. Mean results ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ values) and standard errors detected for 110 samples with known genotype in the assay for exon 3 of *PLP1* (A) and in the assay for exon 6 of *PLP1* (B). In both assays, non-overlapping ranges of *PLP1* gene copy number for samples with one, two, and three *PLP1* copies were detected. From left to right: healthy males with one *PLP1* copy; healthy females and male PMD patients with 2 copies; female duplication carriers with three *PLP1* copies.

tic testing of *PLP1* copy number were set according to the distribution of results shown in Table 2.

DISCUSSION

In this study we optimized and evaluated two multiplex real-time Q-PCR assays targeted at two nonadjacent exons in the *PLP1* gene using a set of reference DNA samples. Diagnostic ranges were established for quantification of *PLP1* gene copy number in putative PMD patients.

Results given by both assays allowed reliable and easy discrimination of samples with one, two, and three *PLP1* copies. Both assays gave consistent results indicating comparable value in testing of PMD caused by prevalent duplications encompassing the whole *PLP1* gene. Both assays were successfully performed under identical conditions.

The multiplex real-time Q-PCR method shows several advantages in comparison with other routinely used methods. Our Q-PCR method is fast and has reasonably high throughput; 25 samples can be analyzed in 2 h. Unlike other quantitative PCR methods, such as QFM-PCR, comparative multiplex PCR, and quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments, the

real-time method does not require handling of PCR products, which reduces the potential for contamination of future reactions (Inoue *et al.* 1996; Woodward *et al.* 1998; Mimault *et al.* 1999; Vaurs-Barriere *et al.* 2006).

Interphase FISH has been widely used for PMD testing, including prenatal diagnosis (reviewed by Inoue 2005). However, FISH is more labor-intensive and time-consuming than real-time PCR. In addition, FISH is reported to have limited efficiency in detecting more than two *PLP1* copies (Woodward *et al.* 1998; Wolf *et al.* 2005).

Recently, two novel techniques, MLPA and MAPH, were proposed for reliable *PLP1* dosage testing, allowing detection of small intragenic *PLP1* rearrangements (demonstrated for MAPH) and detection of three or more *PLP1* copies (demonstrated for MLPA) (Vaurs-Barriere *et al.*, 2006; Wolf *et al.* 2005; Combes *et al.* 2006). The detection of partial rearrangements using a single real-time Q-PCR is limited. However, parallel testing of two nonadjacent exons of *PLP1* (as shown in this study) increases the chance for detection of possible *PLP1* intragenic rearrangements and thus provides an evaluation of the gene integrity performed in much shorter time. The reliability of real-time Q-PCR for detection of more than three *PLP1* copies has not yet been illustrated. However, one could expect

TABLE 2. RESULTS FROM TWO MULTIPLEX REAL-TIME Q-PCR ASSAYS FOR EXON 3 AND 6 OF THE *PLP1* GENE

	Subjects ^a	Mean \pm SD ^b	Range	CV ^b
<i>PLP1</i> exon 3				
Healthy males	34	1.04 \pm 0.08	0.87–1.19	7.69
PMD patients	12	2.05 \pm 0.09	1.92–2.16	4.26
Healthy females	45	2.00 \pm 0.09	1.85–2.23	4.72
Carrier females	19	3.05 \pm 0.09	2.86–3.32	3.08
<i>PLP1</i> exon 6				
Healthy males	35	1.03 \pm 0.05	0.92–1.16	5.08
PMD patients	12	2.09 \pm 0.08	1.96–2.21	3.69
Healthy females	44	1.98 \pm 0.11	1.80–2.20	5.37
Carrier females	19	3.08 \pm 0.14	2.86–3.25	4.60

^aNumber of specimens each from a different individual tested in triplicate.

^bSD, standard deviation; CV, coefficient of variation expressed as a percent.

appropriate elevation in resulting ratios corresponding to the number of target *PLP1* copies. MLPA is an inexpensive and reliable technique, but a great advantage of real-time PCR is its much shorter time-to-result (2 days for MLPA vs. 2 h for real-time PCR).

Recently, two real-time PCR assays for detection of *PLP1* gene copy number based on the standard curve method have been reported (Gao *et al.* 2005; Regis *et al.* 2005). In these assays, amplification of the target (*PLP1*) and an autosomal reference gene is performed in separate tubes and each run requires analysis of a set of standard samples for construction of the standard curve. The resulting throughput is limited compared to a multiplex assay employing the $\Delta\Delta C_t$ method (analysis of 11 vs. 25 specimens in each run) (Regis *et al.* 2005). Detection of a *PLP1* deletion was demonstrated in one study (Gao *et al.* 2005). In another study, a real-time PCR employing SYBR-Green PCR chemistry was used for detection of *PLP1* duplication (Hübner *et al.* 2005).

As mentioned above, *PLP1* duplication leads to overexpression of the *PLP1/DM20* proteins and myelin deficiency by a gene dosage effect. This makes PMD parallel to the two major types of Charcot-Marie-Tooth hereditary neuropathies (CMT1A and HNPP) caused by duplications and deletions of another dosage-sensitive gene, peripheral myelin protein 22 gene (Lupski 1997). Real-time PCR, based both on the standard curve method and the $\Delta\Delta C_t$ method, was shown to be very effective and has found its way into routine CMT1A and HNPP testing (Aarskog and Vedeler 2000; Thiel *et al.* 2003).

Multiplex real-time PCR represents the fastest and probably easiest of all proposed methods for PMD testing. Our results demonstrate the efficiency, robustness, and versatility of multiplex real-time Q-PCR in *PLP1* copy number detection in Pelizaeus-Merzbacher patients as well as in carrier females. Therefore, this method could be a useful diagnostic tool for detection of the most common *PLP1* mutation in PMD patients and their families.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Grant Agency of the Charles University Prague (GAUK) grant 72/2004/C/2-LF and by the Czech Ministry of Health grant MZO 00064203. We would like to thank Dr. C. T. Thiel for his contribution to the initial pilot study.

REFERENCES

- Aarskog NK, Vedeler CA (2000) Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 107:494-498.
- ABI PRISM User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, December 11, 1997 (updated 10/2001) <http://www.applied-biosystems.com>.
- Bouloche J, Aicardi J (1986) Pelizaeus-Merzbacher disease: clinical and nosological study. *J Child Neurol* 1:233-239.
- Combes P, Bonnet-Dupeyron MN, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Bertin E, Rodriguez D, Armour JA, Boespflug-Tanguy O, Vaurio Barriere C (2006) *PLP1* and GPM6B intragenic copy number analysis by MAPH in 262 patients with hypomyelinating leukodystrophies: identification of one partial triplication and two partial deletions of *PLP1*. *Neurogenetics* 7:31-37.
- Ellis D, Malcolm S (1994) Proteolipid protein gene dosage effect in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat Genet* 6:333-334.
- Gao Q, Thurston VC, Vance GH, Dlouhy SR, Hodes ME (2005) Genetic diagnosis of PLP gene duplications/deletions in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Clin Genet* 68:466-467.
- Garbern J, Cambi F, Shy M, Kamholz J (1999) The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Arch Neurol* 56:1210-1214.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994.
- Hübner CA, Orth U, Senning A, Steglich C, Kohlschütter A, Korntzenberg R, Gal A (2005) Seventeen novel *PLP1* mutations in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mutat* 25:321-322.
- Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J, Gencic S (1989) Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8128-8131.
- Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* 6:1-16.
- Inoue K, Osaka H, Sugiyama N, Kawanishi C, Onishi H, Nezu A, Kimura K, Yamada Y, Kosaka K (1996) A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *Am J Hum Genet* 59:32-39.
- Inoue K, Osaka H, Imazumi K, Nezu A, Takanashi J, Ariti J, Murayama K, Ono J, Kikawa Y, Mito T, Shaffer LG, Lupski JR (1999) Proteolipid protein gene duplications causing Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular mechanism and phenotypic manifestations. *Ann Neurol* 45:624-632.
- Lupski JR (1997) Charcot-Marie-Tooth disease: a gene-dosage effect. *Hosp Prac (Off Ed)* 32(5):83-84,89-91,94-85 passim.
- Mimault C, Cailloux F, Giraud G, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (1995) Dinucleotide repeat polymorphism in the proteolipoprotein (*PLP*) gene. *Hum Genet* 96:236.
- Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B, Boespflug-Tanguy O (1999) Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. The Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. *Am J Hum Genet* 65:360-369.
- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ (1987) Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5665-5669.
- Raskind WH, Williams CA, Hudson LD, Bird TD (1991) Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Hum Genet* 49:1355-1360.
- Regis S, Grossi S, Luaili S, Biancheri R, Filocamo M (2005) Diagnosis of Pelizaeus-Merzbacher disease: detection of proteolipid protein gene copy number by real-time PCR. *Neurogenetics* 6:73-78.
- Seeman P, Paderova K, Benes V Jr, Siermans EA (2002) A severe congenital form of Pelizaeus Merzbacher disease in a Czech boy caused by a novel mutation (725C>A, Ala242Glu) at the 'jimpymsd' codon in the PLP gene. *Int J Mol Med* 9:125-129.
- Seeman P, Krsek P, Namestikova K, Malikova M, Belsan T, Proskova M (2003) Detection of the most frequent mutation of the proteolipid protein gene in Czech patients and families with the classic form of PMD. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 66:95-104 (article in Czech).

- Seitelberger F (1970) Pelizaeus-Merzbacher disease. In: Vinken PJ, Bruyn GW (eds) *Handbook of clinical neurology*. North Holland, Amsterdam, pp 150–202.
- Sistermans EA, de Coo RF, De Wijs JJ, Van Oost BA (1998) Duplication of the proteolipid protein gene is the major cause of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurology* 50:1749–1754.
- Thiel CT, Kraus C, Rauch A, Ekici AB, Rautenstrauss B, Reis A (2003) A new quantitative PCR multiplex assay for rapid analysis of chromosome 17p11.2–12 duplications and deletions leading to HMSN/HNPP. *Eur J Hum Genet* 11:170–178.
- Vaurs-Barriere C, Bonnet-Dupeyron MN, Combes P, Gauthier-Barichard F, Reveles XT, Schiffmann R, Bertini E, Rodriguez D, Vago P, Armour JAL, Saugier-Verber P, Frebourg T, Leach RJ, Boespflug-Tanguy O (2006) Goli-MBP copy number analysis by FISH, QMPSF and MAPH in 195 patients with hypomyelinating leukodystrophies. *Ann Hum Genet* 70(Pt 1):66–77.
- Wilke K, Duman B, Horst J (2000) Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat* 16:431–436.
- Willard HF, Riordan JR (1985) Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* 230:940–942.
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WI, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY, Woodward KJ (2005) Three or more copies of the proteolipid protein gene *PLP1* cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain* 128:743–751.
- Woodward K, Kendall E, Vetrie D, Malcolm S (1998) Pelizaeus-Merzbacher disease: identification of Xq22 proteolipid-protein duplications and characterization of breakpoints by interphase FISH. *Am J Hum Genet* 63:207–217.
- Woodward K, Cundall M, Palmer R, Surtees R, Winter RM, Malcolm S (2003) Complex chromosomal rearrangement and associated counseling issues in a family with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet A* 118:15–24.

Address reprint requests to:

Emilie Mikešová, M.D.

Department of Child Neurology—DNA Laboratory

2nd School of Medicine

Charles University Prague

V Úvalu 84

15006 Prague 5, Czech Republic

E-mail: emilie.mikesova@seznam.cz



PERGAMON

Neuromuscular Disorders xxx (2007) xxx–xxx



www.elsevier.com/locate/nmd

GDAP1 mutations in Czech families with early-onset CMT

L. Baránková^{a,*}, E. Vyhnálková^b, S. Züchner^c, R. Mazanec^a, I. Sakmaryová^b,
P. Vondráček^d, L. Merlini^e, M. Bojar^a, E. Nelis^f, P. De Jonghe^f, P. Seeman^b

^a Department of Neurology, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

^b Department of Child Neurology, 2nd School of Medicine, Charles University Prague, Prague, Czech Republic

^c Center for Human Genetics, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA

^d Department of Child Neurology, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

^e Department of Experimental & Diagnostic Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy

^f Molecular Genetics Department, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Received 15 October 2006; received in revised form 15 February 2007; accepted 16 February 2007

Abstract

Mutations in the *ganglioside-induced differentiation associated protein-1* gene (*GDAP1*) cause autosomal recessive (AR) demyelinating or axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT). In order to establish the spectrum and frequency of *GDAP1* mutations in Czech population, we sequenced *GDAP1* in 74 Czech patients from 69 unrelated families with early-onset demyelinating or axonal CMT compatible with AR inheritance. We identified three isolated patients with *GDAP1* mutations in both alleles. In one additional sporadic and one familial case, the second pathogenic mutation remained unknown. Overall, we detected two different mutations, a novel R191X nonsense and a L239F missense mutation. L239F previously described in a German–Italian family is a prevalent mutation in Czech population and we give evidence for its common ancestral origin. All Czech *GDAP1* patients developed involvement of all four limbs evident by the end of second decade, except for one isolated patient showing very slow disease progression. All patients displayed axonal type of neuropathy.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HMSN type II; Charcot-Marie-Tooth disease; Autosomal recessive CMT2; *GDAP1*; R191X; L239F

1. Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is a hereditary disorder of the peripheral nervous system characterized by progressive distal limb weakness, muscle atrophy and sensory loss, maximal in the lower extremities. Based on electrophysiological and histopathological findings, two CMT types are distinguished. The demyelinating type or CMT1 is characterized by the median nerve motor conduction velocity reduced below 38 m/s, demyelination and onion bulb formation in nerve biopsies. In the axonal

type CMT2 nerve conduction velocities are normal or slightly reduced and nerve biopsies show axonal loss [1,2]. CMT1 and CMT2 are further sub-classified according to inheritance pattern (autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), or X-linked) and the underlying molecular genetic cause [3].

Mutations in the *ganglioside-induced differentiation associated protein-1* (*GDAP1*) gene were originally reported in four AR Tunisian families with demyelinating neuropathy (CMT4A) and simultaneously by a different research group in three Spanish families diagnosed with AR axonal neuropathy and vocal cord paresis [4,5]. So far more than 20 different *GDAP1* mutations have been described (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>) to cause severe early-onset AR neuropathy [6–13].

* Corresponding author. Tel.: +420 224436800; fax: +420 224436820.

E-mail address: lbaranek@email.cz (L. Baránková).

The protein encoded by *GDAP1* shows similarity to glutathione-*S*-transferases (GST), enzymes involved in cellular antioxidative pathways [4,5,14]. Additionally, its localisation in neuronal mitochondrial membranes has been demonstrated and a role of mitochondrial dysfunction in the disease pathogenesis has been suggested [15].

We report the frequency, spectrum and phenotypic expression of *GDAP1* mutations in Czech CMT patients. We further give evidence for common ancestral origin of each mutation.

2. Patients and methods

2.1. Patients

Seventy-four patients from 69 unrelated Czech CMT families were screened for mutations in *GDAP1*. All selected families had pedigrees compatible with AR inheritance, i.e. the patients were either affected siblings born to healthy parents based on family history (nine families) or more often isolated cases. Consanguinity was not reported for any of the families. All the patients presented with the first neuropathy symptoms in the first decade. Both axonal (32 families) and demyelinating (37 families) CMT types were included. All patients were previously tested negative for CMT1A and 42 families (61%) also for mutations in *MPZ* and/or *Cx32* genes (37 families (54%) were examined for *MPZ* and 24 (35%) for *Cx32* gene).

2.2. Molecular studies

All six coding exons and intron–exon boundaries of *GDAP1* were PCR amplified using primers as described previously [4,5]. Purified PCR products (Exo I, SAP, Fermentas, Lithuania) were directly sequenced using four dye terminator chemistry (BigDye Terminator v3.1, ABI, USA) and analysed on an ABI 3100 capillary sequencer. Available relatives of the patients with sequence variations in the gene were examined genetically and clinically to confirm the segregation pattern. One hundred and fifty unrelated normal control subjects (300 chromosomes) were screened for the c.571C>T (R191X) mutation by primer extension analysis (SNaPshot, ABI, USA).

In the families carrying *GDAP1* mutations, haplotype analysis of the *GDAP1* locus was performed using two intragenic single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs16938893 (c.507T>G, p.Ser169Ser) and rs3739345 and six microsatellite markers, D8S279, D8S286, D8S551, D8S1474, D8S548 and D8S1829, flanking the gene locus. The regions comprising the SNPs were directly sequenced. The microsatellite markers were PCR amplified using fluorescent labelled primers (<http://www.gdb.org/>) and the fragments were resolved

on an ABI 310 sequencer. Allele frequencies were established by testing 50 Czech unrelated individuals carrying neither of the detected mutations (100 chromosomes). Probabilities of finding the L239F or R191X associated haplotypes among normal Czech chromosomes were calculated by multiplying the respective marker allele frequencies. Haplotypes of a previously reported German–Italian family [7] were compared with Czech patients carrying the same *GDAP1* mutation (c.715C>T, L239F).

For reverse transcription (RT) PCR experiments, RNA was extracted from peripheral blood, reverse transcribed (Promega), and PCR amplified with primer pairs spanning all coding exons. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel and directly sequenced.

2.3. Clinical studies

Clinical and electrophysiological evaluations of the patients with *GDAP1* mutations and parent mutation carriers were performed according to standard procedures.

All tested individuals signed an informed consent and the study was approved by the Central Ethical Committee of the University Hospital Motol Prague.

3. Results

3.1. Mutation analysis

Two different point mutations, a novel c.571C>T (R191X) and a previously reported c.715C>T (L239F) [7] were detected in the coding region of *GDAP1*. At least one pathogenic mutation was found in six patients from five apparently unrelated families representing 7.2% out of the 69 families tested. As there was no *GDAP1* mutation detected among demyelinating cases, the frequency in CMT2 families is estimated to be 15.6%. Mutations in both alleles were detected in three isolated CMT patients (4.3% and 9.4% of CMT2 families), in one compound heterozygote for c.715C>T and c.571C>T, and in two homozygotes for c.715C>T. Heterozygous state of c.715C>T in the parental generation of the two latter families could be confirmed only in one parent that was available for the examination. The second pathogenic mutation remained unidentified in one isolated patient heterozygous for c.715C>T from family 4 and in two siblings from family 5, both heterozygous for c.571C>T. In both families the mutant allele was inherited from an unaffected parent as illustrated by clinical and electrophysiological data given in Tables 3 and 4. The c.715C>T (L239F) detected in six out of eight mutant alleles is a prevalent mutation in the Czech population. The mutation has been already described in a compound heterozygous state in one German–Italian family [7].

In order to identify the second causative mutation in family 5, RT-PCR analysis was performed. No exon deletions and no abnormal splicing were detected.

The novel mutation c.571C>T (R191X) was not detected in 150 control individuals.

3.2. Haplotype analysis

To find out whether each of the detected *GDAP1* mutations originates from a common ancestor, we reconstructed haplotypes for the German–Italian and the five Czech *GDAP1* families by analysis of six microsatellite markers spanning the gene locus and two intragenic SNPs. Fig. 1 summarizes the haplotypes observed. Haplotype phase could not be determined completely in the patient from family 4.

Detailed family history assessment of the German L239F carrier revealed her parents' origin from Western Pomerania, a region near the German–Polish border. Five Czech L239F chromosomes originate from the Moravia region in the eastern part of the Czech Republic and one from the western part of the country. Four Czech chromosomes (A, B, C and E from families 1, 2 and 3) and the German chromosome carrying the L239F variant showed an identical core haplotype between D8S286 through D8S548 (~560 kb). The probability of finding the haplotype among normal chromosomes is very low,

i.e. less than 7.34×10^{-6} . Accidental coincidence of the marker alleles in the L239F chromosomes is therefore unlikely. Czech chromosome A and the German chromosome shared the complete haplotype including all analysed markers (~2970 kb). Compared to the core haplotype, chromosome D revealed an allele one repeat shorter at marker D8S1474 but shared the rare allele 278 at marker D8S551 (not found in 100 chromosomes). Chromosome F coincided only at marker D8S286 and at both intragenic SNPs assuming its haplotype to be T–G.

All the markers in families 3 and 5 segregated with R191X. The probability of occurrence of the R191X associated haplotype in the Czech population is even lower, i.e. less than 6.59×10^{-8} .

3.3. Clinical and electrophysiological findings in *GDAP1* patients

3.3.1. Family 1

In the patient from family 1, early motor development was normal. At the age of 4 years he developed bilateral pes planovalgus. Motor nerve conduction studies performed at the peroneal and tibial nerves at age 5 showed severely decreased or absent compound muscle action potentials (CMAPs) and normal nerve conduction velocities (NCVs). At ages 6 and 7, the patient underwent surgical corrections of the foot deformity. Neurological

L239F

Family/ Chromosome	Origin	<i>GDAP1</i>							
		D8S279	D8S286	D8S551	rs3789245	c.507T/G	D8S1474	D8S548	D8S1829
1/A	Moravia	250	229	278	T	G	177	234	113
1/B	Moravia ^a	246	229	278	T	G	177	234	113
2/C	Moravia ^b	246	229	278	T	G	177	234	103/111
2/D	west.Bohemia	226	229	278	T	G	181	234	103/111
3/E	Moravia	226	229	278	T	G	177	234	111
4/F	Moravia	250/238	229	276	T/A	G/T	185	232	113
Marker allele freq. in controls			0.219	<0.01	0.343	0.370	0.075	0.352	
German- Italian	West.Pomerania	250	229	278	T	G	177	234	113

R191X

Family	Origin	<i>GDAP1</i>							
		D8S279	D8S286	D8S551	rs3789245	c.507T/G	D8S1474	D8S548	D8S1829
3	mid.Bohemia	226	235	266	T	G	177	248	113
5	mid.Bohemia	226	235	266	T	G	177	248	113
Marker allele freq. in controls		0.223	0.042	0.229	0.343	0.370	0.075	<0.01	0.223

Fig. 1. Disease haplotypes in five Czech and the German–Italian family with *GDAP1* mutations. ^aDNA of the patient's father was not available for examination, paternity was not proven. ^bDNA of the patient's mother was not available for examination.

examination at age 8 revealed marked distal lower limb (LL) weakness and atrophies, absent Achilles tendon reflexes and decreased patellar reflexes, mild wasting of the hand muscles with slightly reduced strength and diminished upper limb (UL) reflexes.

3.3.2. Family 2

The patient from family 2 started to walk at 1 year of age. At age 4, walking at the outer edge of the left foot was noted followed by bilateral development of pes cavovarus. The deformity was treated by orthopaedic surgery at age 7. On examination at age 12, the patient showed distal LL weakness and marked atrophies of the foot muscles and calves, gait with foot drop, finger tremor and spine deformity (scoliosis and chest hyperkyphosis). At age 19, LL atrophies reached distal parts of the thighs, Achilles tendon reflexes were absent and patellar reflexes diminished. There was mild atrophy of the right thenar and normal UL reflexes. At age 29, atrophies of the interosseal muscles were noted without loss of strength. From age 35, the patient states weakening of the hands and using a cane for longer distances because of marked proximal LL muscle weakening.

3.3.3. Family 3

Early motor milestones of the patient from family 3 were normally acquired by 1 year of age. At the age of 2 years, his parents noted tip toe walking. At age 4, bilateral prolongation of the Achilles tendons was performed. In the first decade, the gait deteriorated by progressive distal LL weakness and pes equinovarus deformity and was only possible with the aid of crutches. The ambulation much improved after the second orthopaedic surgery at age 13 and support was further required only for longer distances. Weakness and wasting of the small hand muscles and clawing of the fingers were already apparent before the start of school attendance at age 8.

3.3.4. Family 4

In the patient from family 4, the first CMT symptoms were observed at the age of 4 years, when he presented with cavus foot deformity. At ages 12 and 13, he underwent its surgical corrections. The first neurological and electrophysiological examination at age 39 showed well preserved foot dorsiflexion, preserved patellar reflexes, normal clinical and electrophysiological findings at the UL and diminished CMAPs and sensory nerve action potentials (SNAPs) at the LL. The patient has no major complaints except of ankle instability and frequent ankle distortions.

3.3.5. Family 5

The older affected sibling from family 5 (5/1) exhibited bilateral Achilles tendon shortening, high arched foot and clumsy gait at the age of 6 years. Examination at age 15 showed distal LL atrophies, complete LL areflexia,

diminished UL reflexes, hand tremor and scoliosis. The Achilles tendons were surgically lengthened at age 16. At age 19, atrophies of the small hand muscles were noted, but strength was well preserved. Examination at age 22 revealed preserved foot and toe dorsiflexion, UL muscle atrophies up to the distal forearms and only mild hand muscle weakening with preserved dexterity. His sister (5/2) showed normal motor milestones. At age 6, tip toe gait and inward twisting of the right foot became apparent. She developed early pes equinovarus right, pes planovalgus left and steppage gait. Neurological examination at age 13 showed hand muscle atrophies and weakening, diminished UL reflexes and scoliosis. The right foot deformity was surgically treated at age 16. Examination at age 16 revealed severe LL muscle wasting up to the lower thighs, gait with marked foot drop, using Gower's manoeuvre when rising from the floor, marked hand muscle atrophies, weakening and clumsiness with beginning finger retraction and complete areflexia.

Further clinical and electrophysiological data are summarized in Tables 1 and 2.

4. Discussion

We identified mutations in at least one *GDAP1* allele in 7.2% of unrelated Czech CMT families with early-onset axonal or demyelinating neuropathy and disease transmission compatible with autosomal recessive inheritance pattern. Pathogenic mutations in both alleles were detected in 4.3% of the families. A detection rate of 5% in isolated cases makes testing sporadic CMT patients for *GDAP1* mutations reasonable in the Czech population [7,16]. Direct sequencing of all coding exons and adjacent intronic regions of the gene did not reveal a second pathogenic mutation in a significant portion of the *GDAP1* families (2 out of 5, 40%).

We detected two distinct *GDAP1* mutations, a novel nonsense (c.571C>T, R191X) and a previously described missense (c.715C>T, L239F) mutation [7]. R191X predicts a truncation of the *GDAP1* protein in front of the functional GST_C domain and the transmembrane domains, which are necessary for the proper localization of *GDAP1* to mitochondrial membranes [14,15]. Thus, we speculate on a loss of function effect of R191X.

All our *GDAP1* patients showed normal motor milestones before the first year of age followed by early development of severe foot deformity between 2 and 6 years that required surgical treatment. Consistent with previous reports, most of our patients developed severe motor deficit in the distal lower limbs within the first decade. However, none of the patients aged 11–43 became wheelchair-bound as frequently reported in *GDAP1* patients [6–9,11,13,16,17]. One patient has been using a cane due to proximal LL weakness only since the fourth decade. Distal upper limb muscle involvement of varying

Table 1
Clinical summary in six Czech patients with *GDAP1* mutations

Family/patient	1	2	3	4	5/1	5/2
Genotype	L239F+L239F	L239F+L239F	L239F+R191X	L239F+?	R191X+?	R191X+?
Age (yr)/gender	11/M	43/M	17/M	41/M	22/M	18/F
Foot deformity	Pes planovalgus	Pes cavovarus	Pes planovalgus	Pes cavus	Pes cavus	Pes equinovarus right, pes planovalgus left
Foot dorsiflexion right, left (MRC)	2,3/5	0,0/5	0,0/5	4+,4+/5	4,4/5	3,1/5
Proximal LL weakness right, left (MRC)	Knee flexion 4,4-/5	Knee flexion 3,2/5, knee extension 4+,4/5, hip extension 4,4/5	No	No	No	Hip and knee flexion and extension 4-,4-/5
LL atrophy	Severe, up to distal thighs	Severe, up to lower halves of thighs	Severe, up to distal thirds of thighs	Moderate, up to distal thighs	Severe, up to distal parts of thighs	Severe, including lower parts of thighs
LL reflexes	Absent	Absent	Absent	Achilles tendon reflexes absent	Absent	Absent
Walking ability	No support	Cane	Crutches	No support	No support	No support
UL atrophy	Mild at hands	Moderate at hands, mild at forearms	Severe at hands-claw-hand, moderate at distal halves of forearms	No	Mild at hands and forearms	Moderate at hands and forearms
Distal UL weakness right, left (MRC)	Hand grip 4,4/5, wrist extensors 4+,4+/5, wrist flexors 4-,4+/5	Hand grip 4+,4+/5	Hand grip 3,3/5, wrist extensors 4-,3/5, wrist flexors 4+,4/5, loss of dexterity	No	Hand grip 4+,4+/5	Severe hand grip weakening, exact data NA
Proximal UL weakness (MRC)	No	No	No	No	No	No
UL reflexes	Normal	Decreased	Decreased	Normal	Decreased	Decreased
Sensory impairment	Mild loss of touch sense at LL	No	Moderate loss of touch sense and mildly decreased joint position sense at LL	No	Mild loss of touch sense at LL, moderate loss of vibration sense at LL	No loss of touch sense, further data NA
Other	No	Scoliosis	Tongue tremor	Scoliosis	Scoliosis	Scoliosis

M, male; F, female; MRC, Medical Research Council; LL, lower limbs; UL, upper limbs; NA, not available.

Table 2
Summary of electrophysiological findings in six Czech patients with *GDAP1* mutations

Family/patient		1	2	3	4	5/1	5/2	normal
Age (yr)		8	43	15	41	23	18	
<i>Motor nerves</i>								
Median nerve	DML (ms)	3.9	3.8	NR	3.6	4.9	NA	<4.0
	MNCV (m/s)	64	59		53	45		>51
	CMAP (mV)	6.4	8.8		8.2	7.1		>4.2
Ulnar nerve	DML (ms)	3.4	3.4	4.1	2.3	3.2	3.6	<2.8
	MNCV (m/s)	67	56	40	60	51	49	>50
	CMAP (mV)	4.6	3.6	0.9	7.1	5.8	1.9	>5.5
Peroneal nerve	DML (ms)	NR	NR	NR	3.2	NA	NA	<5.0
	MNCV (m/s)				45			>39
	CMAP (mV)				3.0			>2.0
Tibial nerve	DML (ms)	5.2	NR	NR	5.3	NR	NR	<5.5
	MNCV (m/s)	44			38			>40
	CMAP (mV)	0.5			0.5			>2.5
<i>Sensory nerves</i>								
Median nerve	SNCV (m/s)	NR	44	NR	57	NR	NR	>48
	SNAP (μ V)		15		14			>10
Ulnar nerve	SNCV (m/s)	NR	48	NR	55	NA	NA	>48
	SNAP (μ V)		15		10			>10
Sural nerve	SNCV (m/s)	NR	40	NR	38	NR	NR	>38
	SNAP (μ V)		2.0		5.0			>4.4

DML, distal motor latency; CMAP, compound muscle action potential; MNCV, motor nerve conduction velocity; SNAP, sensory nerve action potential; SNCV, sensory nerve conduction velocity; NR, not recordable; NA, not available. Pathological values are in bold.

Table 3
Clinical summary in parent carriers of L239F and R191X in two heterozygous families

Family	4	5
Genotype	L239F	R191X
Age (yr)/Gender	72/M	57/M
Foot deformity	No	No
Foot dorsiflexion right, left (MRC)	5,5/5	5,5/5
Proximal LL weakness right, left (MRC)	No	No
LL atrophy	No	No
LL reflexes	Decreased	Normal
Walking ability	No support	No support
UL atrophy	No	No
Distal UL weakness right, left (MRC)	No	No
Proximal UL weakness (MRC)	No	No
UL reflexes	Normal	Normal
Sensory impairment	Mild loss of vibration sense at LL	Mild loss of touch sense in median nerve distribution

M, male; MRC, Medical Research Council; LL, lower limbs; UL, upper limbs.

extent became evident by the end of the second decade and appeared to be severe only in two patients [8–11,17]. Moreover, we observed very slow disease progression in the 41 year old heterozygous carrier of the L239F missense mutation from family 4 showing only mild weakening of the toe and foot dorsiflexion. The mutation was reported in a compound heterozygote state with Glu114fs by Ammar et al. in a patient who seemed to be more severely affected compared to our L239F patients due to loss of ambulation at age 11 [7]. We also noted

strikingly different disease progression and severity in the two siblings from family 5, heterozygotes for the R191X nonsense mutation. All the *GDAP1* patients displayed an axonal type of neuropathy. None of them had vocal cord paresis, previously reported to be associated with CMT2 and *GDAP1* mutations [11,12,17]. No patient showed respiratory insufficiency due to diaphragm paralysis [11,12]. Regarding the better walking ability in our patients, we admit positive impact of the early orthopaedic surgery performed.

Table 4
Summary of electrophysiological findings in parent carriers of L239F and R191X in two heterozygous families

Family		4	5	normal
Genotype		L239F	R191X	
Age (yr)		72	57	
<i>Motor nerves</i>				
Median nerve	DML (ms)	3.6	5.6	<4.0
	MNCV (m/s)	54.1	50.5	>51
	CMAP (mV)	10.3	5.5	>4.2
Ulnar nerve	DML (ms)	2.6	2.8	<2.8
	MNCV (m/s)	56.2	57.1	>50
	CMAP (mV)	10.2	9.9	>5.5
Peroneal nerve	DML (ms)	4.6	4.7	<5.0
	MNCV (m/s)	46.7	48.3	>39
	CMAP (mV)	5.1	4.9	>2.0
Tibial nerve	DML (ms)	3.9	NA	<5.5
	MNCV (m/s)	46.2		>40
	CMAP (mV)	11.8		>2.5
<i>Sensory nerves</i>				
Median nerve	SNCV (m/s)	51.8	36.4	>48
	SNAP (μ V)	14.2	5.9	>10
Ulnar nerve	SNCV (m/s)	47.1	48.3	>48
	SNAP (μ V)	16.7	7.7	>10
Sural nerve	SNCV (m/s)	46.6	40.6	>38
	SNAP (μ V)	6.3	5.4	>4.4

DML, distal motor latency; CMAP, compound muscle action potential; MNCV, motor nerve conduction velocity; SNAP, sensory nerve action potential; SNCV, sensory nerve conduction velocity; NR, not recordable; NA, not available. Abnormal values are in bold.

L239F accounted for 75% of the mutant alleles in the Czech population. Haplotype analysis of the German-Italian and four Czech families carrying the L239F mutation indicated a common ancestral founder. The ancestors of the German L239F carrier lived in Western Pommerania, near today's German-Polish border. This area was historically populated by Germans and Slavs with a high rate of intermarriage. Considering the lack of systematic screening data on spectrum and frequency of *GDAP1* mutations in Germany and Poland and historical and geographical proximity of all three countries, closer specification of the mutation origin is not possible. The less frequent nonsense mutation R191X was also found to be associated with a common haplotype, which included remote markers as well, indicating its later origin.

In the view of a recent Claramunt et al. report on autosomal dominant effect of some *GDAP1* mutations, we examined clinically and electrophysiologically parent mutation carriers from the two heterozygous families [16]. Our findings do not support dominant transfer of the disease and suggest that a second mutation in another region (i.e. in the promoter or deep intronic regions) of *GDAP1* or in another gene caused the CMT phenotype in the heterozygous patients. Haplotype analysis in these families showed notable difference in the "nonmutant"

chromosome haplotypes (differing in five out of six microsatellite markers tested, data not shown). This might indicate the existence of two additional *GDAP1* mutations in the Czech population provided that we do not consider a digenic cause of the disease. In family 5, RNA analysis excluded large deletions and intronic mutations affecting splicing. After all, we cannot rule out co-occurrence of a heterozygous *GDAP1* mutation and CMT with different genetic cause, e.g. in the L239F heterozygote from family 4 with mild clinical phenotype.

The results of this study will help to optimize the molecular-genetic examination algorithm in Czech CMT patients. Testing for *GDAP1* mutations should be performed in patients with axonal CMT in preference to demyelinating cases. Targeted mutation analysis to L239F followed by R191X using a cheaper specific mutation directed method appears to be effective. In case of negative or mono-allelic mutation findings, sequencing of the whole gene should be completed.

Acknowledgement

This study was supported by the Czech Ministry of Health (Grant IGA No. 1A8254).

References

- [1] Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 1993. p. 1094-136.
- [2] Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980;103:259-80.
- [3] Reilly MM. Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2000;13:561-4.
- [4] Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002;30:21-2.
- [5] Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002;30:22-5.
- [6] Nelis ES, Erdem S, Van den Bergh PYK, et al. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 2002;59:1865-72.
- [7] Ammar N, Nelis E, Merlini L, et al. Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 2003;13:720-8.
- [8] Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003;126:642-9.
- [9] Birouk N, Azzedine H, Dubourg O, et al. Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Arch Neurol* 2003;60:598-604.
- [10] De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Boccaccio I, et al. Phenotypic and genetic exploration of severe demyelinating and secondary axonal neuropathies resulting from GDAP1 nonsense and splicing mutations. *J Med Genet* 2003;40:e87.
- [11] Azzedine H, Ruberg M, Ente D, et al. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003;13:341-6.
- [12] Stojkovic T, Latour P, Ghislaine V, et al. Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2004;14:261-4.
- [13] Di Maria E, Gulli R, Palestra P, et al. A novel mutation of GDAP1 associated with Charcot-Marie-Tooth disease in three Italian families: evidence for a founder effect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1495-8.
- [14] Marco A, Cuesta A, Pedrola L, et al. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 2004;21:176-87.
- [15] Pedrola L, Espert A, Xingyao W, et al. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 2005;14:1087-94.
- [16] Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005;42:358-65.
- [17] Sevilla T, Cuesta A, Chamillas MJ, et al. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 2003;126:2023-33.