



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Doktorská disertační práce

**MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ A
KLINICKO NEUROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ
U AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍCH FOREM
DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ CHARCOT-MARIE-TOOTH**

MUDr. Lucia Baránková

Praha 2010

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ A
KLINICKO NEUROLOGICKÁ VYŠETŘENÍ
U AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍCH FOREM
DĚDIČNÝCH NEUROPATIÍ CHARCOT-MARIE-TOOTH

Doktorská disertační práce, Praha 2010

MUDr. Lucia Baránková

Obor, předseda oborové rady

Školící pracoviště

Školitel

Školitel konsultant

Neurovědy, Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie,

Neurologická klinika dospělých

2. LF UK a FNM, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Doc. MUDr. Martin Bojar, CSc.

Doc. MUDr. Pavel Seeman, PhD.

Poděkování

Mé poděkování patří mému školiteli konsultantovi doc. MUDr. Pavlovi Seemanovi, PhD., mému školiteli doc. MUDr. Martinovi Bojarovi, CSc., mým kolegům z DNA laboratoře Kliniky dětské neurologie a Neurologické kliniky dospělých 2. LF UK a FNM MUDr. Emílii Vyhnálkové, PhD., Mgr. Ivě Sakmaryové, Markétě Kubálkové a As. MUDr. Radimovi Mazancovi, PhD., dále MUDr. Daně Šiškové z Neurologické kliniky FTN – IPVZ, kolegům z Ústavu lidské genetiky Univerzity Friedrich-Alexander v Erlangenu (Dr. Bernd Rautenstrauss, PhD., Dr. Kathrin Hühne, PhD., Dr. Corrina Stengel, PhD.), kolegům z Ústavu molekulární genetiky Univerzity v Antverpách (Eva Nelis, PhD., Prof. Peter De Jonghe, M.D., PhD.) a kolegům z Ústavu neuropatologie Univerzity v Cáchách (Prof. Stephan Züchner, M.D., PhD.).

Obsah

1.	Úvod	6
1.1	Klinické projevy a klasifikace CMT	6
1.2	AR formy CMT	7
1.3	Periaxin a CMT4F	10
1.4	<i>GDAP1</i> gen a CMT4A	13
2.	Cíle studie	18
3.	Pacienti a metody	20
3.1	Určení podílu jednotlivých typů dědičnosti v souboru CMT rodin	20
3.2	Výběr pacientů	20
3.3	Odběr materiálu a izolace DNA	21
3.4	Molekulárně genetická vyšetření <i>GDAP1</i> a <i>PRX</i> genu	22
3.5	Haplotypová analýza lokusu 8q13-q21	26
3.6	Klinická a elektrofyziologická vyšetření pacientů s nalezenými mutacemi	26
4.	Výsledky	27
4.1	Podíl AR a sporadických forem v souboru CMT rodin	27
4.2	Výsledky molekulárně genetického vyšetření <i>PRX</i> genu	28
4.3	Klinické a elektrofyziologické nálezy u pacienta s mutací v <i>PRX</i> genu	31
4.4	Výsledky molekulárně genetického vyšetření <i>GDAP1</i> genu	33
4.5	Výsledky haplotypové analýzy lokusu 8q13-q21	37
4.6	Klinické a elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi v <i>GDAP1</i> genu	41
5.	Diskuse	48

5.1	Zastoupení typů dědičnosti CMT v ČR	48
5.2	Mutace c.3286_3354del71 v <i>PRX</i> genu	48
5.3	Dědičné neuropatie v romské populaci	49
5.4	Klinický a elektrofyziologický obraz pacienta s c.3286_3354del71 v <i>PRX</i> genu	50
5.5	Frekvence výskytu mutací v <i>GDAP1</i> genu mezi českými CMT pacienty	51
5.6	Spektrum <i>GDAP1</i> mutací v české populaci a jejich původ	51
5.7	Klinický a elektrofyziologický obraz pacientů s mutacemi v <i>GDAP1</i> genu, korelace genotyp-fenotyp	52
5.8	Heterozygotní <i>GDAP1</i> mutace	55
6.	Závěry	56
7.	Reference	58
8.	Publikace autora	62
9.	Curriculum vitae	65
10.	Přílohy	66

1. Úvod

1.1 Klinické projevy a klasifikace CMT

Onemocnění Charcot-Marie-Tooth (CMT), též známé jako dědičná motoricko-senzitivní neuropatie (HMSN), je nejčastější dědičné nervosvalové onemocnění a jedno z nejčastějších monogenně dědičných onemocnění vůbec s prevalencí 1: 2500 – 1: 10 000 (*Skre, 1974; Berger et al., 2002*). Klinicky je CMT charakterizováno progresivní distální svalovou slabostí, distálními svalovými atrofiemi a poruchou citlivosti, dříve a výrazněji vyjádřenými na dolních končetinách, deformitami nohou a sníženými až vymizelými šlachookosticovými reflexy. Závažnost klinického obrazu se výrazně liší, odvíjejíc se od genetické příčiny.

Klasifikace CMT se opírá o řadu kritérií, jako elektrofyziologický nález, který úzce koreluje s histopatologickým nálezem, dále o typ dědičnosti a genetickou příčinu (*Reilly, 2000*).

Na základě kondukčních studií na periferních nervech je většinou možné odlišit primárně demyelinizační lézi nervových vláken, demyelinizační typ CMT, CMT 1 nebo HMSN I, od primárně axonálního postižení, axonálního typu, CMT 2 nebo HMSN II. Typ CMT1 je charakterizován snížením rychlosti vedení (NCV) motorickými vlákny n.medianus pod 38 m/s, dále znaky demyelinizace v nervové biopsii. Rychlosti vedení u CMT2 jsou normální nebo lehce snížené, amplitudy složeného akčního potenciálu (CMAP) jsou výrazně snížené a biopsie nervu ukazuje ztrátu axonů (*Dyck a Lambert, 1968; Harding a Thomas, 1980; Dyck et al., 1993*).

Identifikováním CMT rodin, ve kterých byli jak postižení jedinci s elektrofyziologickým nálezem odpovídajícím CMT1, tak jiní s obrazem CMT2, byl

definován tzv. intermediární typ. NCV se u tohoto typu pohybují mezi 30 a 40 m/s a nervové biopsie vykazují duální patologii, axonální ztrátu a znaky demyelinizace (*Madrid et al., 1977; Davis et al., 1978; Bouche et al., 1983; Gherardi et al., 1983*). Některé genetické příčiny intermediárního CMT typu byly již prokázány (*Mersiyanova et al., 2000; Züchner et al., 2005*).

CMT se dědí všemi typy dědičnosti, autosomálně dominantně (AD), autosomálně recesivně (AR) a X-vázaně (*Shy, 2004*). Nejčastějším typem dědičnosti je AD typ. V současnosti je známo více než 40 genů spojených s CMT. (www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/).

1.2 AR formy CMT

V evropské populaci odpovídají AR formy za HMSN u méně než 10% CMT rodin (*Martin et al., 1999*). Mnohem častější jsou v oblastech s častými příbuzenskými sňatky, např. ve Středomoří a na Středním Východě, kde se jejich výskyt odhaduje až na 30-50%, v populaci Alžíru a Maroka dokonce na víc než 60% (*Bouhouche et al., 2007*). AR CMT mohou být podobně jako dominantní formy demyelinizačního (CMT4) a axonálního (AR CMT2) typu.

AR CMT se vyznačují dřívějším začátkem v raném dětství, i jako kongenitální formy, a většinou rychlým a závažným průběhem. Slabost a atrofie postihující nejdřív distální části končetin se mohou rozšířit i na proximální svalstvo a způsobit ztrátu schopnosti samostatné chůze, která představuje závažný handicap. U těchto forem mohou být postiženy hlavové nervy (VII, VIII, IX, X) a n.phrenicus (*Stojkovic et al., 2004; Sevilla et al., 2003; Azzedine et al., 2003; Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005*).

Dosud je známých osm genů a dva lokusy odpovědné za CMT4 a tři geny za vzácnější AR CMT2 (Tab. 1).

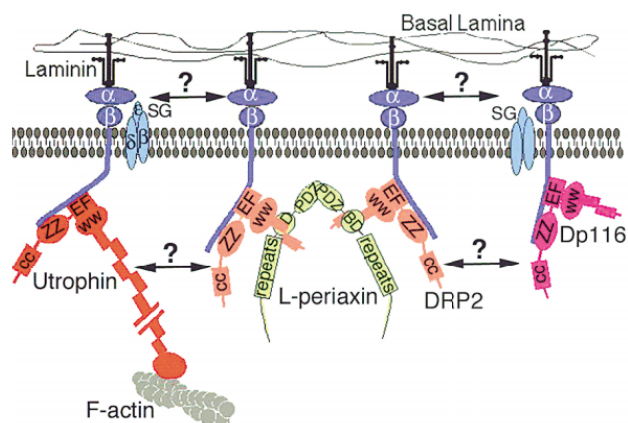
Klinický typ	Lokus	Gen	Protein
1. Demyelinizační			
CMT4A	8q13-q21 Ben Othmane 1993	GDAP1 Baxter 2002	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
CMT4B1	11q23 Bolino 1996	<i>MTMR2</i> Bolino 2000	Myotubularin-related protein 2
CMT4B2	11p15 Ben Othmane 1999	<i>MTMR13/SBF2</i> Senderek 2003	Myotubularin-related protein 13/SET binding factor 2
CMT4C	5q23-q33 LeGuern 1996	<i>SH3TC2/KIAA1985</i> Senderek 2003	neznámý
CMT4D	8q24 Kalaydjieva 1996	<i>NDRG1</i> Kalaydjieva 2000	N-myc downregulated gene/Protein regulated by oxygen 1-PROXY1
CMT4E	10q21.1-22.1	<i>EGR2</i> Warner 1998	Early growth factor 2
CMT4F	19q13.1-13.3 Delague 2000	PRX Boerkoel 2001, Guilbot 2003	Periaxine
CMT4G	10q23 Rogers 2000	neznámý	neznámý
CMT4H	12q11.21-13.11 De Sandre-Giovannoli 2005	neznámý	neznámý
CCFDN	18q23 Angelicheva 1999	<i>CTDP1</i> Varon 2003	FCP protein phosphatase
2. Axonální			
AR CMT2A (CMT2B1, CMT4C1)	1q21.2-21.3 Bouhouche 1999	<i>LMNA</i> De Sandre-Giovannoli 2002	Lamin A/C
AR CMT2B (CMT4C3)	19q13.3 Leal 2001	<i>MED25</i> Rautenstrauss 2005	Mediator complex subunit
AR CMT2K (CMT4C4, CMT2H)	8q13-q21 Ben Othmane 1993	GDAP1 Cuesta 2002	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1

Tab. 1 Klasifikace AR CMT forem podle Kabzinska et al., 2008.

1.3 Periaxin a CMT4F

V roce 1994 Gillespie publikoval práci o periaxinu, nově objeveném 147-kDa proteinu myelinizujících Schwannových buněk (Gillespie *et al.*, 1994). Ve vyvíjejícím se a regenerujícím nervu, v časných fázích myelinizace ještě před vznikem kompaktního myelinu, je periaxin lokalizován převážně na adaxonální membráně Schwannovy buňky. S vývojem myelinového obalu se soustřeďuje na abaxonální membráně přivrácené k bazální lamině. Tato změna v jeho lokalizaci po dokončení spiralizační fáze myelinizace s vývojem kompaktního myelinu předpokládá jeho roli v pozdějších stádiích tohoto procesu a ve stabilizaci zralého myelinového obalu. (Gillespie *et al.*, 1994; Scherer *et al.*, 1995). Role periaxinu v udržování zralých myelinových obalů byla dále potvrzena na zvířecím modelu *Prx* *-/-* myši („knock-out“ pro *PRX* (*periaxin*) gen), u kterých se po normální myelinizaci axonů periferních nervů vyvinula těžká demyelinizační neuropatie spojená s alodynii a hyperalgesií (Gillespie *et al.*, 2000).

Kromě 147-kDa proteinu, posléze pojmenovaném jako L-periaxin (long), byla izolována také kratší 16-kDa izoforma, S-periaxin (short), která vzniká alternativním sestřihem mRNA *PRX* genu. Obě formy obsahují PDZ a NLS doménu, delší forma také „repeatovou“ a kyselou („acidic“) doménu (Obr. 1, 2). S-periaxin je rozptýlen v cytoplazmě a jeho funkce je nejasná. Typickou lokalizací L-periaxinu je membrána Schwannovy buňky (Dytrych *et al.*, 1998). Bylo prokázáno, že interakcí s komplexem dystroglycan dystrophin-related protein-2 (DRP2) spojuje abaxonální L-periaxin laminin-2 v bazální lamině s aktinovým cytoskeletem Schwannovy buňky (Obr. 1) (Sherman *et al.*, 2001). Přítomnost PDZ domény obsažené v strukturách signálních komplexů v místech buněčného kontaktu poukazuje na možnou funkci periaxinu jako signálního proteinu (Kornau *et al.*, 1995; Tsunoda *et al.*, 1997; Sherman a Brophy, 2000; Sherman *et al.*, 2001).



Obr. 1 Model L-Periaxin-DRP2 komplexu na plazmatické membráně Schwannovy buňky podle Sherman *et al.*, 2001.

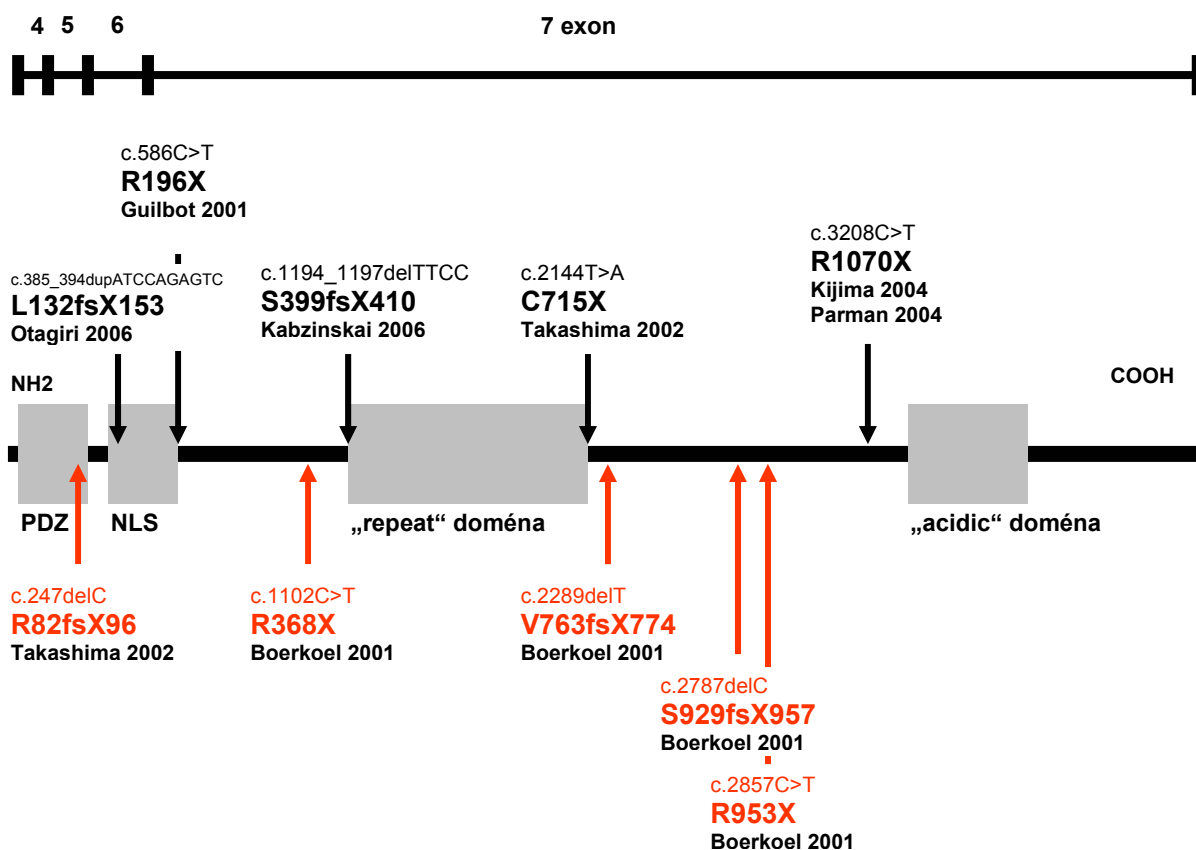
V roce 2000 Delague popsala u příslušníků velké libanonské rodiny novou autozomálně recesivní demyelinizační CMT, CMT4F (OMIM #605725) (Delague *et al.*, 2000). Tato se na rozdíl od jiných CMT4 typů vyznačovala těžkou poruchou citlivosti. Odpovědný lokus byl na základě homozygotního mapování lokalizován do oblasti na 19. chromozomu 19q13.1-13.3, v které byl posléze identifikován lidský *PRX* gen. V *PRX* genu postižených byla detekována homozygotní mutace segregující s nemocí. Morfologie myelinizovaných vláken z nervových biopsií *Prx*^{-/-} myši a jednoho z postižených členů rodiny vykazovala společné rysy, snížení počtu myelinizovaných vláken, „onion bulb“ formace tvořené nadpočetnými Schwannovými buňkami obklopujícími hypomyelinizované nebo holé axony a hypermyelinizované úseky s řasením myelinu. Jak v myším modelu, tak u pacienta s CMT4F byl v postižených nervech specifický deficit L-periaxinu (Delague *et al.*, 2000; Guilbot *et al.*, 2001).

Po objevu *PRX* genu odpovědného za typ CMT4F začaly přibývat kazuistiky a skríningové studie zabývající se mutacemi v tomto genu. Bylo popsáno deset „nonsense“ a „frameshift“ *PRX* mutací (Obr. 2). Mutace zachovávající expresi proteinu (mRNA nepodléhá

„non-sense mediated decay“) zkracují L-periaxin o karboxylový konec a kyselou doménu, přičemž u zhruba poloviny mutací se jedná o jedinou postiženou doménu (*Boerkoel et al., 2001; Takashima et al., 2002; Kijima et al., 2004*). Parmanová prokazuje specifické chybění této domény L-periaxinu v nervových biopsiích (*Parman et al., 2004*). Klinické a histopatologické znaky pacientů s „upstream“ a „downstream“ lokalizovanými mutacemi se navíc výrazněji neliší (*Kabzinska et al., 2006; obr.2*). Zdá se, že právě chybění kyselé domény by mohlo být patogenetické pro CMT4F (*Boerkoel et al., 2001; Takashima et al., 2002; Kijima et al., 2004; Otagiri et al., 2006*).

Demyelinizační neuropatie způsobená mutacemi v *PRX* genu u lidí měla výraznější senzitivní symptomatiku v porovnání s jinými typy CMT (*Delague et al., 2000; Boerkoel et al., 2001; Takashima et al., 2002*). U všech případů byl dosud popisován časný začátek spojený s opožděním časného motorického vývoje u pacienta. Poté se onemocnění vyvíjelo dvěma způsoby. Buď docházelo k rychlé progresi jak senzitivních, tak motorických symptomů do obrazu těžké CMT a Dejerine-Sottasovy neuropatie (DSN) (*Boerkoel et al., 2001; Takashima et al., 2002*), nebo se naopak progresse zastavila a dominovalo senzitivní postižení nad motorickým (*Takashima et al., 2002; Kijima et al., 2004; Parman et al., 2004; Otagiri et al., 2006*).

Žádná z mutací není odpovědná za oba fenotypové projevy. Avšak detailnější korelace genotyp-fenotyp pro malý počet pacientů zatím nebyly publikovány. Mutace byly popsány v muslimské, hispánské, severoevropské, vietnamské a japonské populaci. Dosud byla provedena jedna skriningová studie u japonských CMT pacientů (*Kijima et al., 2004*). Pro prevalentní mutaci v japonské populaci nebyl prokázán společný zakladatel („common founder“) (*Otagiri et al., 2006*).



Obr. 2 mRNA *PRX* genu a L-periaxin s vyznačením publikovaných mutací. Červeně označené mutace jsou odpovědné za DSN. PDZ doména je pojmenována po třech proteinech, ve kterých byla poprvé identifikovaná, post-synaptic density protein PSD-95, *Drosophila discs large* (*dlg*) tumor supressor gene a tight junction-associated protein ZO-1. NLS doména značí nuclear localization signal.

1.4 *GDAP1* gen a CMT4A

GDAP1 (*ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*) gen se nachází na 8. chromosomu (oblast 8q13-q21.1). Vazba na tuto oblast byla poprvé popsána u AR rodin s demyelinizačním typem CMT (*Ben Othmane et al., 1993*). Jako kauzální gen byl *GDAP1* identifikován v roce 2002 ve čtyřech konsanguinních tuniských rodinách s CMT4 (*Baxter et al., 2002*) a současně jinými autory u třech konsanguinních španělských rodin s AR axonální neuropatií (*Cuesta et al., 2002*).

Bylo popsáno 26 mutací v tomto genu (Tab. 2). Studie popisující zastoupení a výskyt *GDAP1* mutací v různých populacích nelze zcela srovnávat, jednak pro odlišně definované vyšetřované soubory (testování jen AR rodin, vyšetřování i sporadických případů, atd.) a dále pro existenci „common founder“ mutací v některých populacích. Avšak mezi AR CMT se mutace v *GDAP1* genu ukazují být nejčastější příčinou, prokazatelné u 9,3-25% AR CMT rodin (*Nelis et al., 2002; Ammar et al., 2003; Züchner a Vance, 2006*). Tzv. efekt zakladatele („founder effect“) jako příčina opakovaných nálezů stejných mutací byl popsán u třech mutací, v hispánské (Q163X), italské (M116R) a severoafrické populaci (S194X) (*Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005; Di Maria et al., 2004; Bouhouche et al., 2007*).

Onemocnění se u popsáných pacientů manifestovalo do věku 7 let poruchou chůze nebo deformitou nohy. Menší část pacientů trpěla hypotonií časně po porodu nebo opožděním motorického vývoje (*Birouk et al., 2003; Sevilla et al., 2003; Stojkovic et al., 2004*). Rychlá progresse distální slabosti, svalové atrofie a deformit dolních končetin vedla k těžkému hendikepu u dětí v první dekádě života. Většina pacientů byla tak ve druhé až třetí dekádě upoutána na vozík nebo nucena používat při chůzi oporu (*Nelis et al., 2002; Sevilla et al., 2003; Ammar et al., 2003; Senderek et al., 2003; Birouk et al., 2003; Azzedine et al., 2003; Stojkovic et al., 2004; DiMaria et al., 2004; Claramunt et al., 2005*). Velká část pacientů trpěla do konce druhé dekády také těžkým postižením rukou (*Sevilla et al., 2003; Senderek et al., 2003; Birouk et al., 2003; De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Azzedine et al., 2003*). Někteří autoři uvádějí parézu hlasivek (*Stojkovic et al., 2004; Sevilla et al., 2003; Azzedine et al., 2003; Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005*), parézu bránice s respirační insuficiencí (*Azzedine et al., 2003; Stojkovic et al., 2004*) nebo obrnu lícního nervu a dysfagii (*Boerkoel et al., 2003*).

GDAP1 mutace		Reference
c.92G>A	W31X	Baxter 2002
c.311-16>A	3'-splice site	Kabzinska 2005
c.341_344delAAAAG	E114fs	Claramunt 2005
c.347T>C	M116T	Kabzinska 2006
c.347T>G	M116R	Di Maria2004
c.349_350insT	Y117fs	Senderek 2003
c.358C>T	R120W	Claramunt 2005
c.359G>A	R120Q	Boerkoel 2003
c.389C>G	S130C	Kabzinska 2005
c.439delA	T147fs	Georgiou 2006
c.445G>T	D149Y	Parman 2004
c.458C>T	P153L	Kabzinska 2007
c.458-2A>G	S162fsX166	De Sandre-Giovanolli 2003
c.469A>C	T157P	Claramunt 2005
c.487C>T	Q163X	Cuesta 2002
c.581C>G	S194X	Cuesta 2002, Baxter 2002
c.558delT	I186fs	Stojkovic 2004
c.579+16>A	5'-splice site	Senderek 2003
c.668T>A	L223X	De Sandre-Giovanoli 2003
c.715C>T	L239F	Ammar 2003
c.782G>A	R161H	Baxter 2002
c.786delG	G262fs	Nelis 2002
c.811G>A	G271R	Ammar 2003
c.844C>T	R282C	Nelis 2002
c.863insA	T288fs	Cuesta 2002
c.929G>A	R310Q	Azzedine 2003

Tab. 2 Popsané mutace v *GDAP1* genu podle <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>, stav k 17.12.2007.

GDAP1 gen kóduje protein o 358 aminokyselinách, který je strukturou podobný enzymům glutathion S-transferázám (GST) (Marco et al., 2004). Uvažovalo se proto o podílu *GDAP1* proteinu na buněčném anti-oxidativním metabolismu. *GDAP1* má dvě typické GST domény na N-konci, doménu I odpovídající vazebnému místu pro glutathion a doménu II spojenou s předpokládanou cytotoxickou a xenobiotickou aktivitou proteinu. C-konec navíc

obsahuje dvě transmembránové domény, které nebyly nalezeny v jiných GST proteinech. V následující studii Pedrolové byl prokázán prevalentní výskyt GDAP1 v neuronech mozku, míchy a gangliích zadních míšních kořenů. GST aktivita GDAP1 nebyla potvrzena, avšak byla demonstrována role transmembránových domén v lokalizaci GDAP1 v membránách mitochondrií. Začalo se uvažovat o roli mitochondriální dysfunkce v patogenezi onemocnění (Pedrola *et al.*, 2005; Shield *et al.*, 2006). I přes výskyt GDAP1 v mozkových neuronech, v klinickém obrazu pacientů s *GDAP1* mutacemi nejsou známky postižení CNS.

Pokud se držíme původní definice Lamberta a Dycka pro CMT1 a CMT2, *GDAP1* mutace byly popsány jak u pacientů s demyelinizační, tak axonální neuropatií. Homozygotní mutace S194X byla popsána u obou elektrofyziologických typů (Baxter *et al.*, 2002; Nelis *et al.*, 2002). Kondukční studie (NCS) u *GDAP1* pacientů ukazují vesměs výrazné snížení amplitud (CMAP). Rychlosti vedení (NCV) jsou kompatibilní jak s CMT2 u většiny pacientů, (Cuesta *et al.*, 2002; Nelis *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2003; Ammar *et al.*, 2003; Birouk *et al.*, 2003; Azzedine *et al.*, 2003; DiMaria *et al.*, 2004) tak s CMT1 u několik málo pacientů (Baxter *et al.*, 2002; Nelis *et al.*, 2002; Ammar *et al.*, 2003; Senderek *et al.*, 2003; DiMaria *et al.*, 2004). NCV nejsou tak výrazně sníženy jako u pacientů s některými těžkými demyelinizačními a hypomyelinizačními neuropatiemi (Gabreëls-Festen *et al.*, 1990) a u většiny zapadají tak také do definice intermediárního typu (Baxter *et al.*, 2002; Senderek *et al.*, 2003; DiMaria *et al.*, 2004).

Biopsie nervu mají znaky axonální degenerace a různě vyjádřené demyelinizace, přičemž konzistentním nálezem v biopsiích nervu u pacientů s *GDAP1* mutacemi se ukazuje být ztráta velkých myelinizovaných axonů. (Baxter *et al.*, 2002; Nelis *et al.*, 2002; Amnar *et al.*, 2003; Boerkoel *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2003; Senderek *et al.*, 2003; Birouk *et al.*, 2003; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003). Zda se u některých pacientů jedná skutečně o primárně demyelinizační neuropatii, není stále jasné. V literatuře se setkáváme s dvojím

označením, CMT4A pro demyelinizační (OMIM #214400) a CMT4C4 pro axonální typ (OMIM #607706). Pro již zmíněné výrazně snížené amplitudy v NCS a prevalentní lokalizaci GDAP1 v neuronech někteří autori pokládají tento typ za primárně axonální s různým stupněm sekundární demyelinizace a používají jednotné označení CMT4A (*Pedrola et al., 2005*). Jiní považují za příčinu nevýrazného snížení rychlostí vedení nervem již uvedenou ztrátu velkých myelinizovaných axonů (*Senderek et al., 2003*).

Jednoznačná souvislost genové poruchy a fenotypu neexistuje, ani co se týče klinického obrazu. Většina *GDAP1* mutací způsobuje těžkou neuropatii s časným začátkem a s autosomálně recesivním typem přenosu. Ačkoliv nedávno byly popsány dvě mutace segregující s onemocněním dominantním způsobem u pacientů s mírným fenotypem a naopak u postižených s těžkou neuropatií a atrofií optického nervu (*Claramunt et al., 2005*). Jedna z mutací způsobující v heterozygotním stavu mírný fenotyp byla dříve popsána u pacienta s těžkou neuropatií ve složeném heterozygotním stavu (*Ammar et al., 2003*). Navíc byly popsány dvě *GDAP1* rodiny se znaky ARCMT2 a postižení pyramidových drah (*Barhoumi et al., 2001; Biancheri et al., 2006*). U jedné z nich byl nález *GDAP1* mutace v homozygotním stavu stejně jako u jiného pacienta s „klasickou“ CMT (*Biancheri et al., 2006; Di Maria et al., 2004*).

2. Cíle studie

V rozsáhlém jediném souboru CMT rodin shromážděném od roku 1997 v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM nebyla genetická příčina v době zahájení studie v roce 2003 po vyšetření na dosud známé nejčastější příčiny CMT (duplikace *PMP22* genu, mutace v *MPZ* a *GJB1* genu) přibližně u poloviny vyšetřených pacientů nalezena. V posledních letech bylo identifikováno mnoho dalších genů a lokusů spojených s řadou klinických obrazů u CMT.

K vytvoření efektivních molekulárně-genetických vyšetřovacích algoritmů vycházejících z dané populace a z klinického obrazu pacienta je nutno stanovit frekvenci a spektrum mutací v jednotlivých genech. Dále je nezbytné znát a popsat co nejpřesněji příslušný klinický a elektrofyziologický fenotyp spojený s konkrétní genovou poruchou. Tato studie se zaměřila na AR geny, které zatím nebyly v naší laboratoři testovány. Geny *GDAP1* a *PRX* byly vybrány na základě záchytu mutací v jiných populacích popsaného v literatuře (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>).

Studie měla tyto cíle:

- zjistit relativní zastoupení jednotlivých typů dědičnosti v dosud shromážděném souboru CMT rodin v České republice, především podíl autosomálně recesivních (AR) rodin a rodin se sporadickým výskytem CMT.
- detekovat patogenní mutace v genech *PRX* a *GDAP1* u vybraných CMT pacientů z rodin s AR rodokmenem a z rodin se sporadickým výskytem onemocnění.
- zjistit frekvence výskytu mutací v genech *PRX* a *GDAP1* mezi testovanými pacienty, jejich spektrum a zjistit případné prevalentní mutace v české populaci.

- upřesnit neurologický a elektrofyziologický obraz u CMT4F a CMT4A (CMT4C4) pacientů, event. provést korelace genotypu a fenotypu.
- navrhnout algoritmus molekulárně-genetického vyšetření českých pacientů na typy CMT4F a CMT4A (CMT4C4).

3. Pacienti a metody

3.1 Určení podílu jednotlivých typů dědičnosti v souboru CMT rodin

Byla vytvořena elektronická databáze CMT pacientů v České republice. Zastoupení jednotlivých typů dědičnosti v celkovém souboru CMT rodin bylo zjištěno pomocí programu MS Access.

3.2 Výběr pacientů

Pacienti pro molekulárně genetické studie byli vybíráni z databáze CMT rodin DNA laboratoře Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM, která v době prvního výběru obsahovala materiál nashromážděný po dobu její pětileté existence. Během čtyřletého trvání studií byli do testování dále zařazováni nově přijatí pacienti, celkem se tedy vybíralo z více než 1000 CMT rodin.

Pacienti na vyšetření mutací v jednotlivých genech byli vybíráni dle kritérií zohledňujících elektrofyziologický typ neuropatie, způsob dědičnosti a věk při začátku onemocnění. Tato kritéria byla vytvořena námi na základě prostudované literatury. U všech byly vyloučeny nejčastější genetické poruchy, duplikace a delece genu *PMP22*, u většiny také mutace v genech *MPZ* a *GJB1*, a u některých méně časté mutace v genech *EGR2*, *SIMPLE*, *NEFL* a *PMP22*.

Kritéria pro výběr pacientů na vyšetření PRX genu

- rodiny se sporadickým výskytem CMT, nebo s výskytem CMT u dvou a více sourozenců zdravých rodičů, rodiny s dominantním přenosem vyloučeny

- manifestace onemocnění do 20 let věku
- demyelinizační typ neuropatie

PRX gen byl vyšetřen u 59 pacientů z 55 rodin. Osm rodin mělo AR přenos onemocnění, dva a více postižených sourozenců zdravých rodičů. V souboru byli čtyři nepříbuzní romští pacienti. Vyšetření *PRX* genu probíhalo v letech 2005-2007.

Kritéria pro výběr pacientů na vyšetření GDAP1 genu

- rodiny se sporadickým výskytem CMT, nebo s výskytem u dvou a více sourozenců zdravých rodičů, rodiny s dominantním přenosem CMT vyloučeny
- začátek onemocnění v 1. dekádě života
- axonální nebo demyelinizační typ neuropatie

GDAP1 gen byl vyšetřen u 74 pacientů z 69 CMT rodin. Devět rodin mělo AR rodokmen, dva a více stejně postižených sourozenců zdravých rodičů. Vyšetření *GDAP1* genu probíhalo v letech 2003-2006. Celkem bylo vyšetřeno 14 AR CMT rodin a 84 rodin se sporadickým výskytem CMT.

3.3 Odběr materiálu a izolace DNA

Krevní vzorky byly odebrány do zkumavek s EDTA, sliny do speciálních kitů (Oragene, Kanada). DNA byla izolována z leukocytů periferní krve standardními metodami na ÚBLG FNM nebo na pracovištích, která vzorky zaslala k vyšetření. Izolace DNA ze slin byla prováděna v DNA laboratoři podle návodu výrobce kitů (kity Oragene, Kanada – www.dnagenotek.com).

3.4 Molekulárně genetická vyšetření *GDAP1* a *PRX* genu

PCR. Gelová elektroforéza

Kódující exony s přilehlými intronovými úseky vyšetřovaných genů *GDAP1* a *PRX* byly namnoženy polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) v 6 a 14 fragmentech. PCR primery byly převzaty z publikací (*Cuesta et al., 2002*) nebo z jiných laboratoří (Institut für Humangenetik, Friedrich-Alexander Universität Erlangen). Sekvence primerů a podmínky PCR jsou v tabulkách (Tab. 3-6).

PCR produkty byly následně elektroforeticky separovány v 1,5% agarosovém gelu s obsahem interkalačního činidla EtBr, vizualizované na UV transluminátoru a vyfotografované.

Sekvenování kódující oblasti. Analýza dat

K odstranění reaktantů po proběhlé PCR bylo použito několik metod: manuální přečištění pomocí kolonek Qiagen QIAquick (Qiagen Inc.), enzymatické přečištění Exo/Sap I (MBI Fermentas) a automatické přečištění pomocí multipipetovacího robotu Tecan (Tecan Ltd.) využívajícího filtrační destičky Millipore (Millipore, USA) a robotu Beckman Biomek (Beckman Coulter Inc.) fungujícím na principu vazby DNA na magnetické částice přečišťovacího roztoku Ampure.

Pročištěný PCR produkt byl použit jako templát pro sekvenační reakci, použitý byl kit Big Dye Terminator V3.1 Kit (ABI, USA). Sekvenační produkty byly následně přečištěny precipitací s kyselým ethanolem nebo pomocí robotu Tecan a destiček Millipore a robotu Beckman Biomek a přečišťovacího roztoku CleanSeq. Po rozpuštění ve formamidu byly analyzovány na sekvenátorech ABI 3730, ABI 3130, ABI 3100Avant a ABI 310 (Applied Biosystems, USA).

K analýze nukleotidových sekvencí byl použit software SeqMan (DNASTAR Inc., USA) a SeqScape (ABI, USA). Aktuální sekvence byla porovnávána s referenční sekvencí (*GDAPI* – NC_000008.9, NM_018972.2, *PRX* – NC_000019.8, NM_020956.2, NM_181882). Každá odlišnost v nukleotidové sekvenci byla porovnávána s databází známých variant genů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Při nálezu dosud neznámé, dosud nepopsané varianty genové sekvence následovalo vyšetření kontrolní skupiny. Nalezená nová varianta v *GDAPI* genu c.571C>T byla vyšetřena u 150 zdravých kontrol, tj. na 300 chromosomech kitem SNaPshot Multiplex Kit (ABI, USA). Nová varianta v *PRX* genu c.3286_3354del71 byla vyšetřena u 94 kontrol, tj. na 188 chromosomech porovnáním délky PCR produktů.

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) a RNA analýza u pacientů jedné z rodin s nenalezenou druhou patogenní mutací k detekci velkých delecí a chybnému setřihu byla provedena na zahraničním pracovišti (Ústav neuropatologie Univerzita Cáhky).

Gen/Exon	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 3' - 5'
PRX		
3	ACCCTGCTTTCTCCCTGTAAG	GTCTCCTTGCTGCCCTAGTCT
4	TGTATATGAGCCACTGTTGAGC	GGTCAGTTTCAGCCTCTCTTT
5	GCTGGGGATTGGAGAACTAA	GGGTGGAATTAGCTTGGGTTA
6_1	AGGTGGGGCTCTTCCTGTC	AAGCCACCAGCTGCCTCT
6_2	GTTTCACAGCCCCTCAGGT	ATTCGAAGTCTGGGACCTTTC
6_3	AAGTTGCTGAGGCCAAGGTAG	TTCATCTCCGACACTTTCAGC
6_4	GCCCAAAGTGTGAGAGATGA	ACTTTCGGGAGCTGCACTT
6_5	AACTCCCTGAGGTGAACTCC	CATCTTGAAGCCAAATTCCAT
6_6	ATCTTCCGAAGGCACCAGAG	GAACTTGGGAAGAGGGCTTGAC
6_7	GTTGAAATTGTCACCCACAG	AAAGGAAGGCATCTTCAGCTT
6_8	GCTGAGTTGGAGGGCAAG	GGCAGAGACAGGGTCACCT
6_9	TCAGAGTACAGTCCCTTCAGCA	AGCCTGAGTTTGGGGCTCT
6_10	GACACAAGCTCAAGGTACGG	CTGACTAGGGGCTTCAGACA
6_11	GACCAGGAAGAGGGTGGATT	CCGCCCTGACTCTTCTCA
GDAP1		
1	GCCCTTCATAACCAGGGTCTC	GCCCGATCCGCGCCACCCTCCG
2	GGCTGCTTAGCGGTGTCCAGGG	GGGAACACATAGTTGTGTTG
3	GCTTTTGAGTGTAACAACATCATG	GACCATGAGACATGCTAGGTC
4	CAGGGTAAGCCCAAGGCAGAG	GTAGAACATTTACTCCGTGCAG
5	GGCTGAACTCTGTAAGAATTTG	GACCTAAGAATGTTCCCATG
6	GAGACCACTGATACCAGCTGG	CAGAGAGCCACGGGCAATCAC

Tab. 3 Primery použité k PCR amplifikaci a přímému sekvenování genů *PRX* a *GDAP1*.

Gen	DNA polymeráza/ premix
PRX	WinTaq (Institut lékařské genetiky Erlangen) Plain PP Master Mix (Top Bio s.r.o., ČR)
GDAP1	Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA) Plain PP Master Mix (Top Bio s.r.o., ČR)

Tab. 4 DNA polymerázy/ premixy použité k PCR amplifikaci genů *PRX* a *GDAP1*.

Krok	Teplota (°C)	Trvání (min)	Cykly
1	94	3:00	
2	94	0:20	
3	65 (64)	0:20	10 cyklů (kroky 2–4)*
4	68 (72)	0:40	
5	94	0:20	
6	55 (54)	0:20	35 cyklů (kroky 5–7)
7	68 (72)	0:20	
8	68 (72)	10:00	
9	4	∞	

Tab. 5 Program pro PCR amplifikaci fragmentů *GDAP1* genu použitím Plain PP Master Mix. Teploty uvedené v závorce byly použity pro fragmenty s exonem 5 a 6. * V kroku 3 je v každém cyklu anealingová teplota snižována o 1°C.

Krok	Teplota (°C)	Trvání (min)	Cykly
1	94	3:00	
2	94	0:30	
3	61	0:45	
4	68	0:45	2 cykly (kroky 2–4)
5	94	0:30	
6	59	0:45	
7	68	0:45	2 cykly (kroky 5–7)
8	94	0:30	
9	57	0:45	
10	68	0:45	2 cykly (kroky 8–10)
11	94	0:30	
12	55	0:45	
13	68	0:45	2 cykly (kroky 11-13)
14	68	20	
15	15	∞	

Tab. 6 Program pro PCR amplifikaci *PRX* genu použitím WinTaq polymerázy.

3.5 Haplotypová analýza lokusu 8q13-q21

Haplotypová analýza v českých rodinách s nalezenými mutacemi v *GDAP1* genu L239F a R191X a v jedné italsko-německé rodině s L239F byla provedena vyšetřením 6 mikrosatelitových markerů D8S279, D8S286, D8S551, D8S1474, D8S548 a D8S1829 pokrývajících oblast okolo genového lokusu o délce ~2970 kb a 2 intragenových single nucleotide polymorfismů (SNP) rs16938893 (c.507T>G, p.Ser169Ser) a rs3739345. DNA německé rodiny byla poskytnuta belgickými kolegy z University v Antverpách. STR polymorfismy byly amplifikovány pomocí PCR s použitím primerů, z nichž vždy jeden z páru byl fluorescenčně značený, a separovány v ABI 310 kapilárním genetickém analyzátoru (<http://www.gdb.org/>). Oblasti obsahující SNP byly k určení genotypu sekvenovány.

Dále byly stanoveny frekvence všech detekovaných alel jednotlivých markerů vyšetřením 50 nepříbuzných českých jedinců s negativním nálezem testovaných *GDAP1* mutací (100 chromozomů). Pravděpodobnost nálezu haplotypů asociovaných s mutací L239F nebo R191X mezi normálními českými chromozomy byly vypočítány vynásobením jednotlivých alelových frekvencí.

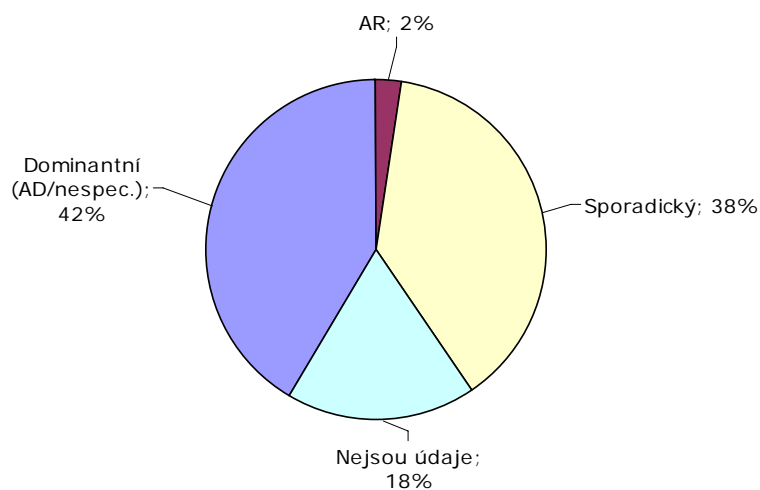
3.6 Klinická a elektrofyziologická vyšetření pacientů s nalezenými mutacemi

Rodiny s nalezenými mutacemi byly pozvány ke konzultacím a dovyšetření na ambulance Neurologické kliniky dospělých a Kliniky dětské neurologie UK 2.LF a FNM a Neurologické kliniky FTN. Pacienti byli klinicky neurologicky vyšetřeni pod dohledem atestovaného neurologa a u některých byly poté provedeny kondukční studie periferních nervů. Klinické údaje o průběhu onemocnění byly získávány z lékařské dokumentace.

4. Výsledky

4.1 Podíl AR a sporadických forem v souboru CMT rodin

Relativní zastoupení jednotlivých typů dědičnosti v celkovém souboru českých CMT rodin s jak známou, tak neobjasněnou genetickou příčinou nemoci, shromážděným k 1.4.2007 je znázorněno v grafu (Obr. 3).



Obr. 3 1150 rodin shromážděných k 1.4.2007.

U 42% CMT rodin je dominantní (autozomálně nebo X-vázaně) typ dědičnosti u onemocnění. Rozsahem podobná skupina, 38% se sporadickým výskytem CMT v rodině může zahrnovat jak pacienty s de-novo dominantními mutacemi, tak pacienty s AR formami. Klinicky nepochybný AR typ dědičnosti onemocnění (tedy dva a více stejně postižených sourozenců v rodině zdravých rodičů) se vyskytuje u 2% českých CMT rodin, tedy 23 rodin. U zbytku rodin není dostatek dat o zdravotním stavu příbuzných pacienta k určení typu

dědičnosti onemocnění v rodině. Podíl sporadického výskytu CMT mezi rodinami s neobjasněnou genetickou příčinou CMT stoupá na 48% (data nejsou zobrazená).

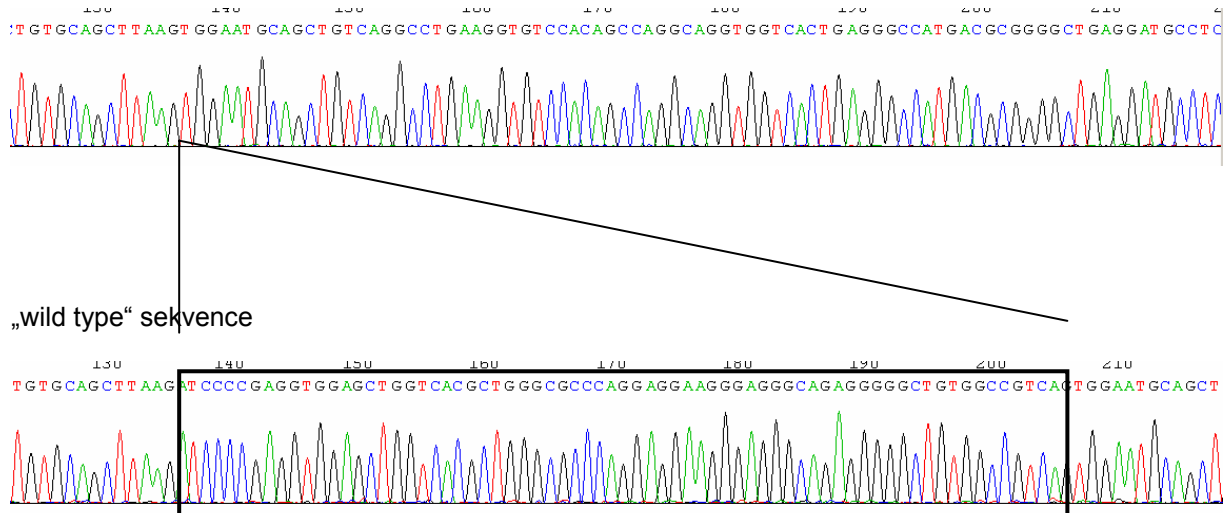
4.2 Výsledky molekulárně genetického vyšetření *PRX* genu

Z 59 pacientů z 55 rodin včetně 4 nepříbuzných romských pacientů byla přímým sekvenováním *PRX* genu patogenní mutace na obou genových alelách prokázána pouze u jediného pacienta romského původu. U žádného z vyšetřených pacientů nebyla prokázána mutace na pouze jedné alele genu. Další odchylky od referenční sekvence *PRX* genu charakteru nukleotidových záměn jsme vzhledem k výsledným aminokyselinovým záměnám za stejné aminokyseliny (AMK) nebo AMK s podobnou strukturou, vyhodnotili jako polymorfismy. Jejich frekvenci udává tabulka (Tab. 7).

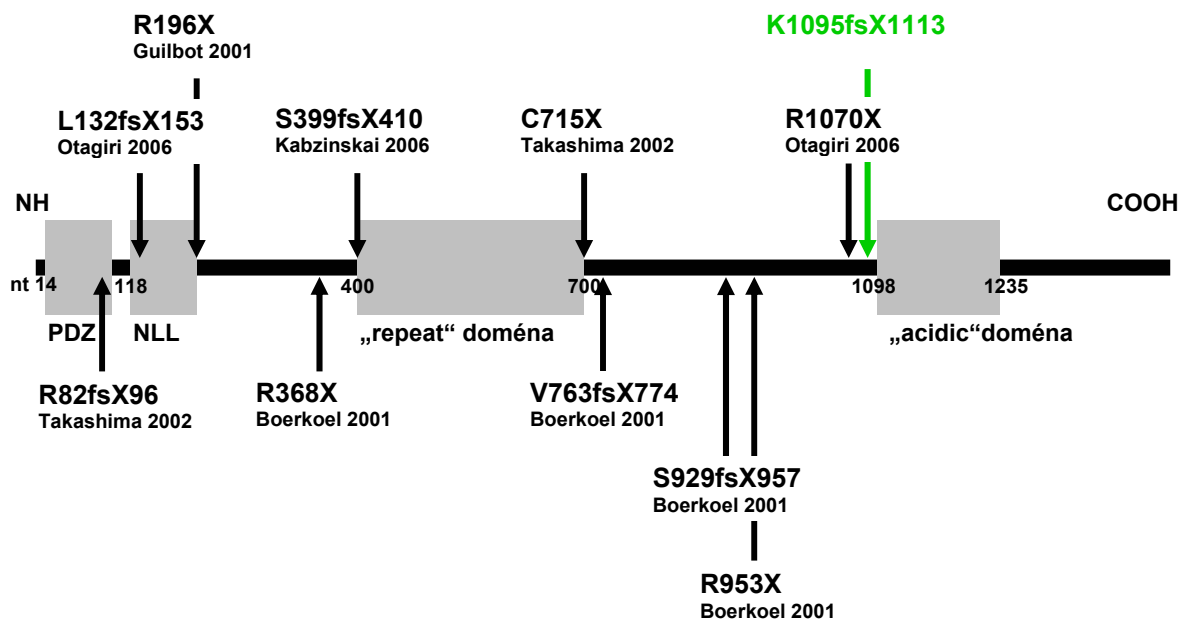
Zatím nepopsaná delece 71 párů bazí v posledním exonu *PRX* genu mezi pozicemi 3286 a 3356 má za následek posun čtecího rámce s předčasným zařazením stop kodonu v pozici 1113 (Obr. 4). To způsobuje chybění karboxylového konce proteinu a větší části kyselé („acidic“) domény (Obr. 5). DNA biologických rodičů adoptovaného romského chlapce k potvrzení nosičství mutace a úplné informace o biologické rodině nebyly k dispozici. Matka údajně neměla známky CMT a otec pacienta rovněž romského původu pochází z Maďarska. Mutace nebyla zachycena mezi 188 chromozomy 94 zdravých nepříbuzných Romů.

PRX pacient

5'Gln Val Leu Lys Trp Asn Ala Ala Val Arg Pro Glu Gly Val His Ser Arg Ala Gly Gly His stop 3'



Obr. 4 Delece 71 párů bazí (černý rámeček) v sedmém exonu *PRX* genu v homozygotním stavu u jednoho pacienta, adoptovaného chlapce romského původu. DNA rodičů nebyla k dispozici k prokázání heterozygotního stavu mutace.



Obr. 5 L-Periaxin s vyznačenou pozicí námi detekované mutace K1095fsX1113 (zeleně). Mutace zkracuje protein o většinu kyselá domény. Jedná se o nejvíc „downstream“ položenou *PRX* mutaci.

Polymorfizmus	Změna AMK	Frekvence
78 G>A	Gln26Gln	2%*
86 T>C	Val29Ala	1%*
97 A>G	Asn33Asp	1%*
306 C>T	Thr102Thr	16%
731 C>T	Ala244Val	4%*
1216 G>A	Ala406Thr	3%
1561 G>C	Gln521Glu	3%*
1574 T>C	Val525Ala	1%*
1647 G>C	Pro549Pro	3%*
2645 C>T	Ala882Val	54%
2655 T>C	Pro885Pro	54%
2763 A>G	Ile921Met	40%
3248 C>G	Pro108Arg	18%
3373 G>A	Gly1125Ser	1%*
3394 A>G	Arg1132Gly	5%

Tab. 7 Nalezené nukleotidové záměny v sekvenci *PRX* genu charakteru polymorfismů a jejich četnost v našem souboru vyšetřených CMT pacientů.

* nepopsané

4.3 Klinické a elektrofyziologické nálezy u pacienta s mutací v *PRX* genu

Pacient je adoptované dítě romského původu. U chlapce byla ve věku 3 měsíců pozorována svalová hypotonie a opoždění motorického vývoje. Samostatné chůze byl schopen ve 21 měsících věku. Chůze byla nestabilní s častými pády. Ve 2 letech rodiče pozorovali mírný pes cavus. Ve 3 letech byl po podezření na CMT poprvé elektrofyziologicky vyšetřen s nálezem nevýbavných odpovědí na motorických a senzitivních nervech dolních končetin a senzitivních nervech horních končetin a výrazně snížených rychlostí vedení a amplitud CMAP na motorických nervech horních končetin (Tab. 8). Ve 4 letech byl hospitalizován pro myalgie lýtek, které vznikly po angíně. Laboratorní vyšetření ukázalo zvýšenou myoglobinémií 315,8 ng/ml. Třídenní epizoda byla uzavřena jako ataka rabdomyolýzy. V 5 letech podstoupil oboustrannou plantární aponeurotomii, po které se deformita nohy částečně upravila. V posledním neurologickém nálezu v tomto věku kompletně chybí myotatické reflexy a je nestabilní chůze (Tab. 9). Výsledky nervových kondukčních studií jsou podobné s nálezem ve 3 letech (Tab. 8).



Věk (roky)	3	5
<i>Motorické nervy</i>		
<i>N.tibialis</i>	NR	NR
<i>N.medianus</i>		
<i>DML (ms)</i>	24.8	11
<i>MNCV (m/s)</i>	19	17
<i>CMAP (mV)</i>		
<i>zápěstí</i>	0.05	0.6
<i>loket</i>	0.5	0.8
	temporální disperze	
<i>F-vlna</i>	n	n
<i>N.ulnaris</i>		
<i>DML (ms)</i>	19.1	23
<i>MNCV (m/s)</i>	a	23
<i>CMAP (mV)</i>		
<i>zápěstí</i>	0.4	0.05
<i>loket</i>	0.2	0.1
	temporální disperze	
<i>F-vlna</i>	n	n
<i>Senzitivní nervy</i>		
<i>N.suralis</i>	NR	NR
<i>N.medianus</i>	NR	NR
<i>N.ulnaris</i>	NR	NR

Tab. 8 Elektrofyziologický nálezu pacienta s mutací v *PRX* genu ve věku 3 a 5 let.

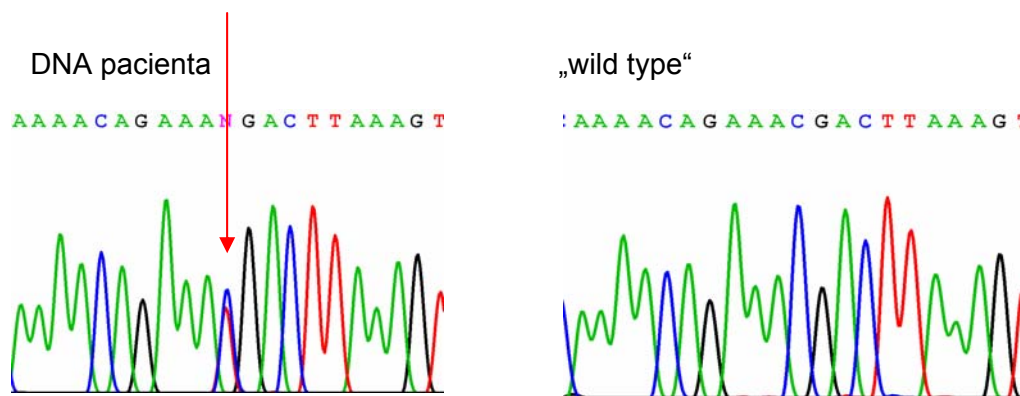
DML distální motorická latence, MNCV rychlost vedení motorický nervem, CMAP složený svalový akční potenciál, NR nevybavitelná odpověď, ⁿ neprovedeno, ^a nevyhodnoceno

<i>Hlavové nervy</i>	normální nález
<i>Deformita nohy</i>	pes cavus
<i>Dorzální flexe nohy vpravo, vlevo (MRC)</i>	5, 5/5
<i>Proximální slabost DK</i>	ne
<i>Atrofie DK</i>	lehké nohou
<i>Reflexy na DK</i>	chybí
<i>Chůze</i>	nestabilní, bez opory
<i>Atrofie HK</i>	ne
<i>Distální slabost nebo nešikovnost HK</i>	ne
<i>Proximální slabost HK</i>	ne
<i>Reflexy na HK</i>	chybí
<i>Taxe na HK a DK</i>	normální
<i>Porucha čítí</i>	ne
<i>Deformita páteře</i>	ne

Tab. 9 Klinický neurologický nález u pacienta s mutací v *PRX* genu v 5 letech.
MRC Medical Research Council Scale, DK dolní končetiny, HK horní končetiny

4.4 Výsledky molekulárně genetického vyšetření *GDAP1* genu

V kódující sekvenci *GDAP1* genu byly detekovány pouze dvě různé bodové mutace, missense c.715C>T (p.Leu239Phe, L239F) (již dříve popsána *Ammar et al., 2003*) a dosud nepopsaná nonsense c.571C>T (p.Arg191Stop, R191X) (Obr. 6).

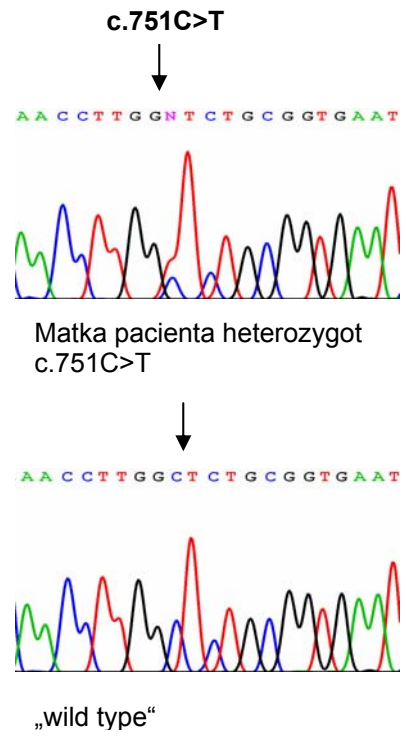
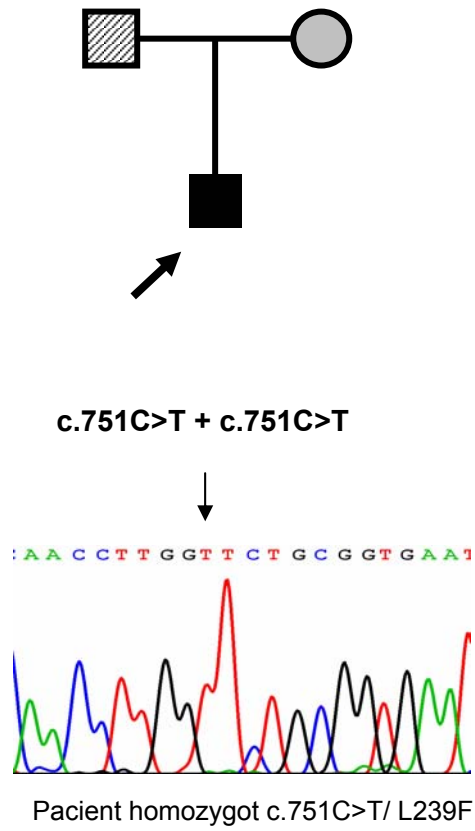


Obr. 6 Mutace c.571C>T, p.Arg191stop, R191X v exonu 4 *GDAP1* genu způsobuje předčasné zařazení stop kodonu. Zkracuje tak *GDAP1* protein před funkční GST_C a transmembránovými doménami, které správně lokalizují *GDAP1* do mitochondriální membrány (Marco *et al.*, 2004; Pedrola *et al.*, 2005). Mutace byla nalezena ve dvou rodinách v heterozygotním (rodina 5) a složeném heterozygotním stavu (rodina 2).

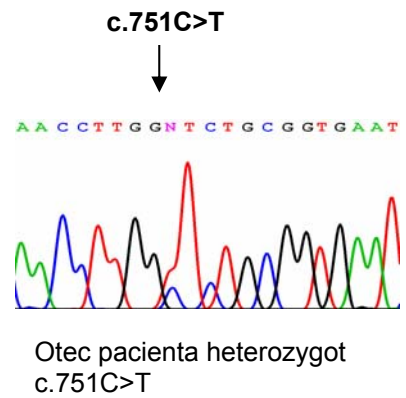
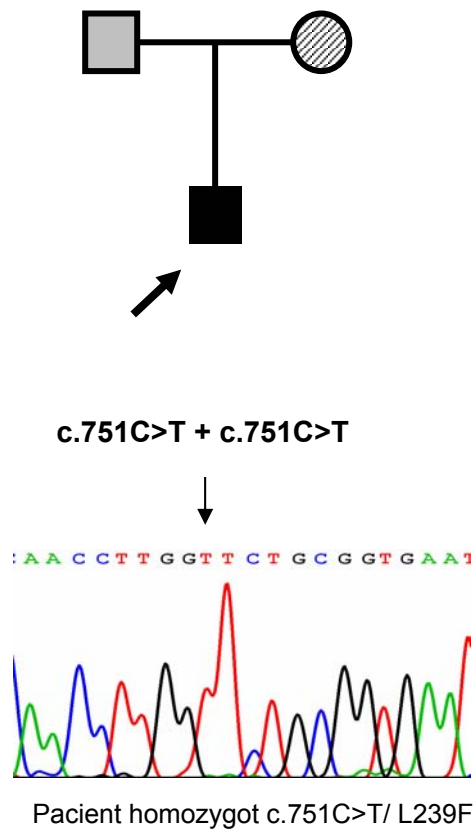
Aspoň jedna patogenní mutace byla nalezena u šesti pacientů z pěti nepříbuzných rodin, tedy u 7,2% ze 69 vyšetřených rodin. Mutace v obou alelách byly detekovány u třech sporadických CMT pacientů (4,3% vyšetřených rodin), a to u jednoho složeného heterozygota c.715C>T, c.571C>T a u dvou homozygotů c.715C>T. K průkazu heterozygotního stavu c.715C>T v rodičovské generaci u homozygotů byla k dispozici DNA pouze od jednoho z rodičů. Druhá patogenní mutace nebyla identifikována u jednoho sporadického pacienta heterozygota c.715C>T a u dvou sourozenců heterozygotů pro c.571C>T (Obr. 7). V obou rodinách byla mutantní alela přenesena od nepostíženého rodiče (Tab. 11, 13).

Mutace c.715C>T (L239F) detekovaná na šesti z osmi mutantních alel je tedy v české populaci nejčastější. Mutace byla popsána ve složeném heterozygotním stavu v jedné německo-italské rodině (Ammar *et al.*, 2003). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) provedená za účelem detekovat druhou patogenní mutaci u rodiny 5 neprokázala delecí exonu ani abnormální sestřih mRNA. Nová mutace R191X nebyla detekována vyšetřením 300 chromosomů 150 zdravých nepříbuzných kontrol.

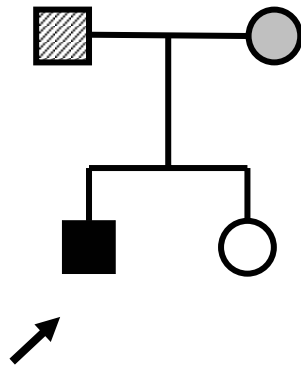
Rodina 1



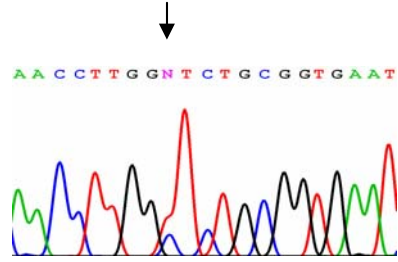
Rodina 2



Rodina 3

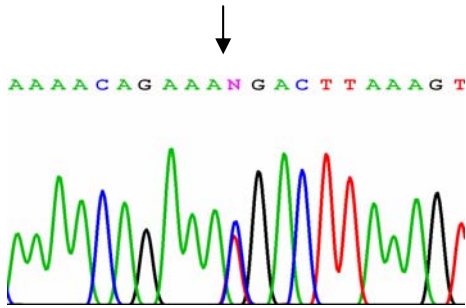


c.751C>T

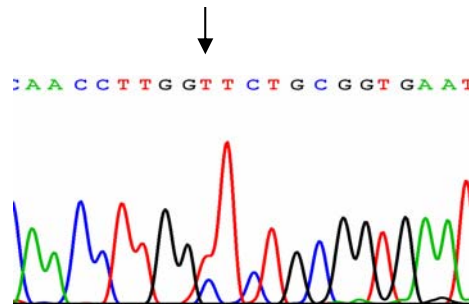


Matka pacienta heterozygot
c.751C>T

c.571C>T

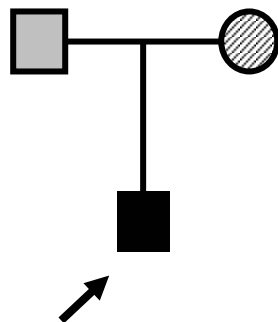


c.751C>T

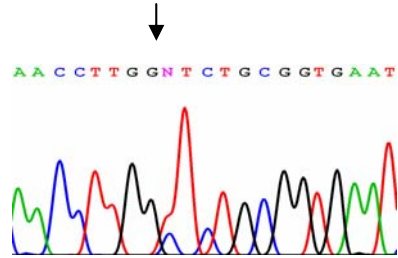


Pacient heterozygot c.571C>T, c.751C>T/ R191X, L239F

Rodina 4

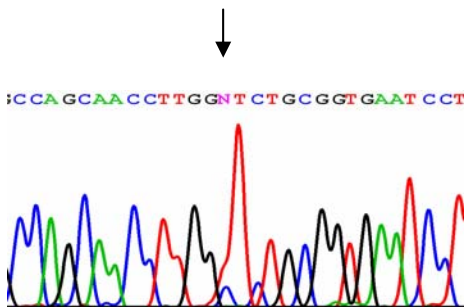


c.751C>T



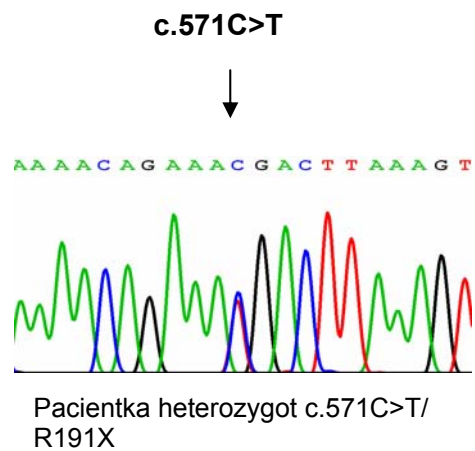
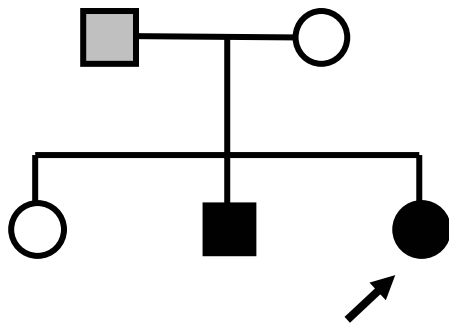
Otec pacienta heterozygot
c.751C>T

c.751C>T



Pacient homozygot c.751C>T/ L239F

Rodina 5

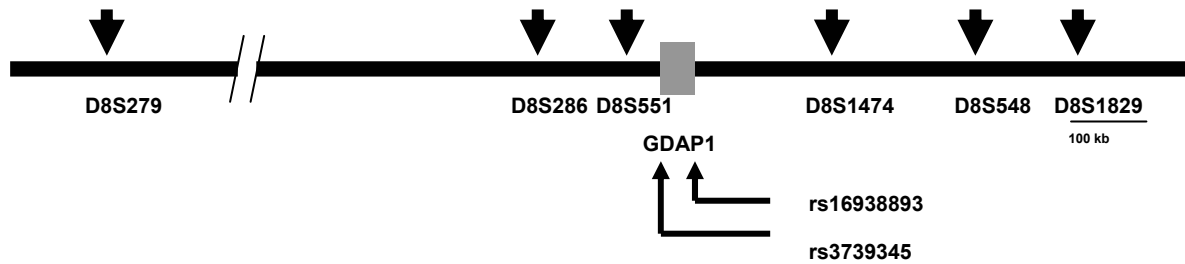


Obr. 7 Chromatogramy mutací v *GDAP1* genu identifikovaných v 5 českých rodinách. Mutace jsou označeny černou šipkou. Všechny rodiny vykazují rodokmen kompatibilní s AR typem dědičnosti. Kulaté symboly značí ženy a čtverečky muže. Černé symboly značí jedince postižené CMT, šedé geneticky vyšetřené zdravé přenašeče mutací, čárkovaně pravděpodobné/nevyšetřené přenašeče. Stejný genotyp postiženého bratra pacientky z rodiny 5 není zobrazen.

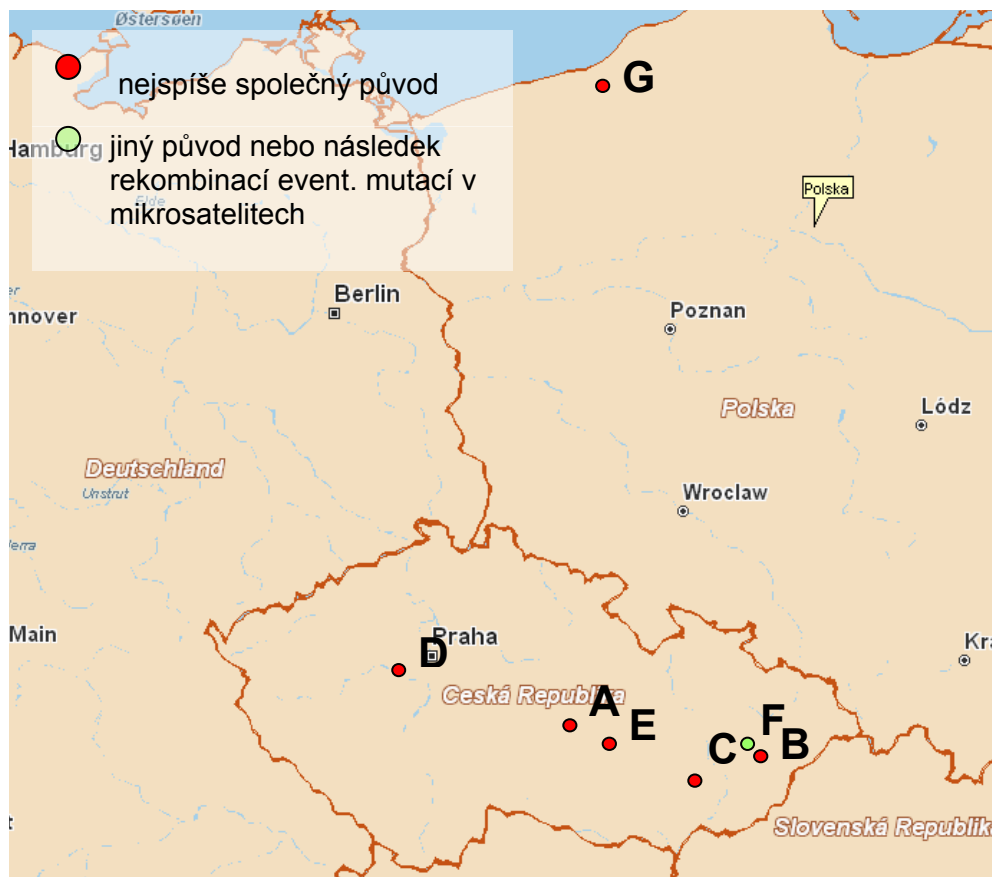
4.5 Výsledky haplotypové analýzy lokusu 8q13-q21

Za účelem zjistit, zda je výskyt L239F mutace u nás frekventní následkem efektu zakladatele nebo následkem opakovaného vzniku v jednom místě tzv. „hot spot“, byly sestrojeny haplotypy čtyř českých a jedné německo-italské rodiny s L239F. Nosiče mutace L239F jsme vyšetřili pomocí šesti mikrosatelitových markerů pokrývajících genový lokus a dvou intragenových SNPů (Obr. 8). Haplotypová fáze nebyla kompletně stanovitelná u

pacienta z rodiny 4. Rodiče německého nosiče mutace L239F pochází ze západního Pomořanska, oblasti Polska při polsko-německé hranici. Pět českých L239F chromosomů pochází z Moravy a jeden z Plzeňska (Obr. 9).



Obr. 8 Rozložení mikrosatelitových markerů v okolí *GDAP1* genu a označení intragenových SNPů.



Obr. 9 Mapa výskytu L239F chromozomů.

Čtyři české chromozomy (A, B, C a E z rodiny 1, 2 a 3) a německý chromozom s mutací L239F sdílejí společný užší haplotyp D8S286, D8S551, rs3739345, rs16938893, D8S1474, D8S548 (cca 560 kb). Pravděpodobnost výskytu tohoto haplotypu mezi normálními chromozomy (s vyloučenou L239F mutací) je velmi nízká, t.j. méně než $7,34 \times 10^{-6}$. Náhodná shoda alel vyšetřených markerů v L239F chromozomech je tedy vysoce nepravděpodobná. Český chromozom A a německý chromozom se navíc shodují ve všech analyzovaných markerech (cca 2970 kb). V porovnání se sdíleným úzkým haplotypem má chromozom D (Plzeňsko) o jednu repetici kratší alelu markeru D8S1474 avšak shodu ve vzácné alele 278 markeru D8S551 (frekvence v české populaci <1%). Další odlišující se chromozom F má shodu s úzkým haplotypem jenom v markeru D8S286 a v obou vyšetřovaných SNPech předpokládajíc haplotyp T-G (Obr. 10).

Všechny markery u rodin 3 a 5 segregují s mutací R191X. Pravděpodobnost výskytu tohoto haplotypu v české populaci je ještě nižší, t.j. méně než $6,59 \times 10^{-8}$.

L239F

Rodina/ Chromozom	Původ	D8S279	D8S286	D8S551	GDAP1		D8S1474	D8S548	D8S1829
					rs3739345	c.507T/G			
1/A	Morava	250	229	278	T	G	177	234	113
1/B	Morava? ^a	246	229	278	T	G	177	234	113
2/C	Morava ^b	246	229	278	T	G	177	234	103/111
2/D	Plzeňsko	226	229	278	T	G	181	234	103/111
3/E	Morava	226	229	278	T	G	177	234	111
4/F	Morava	250/238	229	276	T/A	G/T	185	232	113

frekvence alel v české
populaci

0.219 <0.01 0.343 0.370 0.075 0.352

G	Pomořansko	250	229	278	T	G	177	234	113
---	------------	-----	-----	-----	---	---	-----	-----	-----

R191X

Rodina	Původ	D8S279	D8S286	D8S551	GDAP1		D8S1474	D8S548	D8S1829
					rs3739345	c.507T/G			
3	střední Čechy	226	235	266	T	G	177	248	113
5	střední Čechy	226	235	266	T	G	177	248	113

frekvence alel v české
populaci

0.323 0.042 0.229 0.343 0.370 0.075 <0.01 0.223

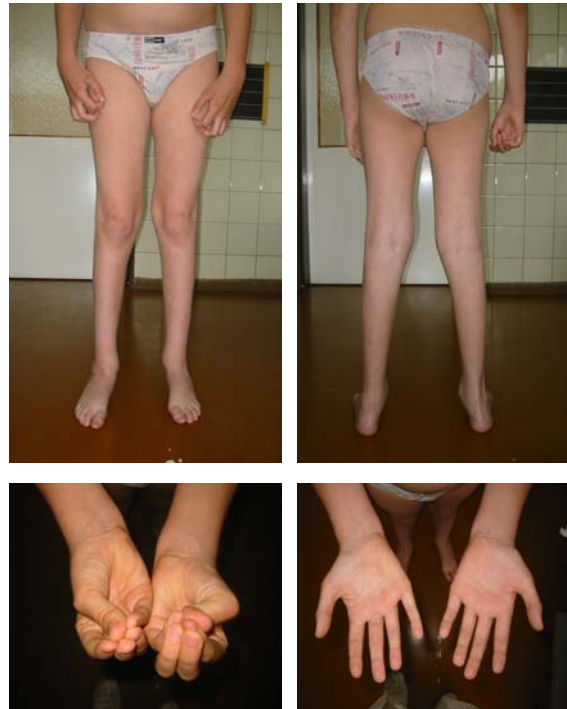
Obr. 10 Haplotypy v pěti českých rodinách a jedné německo-italské rodině s mutacemi v *GDAP1* genu.

^aDNA otce nebyla k dispozici, paternita nebyla ověřována na DNA úrovni, ^bDNA matky nebyla k dispozici pro vyšetření

4.6 Klinické a elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi v *GDAP1* genu

Rodina 1

Pacient ve věku 11 let měl normální časný psychomotorický vývoj, chodil od 12 měsíců věku. Ve 4 letech se u něho vyvinul pes planovalgus. V 6 a 7 letech podstoupil ortopedickou operaci deformity nohy. Neurologické vyšetření v 8 letech prokázalo těžkou distální slabost a atrofie svalstva dolních končetin, chybění reflexů Achillových šlach a snížení patelárních reflexů. Dále byla patrná mírná hypotrofie svalů ruky s lehce sníženou svalovou silou a snížení myotatických reflexů na horních končetinách.



Rodina 2

43 let starý pacient začal chodit v 1 roku věku. Ve 4 letech rodiče pozorovali u chlapce chůzi po vnějších hranách nohy a oboustranný vývoj pes cavovarus. Deformita nohy byla chirurgicky korigována v 7 letech. Vyšetření ve 12 letech ukázalo distální slabost dolních končetin a těžké atrofie svalů nohou a lýtek, biperoneální chůzi, třes prstů a skoliózu. V 19 letech byly atrofiemi postiženy i distální části stehen, reflexy Achillových šlach byly nevybavné a patelární reflexy snížené. Pravý thenar byl postižen lehkou hypotrofií, myotatické reflexy na horních končetinách byly normální. Atrofie interoseálních svalů bez

oslabení síly byly zpozorovány v 29 letech. Od 35 let se rozvinulo oslabení rukou a byla nezbytná opora při delší chůzi pro slabost proximálních svalů dolních končetin.

Rodina 3

Sedmnáctiletý pacient se v prvním roku života psychomotoricky vyvíjel normálně. Ve 2 letech si rodiče všimnuli jeho chůze po špičkách. Ve 4 letech podstoupil prodloužení Achillových šlach. Chůze se zhoršovala v první dekádě progresivní distální slabostí dolních končetin a deformitou nohy pes equinovarus a byla možná jen s dopomocí berlí. Výrazně se zlepšila po druhé ortopedické operaci ve 13 letech a pacient dále oporu vyžadoval jen při delší chůzi. Slabost a atrofie svalů ruky a deformity prstů byly patrné již před jeho zahájením školní docházky v 8 letech.



Rodina 4

U 41 letého pacienta byly první příznaky pozorovány ve 4 letech, kdy se u něho vyvinula deformita nohy pes cavus. Ve 12 a 13 letech podstoupil její chirurgickou korekci. První neurologické a elektrofyziologické vyšetření ve 39 letech prokázalo dobře zachovanou dorzální flexi nohy, výbavné patelární reflexy a normální sílu i neurologický nález na horních končetinách. Pacient si stěžoval jen na nestabilitu kotníků a časté distorze.



Rodina 5

U 22 letého pacienta (5/1) se onemocnění projevilo v jeho 6 letech zkrácením Achillových šlach, vysokou nožní klenbou a nejistou chůzí. Vyšetření v 15 letech prokázalo distální atrofie svalů dolních končetin, areflexii na dolních končetinách, snížené reflexy na horních končetinách, třes rukou a skoliózu. Achillovy šlachy byly chirurgicky korigovány v 16 letech. V 19 letech se objevily atrofie svalů ruky, avšak síla byla



normálně zachovalá. Vyšetření ve 22 letech prokázalo zachovalou dorzální flexi nohy a palců, atrofie na horních končetinách k distálním partiím předloktí a jen mírné oslabení svalů ruky s lehce porušenou jemnou motorikou.

18 letá sestra pacienta (5/2) se rovněž normálně psychomotoricky vyvíjela. V 6 letech byla u ní pozorována chůze po špičkách a inverze pravé nohy. Záhy se vyvinul pes equinovagrus vpravo, pes planovalgus vlevo a stepáž. Neurologické vyšetření ve 13 letech prokázalo atrofie a oslabení svalů ruky, snížené myotatické reflexy na horních končetinách a skoliózu. Deformita pravé nohy byla chirurgicky korigována v 16 letech. Vyšetření v 16



letech prokázalo těžké distální svalové atrofie do poloviny stehen, chůzi s výraznou stepáží, používání šplhání při zvedání se ze sedu, výrazné atrofie a slabost svalů ruky s počínajícími zkraty šlach flexorů prstů a povšechnou areflexií.

Obrázky pacientů odpovídají posledním klinickým vyšetřením. Další klinické a elektrofyziologické nálezy z návštěv pacientů během studie po identifikování genové poruchy jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 10, 12).

Rodina/Pacient	1	2	3	4	5/1	5/2
<i>Genotyp</i>	L239F+L239F	L239F+L239F	L239F+R191X	L239F+?	R191X+?	R191X+?
<i>Věk (r)/ Pohlaví</i>	11/ M	43/ M	17/ M	41/ M	22/ M	18/ Ž
<i>Deformita nohy</i>	pes planovalgus	pes cavovarus	pes planovalgus	pes cavus	pes cavus	pes equinovarus vpravo, pes planovalgus vlevo
<i>Dorzální flexe nohy vpravo, vlevo (MRC)</i>	2,3/5	0,0/5	0,0/5	4+,4+/5	4,4/5	3,1/5
<i>Proximální slabost DK vpravo, vlevo (MRC)</i>	flexe kolene 4,4-/5	flexe kolene 3,2/5, extenze kolene 4+,4/5, extenze kyčle 4,4/5	není	není	není	flexe a extenze kolene a kyčle 4-,4-/5
<i>Atrofie DK</i>	těžké, k distální části stehen	těžké, k distální polovině stehen	těžké, k distální třetině stehen	středně těžké, k distální části stehen	těžké, k distální části stehen	těžké, k distální části stehen
<i>Reflexy na DK</i>	chybí	chybí	chybí	reflexy Achillových šlach chybí	chybí	chybí
<i>Chůze</i>	bez opory	hůl	francouzské berle	bez opory	bez opory	bez opory
<i>Atrofie HK</i>	mírné na rukách	středně těžké na rukách, mírné na předloktích	těžká na rukách – „claw hand“, středně těžká na distálních polovinách předloktí	žádná	lehká na rukách a předloktích	středně těžká na rukách a předloktích
<i>Distální slabost HK vpravo, vlevo (MRC)</i>	stisk ruky 4,4/5, extenze zápěstí 4+,4+/5, flexe zápěstí 4-,4+/5	stisk ruky 4+,4+/5	stisk ruky 3,3/5, extenze zápěstí 4-,3/5, flexe zápěstí 4+,4/5, ztráta zručnosti	žádná	stisk ruky 4+,4+/5	těžké oslabení stisku ruky, přesné údaje nejsou k dispozici
<i>Proximální slabost HK (MRC)</i>	žádná	žádná	žádná	žádná	žádná	žádná
<i>Reflexy na HK</i>	normální	snížené	snížené	normální	snížené	snížené
<i>Porucha čítí</i>	lehká porucha taktilního čítí na DK	žádná	středně těžká porucha taktilního čítí a lehce snížená propriocepce na DK	žádná	lehká porucha taktilního čítí a středně těžká porucha vibračního čítí na DK	žádná porucha taktilního čítí, další údaje nejsou k dispozici
<i>Jiné</i>	žádné	skolióza	třes jazyka	skolióza	skolióza	skolióza

Tab. 10 Souhrn klinických nálezů u šesti českých pacientů s mutacemi v *GDAP1* genu.

Rodina	4	5
Genotyp	L239F heterozygot	R191X heterozygot
Věk(r)/ pohlaví	72/M	57/M
Deformita nohy	ne	ne
Dorzální flexe nohy vpravo, vlevo (MRC)	5,5/5	5,5/5
Proximální slabost DK	ne	ne
Atrofie DK	ne	ne
Reflexy na DK	snížené	normální
Chůze	bez opory	bez opory
Atrofie HK	ne	ne
Distální slabost HK	ne	ne
Proximální slabost HK	ne	ne
Reflexy na HK	normální	normální
Porucha čítí	lehká porucha vibračního čítí na DK	lehká porucha taktilního čítí v distribuci n.medianus

Tab. 11 Klinický obraz nepostižených rodičů, heterozygotů pro nalezené mutace.

Rodina/Pacient			1	2	3	4	5/1	5/2	norma
Věk (r)			8	43	15	41	23	18	
Motorické nervy	<i>n.medianus</i>	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
	<i>n.ulnaris</i>	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
	<i>n.peroneus</i>	DML (ms)	NR	NR	NR	3.2	NA	NA	<5.0
		MNCV (m/s)				45			>39
		CMAP (mV)				3,0			>2.0
<i>n.tibialis</i>	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	
Senzitivní nervy	<i>n.medianus</i>	SNCV (m/s)	NR	44	NR	57	NR	NR	>48
		SNAP (μV)		15		14			>10
	<i>n.ulnaris</i>	SNCV (m/s)	NR	48	NR	55	NA	NA	>48
		SNAP (μV)		15		10			>10
	<i>n.suralis</i>	SNCV (m/s)	NR	40	NR	38	NR	NR	>38
		SNAP (μV)		2,0		5,0			>4.4

Tab.12 Souhrn elektrofyziologických nálezů u šesti českých pacientů s mutacemi v *GDAP1* genu.

Tučně označené hodnoty jsou patologické.

NR nevybavitelná odpověď, NA neprovedeno

Rodina			4	5	norma
Genotyp			L239F heterozygot	R191X heterozygot	
Věk (r)			72	57	
<i>Motorické nervy</i>	<i>n. medianus</i>	<i>DML (ms)</i>	3,6	5,6	<4.0
		<i>MNCV (m/s)</i>	54,1	50,5	>51
		<i>CMAP (mV)</i>	10,3	5,5	>4.2
	<i>n. ulnaris</i>	<i>DML (ms)</i>	2,6	2,8	<2.8
		<i>MNCV (m/s)</i>	56,2	57,1	>50
		<i>CMAP (mV)</i>	10,2	9,9	>5.5
	<i>n. peroneus</i>	<i>DML (ms)</i>	4,6	4,7	<5.0
		<i>MNCV (m/s)</i>	46,7	48,3	>39
		<i>CMAP (mV)</i>	5,1	4,9	>2.0
	<i>n. tibialis</i>	<i>DML (ms)</i>	3,9	NA	<5.5
		<i>MNCV (m/s)</i>	46,2		>40
		<i>CMAP (mV)</i>	11,8		>2.5
<i>Senzitivní nervy</i>	<i>n. medianus</i>	<i>SNCV (m/s)</i>	51,8	36,4	>48
		<i>SNAP (μV)</i>	14,2	5,9	>10
	<i>n. ulnaris</i>	<i>SNCV (m/s)</i>	47,1	48,3	>48
		<i>SNAP (μV)</i>	16,7	7,7	>10
	<i>n. suralis</i>	<i>SNCV (m/s)</i>	46,6	40,6	>38
		<i>SNAP (μV)</i>	6,3	5,4	>4.4

Tab. 13 Elektrofyziologický nále z u nepostižených rodičů, heterozygotů pro nalezené mutace. Tučně označené hodnoty jsou patologické.

5. Diskuse

K dubnu roku 2007 bylo v registru DNA laboratoře Dětské neurologické kliniky 2.LF UK a FNM shromážděných 1150 CMT rodin žijících v České republice s jak známou, tak neobjasněnou genetickou příčinou nemoci. Tato studie je první prací v oblasti molekulárně-genetických příčin AR CMT forem v ČR a jejich klinického fenotypu.

5.1 Zastoupení typů dědičnosti CMT v ČR

Velkou převahou sporadického výskytu onemocnění a dominantního typu dědičnosti nad AR se populace v České republice pochopitelně přibližuje zastoupením jednotlivých typů dědičnosti CMT Evropě. Na tomto vzorci se nejspíše podílí jak nízký výskyt příbuzenských sňatků, tak menší počet potomků v českých rodinách (*Martin et al., 1999; Bouhouche et al., 2007*).

5.2 Mutace c.3286_3354del71 v *PRX* genu

Mutace c.3286_3354del71 se nachází na 3' konci posledního exonu *PRX* genu a tak jako většina popsaných *PRX* mutací nejspíše nezpůsobuje „non-sense mediated decay“ (*Kijima et al., 2004*). Je to nejdále „downstream“ uložená mutace, která zkracuje L-periaxin na začátku kyselé domény. L-periaxin s chyběním větší části této domény není tak pravděpodobně schopen navázat se na cytoskelet Schwannovy buňky a vytvářet stabilní myelin. Průběh onemocnění u našeho pacienta se výrazněji neliší od popsaného fenotypu některých „upstream“ uložených mutací (*Guilbot et al., 2001; Otagiri et al., 2006; Kabzinska et al., 2006*). Domníváme se proto, že mutace c.3286_3354del71 je patogenní a rozšiřuje tak

spektrum „loss-of-function“ mutací v *PRX* genu. Také se přidává k nálezům podporujících funkční roli kyselé domény L-periaxinu (*Boerkoel et al., 2001; Takashima et al., 2002; Kijima et al., 2004; Parman et al., 2004; Otagiri et al., 2006*). Přesné patogenetické působení mutace zbývá otestovat ve funkčních studiích.

Mezi dalšími 54 CMT1 rodinami nebyla nalezena žádná mutace, což ukazuje na vzácný výskyt poruch v *PRX* genu v české populaci.

5.3 Dědičné neuropatie v romské populaci

Romové tvoří geneticky izolovanou populaci. Existují jak nemoci, tak specifické mutace vázané na romské etnikum (*Seeman a Šišková, 2006*). Dosud byly popsány 3 geneticky odlišné typy dědičných neuropatií vyskytující se výlučně v romské populaci a jedna romská mutace (*Kalaydijieva et al., 2001; Kabzinska et al., 2008*). Naše mutace c.3286_3354del71 (p.K1095FsX18) je první romskou mutací popsanou v *PRX* genu. Předpokládali jsme, že tato mutace by mohla být přítomna u zdravých Romů v heterozygotním stavu, ale na vzorku 94 DNA od nepříbuzných osob romského původu jsme tuto domněnku nepotvrdili. Je možné, že jde o vzácnou mutaci i u Romů, nebo že náš kontrolní soubor nebyl dostatečně velký a reprezentativní.

V romské populaci několika evropských zemí byl identifikován typ HMSN-Lom (CMT4D), poprvé popsán v romské rodině z bulharské vesnice Lom (*Kalaydijieva et al., 1996; Chandler et al., 2000*). Za tuto AR demyelinizační neuropatii je odpovědná mutace R148X *NDRG1* genu (*Kalaydijieva et al., 2000*). HMSN je u CMT4D spojena s neurální hluchotou ve 2. a 3. dekádě. Dalším AR CMT typem vázaným na romskou populaci je HMSN-Russe (CMT4G), původně identifikovaným rovněž v Bulharsku ve vesnici Russe (*Thomas et al., 2001; Rogers et al., 2000*). Odpovědný gen je zatím neznámý. Mezi

španělskými Romy je zase rozšířená homozygotní mutace Arg1109X v *SH3TC2* (*KIAA 1985*) genu (*Gooding et al., 2005*). Jiná mutace v tomto genu byla popsána v alžírské populaci. Mutace jsou odpovědné za typ CMT4C (*Kabzinska et al., 2006*). Nejzávažnější fenotyp má syndrom CCFDN (congenital cataract facial dysmorphism neuropathy) způsobený mutací Leu287fs v *CTDPI* genu, jehož součástí je i polyneuropatie demyelinizačního typu. Vyskytuje se taktéž výlučně u Romů (*Angelicheva et al., 1999; Varon et al., 2003*).

5.4 Klinický a elektrofyziologický obraz pacienta s mutací c.3286_3354del71 v *PRX* genu

Shodujíc se s klinickým obrazem v literatuře již popsaných CMT4F pacientů, nemoc u našeho pacienta měla časný začátek s opožděním nástupu samostatné chůze. Poslední neurologické vyšetření v 5 letech ukázalo oboustranný pes cavus, areflexii a nestabilní chůzi. Další progrese onemocnění až dosud odpovídá pomalu progredientnímu průběhu. Na rozdíl od většiny CMT4F pacientů, vibrační, taktilní a nocicepční cití není u našeho pacienta porušeno zřejmě pro postih později v průběhu onemocnění (2. až 6. dekáda) (*Takashima et al., 2002; Kijima et al., 2004; Otagiri et al., 2006*). Kondukční studie prováděné v raném věku ukázaly v nervech s vybavitelnou odpovědí výrazně snížené rychlosti vedení. Diskrepanci mezi velmi nízkými svalovými akčními potenciály n. medianus a n. ulnaris a naprosto normální silou rukou lze vysvětlit značnou temporální disperzí u CMT4F pacientů popisovanou (*Takashima et al., 2002*).

5.5 Frekvence výskytu mutací v *GDAP1* genu mezi českými CMT pacienty

Na přítomnost mutací v kódující sekvenci *GDAP1* genu bylo vyšetřeno celkem 74 pacientů z 69 nepříbuzných českých rodin jak s axonálním, tak s demyelinizačním typem CMT s časným nástupem v první dekádě. Devět rodin mělo AR rodokmen se dvěma postiženými sourozenci zdravých rodičů. Patogenní mutaci na alespoň jedné *GDAP1* alele jsme detekovali u 7,2% (5 ze 69) rodin. Záchyt v jedné z devíti testovaných AR rodin (11%) odpovídá vysokému výskytu *GDAP1* mutací mezi AR rodinami v jiných populacích, 9,3% a 15% ve studiích Ammar a Nelis (Ammar *et al.*, 2003; Nelis *et al.*, 2002). Mezi vyšetřenými rodinami se sporadickým výskytem CMT byl rovněž zaznamenán poměrně vysoký výskyt *GDAP1* mutací, 5% (Claramunt *et al.*, 2005).

5.6 Spektrum mutací *GDAP1* genu v české populaci a jejich původ

Detekovali jsme pouze dvě různé *GDAP1* mutace, dosud nepublikovanou „nonsense“ c.571C>T, R191X a „missense“ mutaci c.751C>T, L239F, která byla popsána v německo-italské rodině (Ammar *et al.*, 2003). L239F představuje 75% mutantních alel *GDAP1* genu v české populaci. Podle haplotypové analýzy německého a šesti českých L239F chromozomů je prevalence mutace L239F v naší populaci následkem efektu zakladatele. Nositelé této mutace tedy mají společného dávného prapředka. Předkové německého nosiče L239F žili v západním Pomořansku při dnešních polsko-německých hranicích, oblasti v minulosti osídlované jak Němci, tak Slovany. U nás je výskyt mutace koncentrován ve východní části země.

V době provádění studie nebyla k dispozici data o systematickém skríningu na spektrum a frekvenci *GDAP1* mutací v Německu, ani v Polsku. Nedávná studie polských

kolegů prokazuje rovněž dominantní výskyt L239F mutace v polské populaci (*Kabzinska et al., 2010*). Uvádí dalších deset polských a jeden bulharský L239F chromozom a prokazuje jejich společný původ s našimi pacienty. L239F se tedy ukazuje být „evropskou mutací“. Její stáří a místo vzniku nejsou zatím známe. Mutace je lokalizována v jedné z GST domén a její patogenetické působení je zatím nejasné (*Marco et al., 2004; Shield et al., 2006*).

Mutace R191X zkracuje GDAP1 před funkční GST_C doménou a transmembránovými doménami, které ho správně lokalizují do mitochondriální membrány neuronu (*Marco et al., 2004; Pedrola et al., 2005*). Usuzujeme proto na „loss of function“, efekt R191X mutace, její patogenní vliv a možnou roli v dysfunkci neuronálních mitochondrií. Méně častá R191X detekována ve dvou nepříbuzných rodinách je taktéž asociována se společným haplotypem, který zahrnoval vzdálenější markery a mohl by spolu s její nižší četností svědčit pro její pozdější vznik.

5.7 Klinický a elektrofyziologický obraz pacientů s mutacemi v *GDAP1* genu, korelace genotyp-fenotyp

Naši pacienti tak jako většina pacientů s *GDAP1* mutacemi se v prvním roce života psychomotoricky vyvíjeli normálně. Pak ale následoval rozvoj deformit nohou, které ještě v dětství vyžadovaly chirurgickou korekci. Během první dekády života se i u většiny našich pacientů rozvinul těžký motorický deficit v distálních partiích dolních končetin. Avšak ani jeden ve věku 11 až 43 let nebyl nucen používat vozík, jak se často u *GDAP1* pacientů uvádí (*Nelis et al., 2002; Ammar et al., 2003; Senderek et al., 2003; Birouk et al., 2003; Azzedine et al., 2003; Di Maria et al., 2004; Claramunt et al., 2005; Sevilla et al., 2003*). Postižení horních končetin různého stupně bylo u všech pacientů až na jednoho evidentní do konce druhé dekády, ale jen u dvou bylo těžké (*Senderek et al., 2003; Birouk et al., 2003; De*

Sandre-Giovannoli et al., 2003; Azzedine et al., 2003; Sevilla et al., 2003). Dále jsme pozorovali velmi pomalou progresi onemocnění u heterozygota L239F, u kterého byla ve věku 41 let jen lehce oslabena dorzální flexe nohy.

Také jsme pozorovali výrazně odlišnou rychlost progresu a závažnost onemocnění u dvou sourozenců odlišného pohlaví heterozygotů pro mutaci R191X. Taková variabilita klinické tíže onemocnění v rámci jediné rodiny je dobře známa u dominantního CMT1A typu a i u pacientů s *GDAP1* mutacemi byla již popsána (*Azzedine et al., 2003*). Všichni naši *GDAP1* pacienti měli elektrofyziologický obraz CMT2. Axonální typ neuropatie se ukazuje být převažujícím nálezem u pacientů s *GDAP1* mutacemi (*Cuesta et al., 2002; Nelis et al., 2002; Sevilla et al., 2003; Ammar et al., 2003; Birouk et al., 2003; Azzedine et al., 2003; DiMaria et al. 2004*). U žádného jsme nepozorovali parézu hlasivek ani postižení jiného kraniálního nervu. (*Azzedine et al., 2003; Stojkovic et al., 2004; Sevilla et al., 2003; Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005*). Zřídka popisovaná skolióza byla pozorována u čtyř pacientů (*Birouk et al., 2003; Sevilla et al., 2003*).

S přibýváním pacientů s *GDAP1* mutacemi jsou snahy provádět korelace genotyp-fenotyp. Takovéto korelace mohou pomoci zefektivnit molekulárně genetickou diagnostiku dědičných neuropatií, zhodnotit prognózu konkrétní genové poruchy, nebo objasnit patogenezu onemocnění (*Bouhouche et al., 2007*). Srovnávat pacienty s různými mutacemi stejně jako složené heterozygoty je problematické či spíše nemožné. Z toho důvodu je snaha vytvářet soubory pacientů homozygotů na rozšířené mutaci. Dosud bylo popsáno 14 homozygotů hispánské mutace Q163X a 18 homozygotů převážně z Maroka nositelů mutace S194X (*Sevilla et al., 2003; Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005; Bouhouche et al., 2007*). L239F se ukazuje být rozšířenou mutací v evropské populaci. Byla detekována u 16 pacientů, čtyřech českých, osmi pacientů pocházejících z Polska, dvou z Belgie s předky

z oblasti polsko-německé hranice a dvou pacientů z Bulharska (*Kabzinska et al., 2010; Ammar et al., 2003*). Dva čeští a tři polští pacienti jsou homozygoti pro tuto mutaci.

Q163X a S194X homozygoti vykazovali začátek onemocnění většinou v prvních dvou letech života často s opožděním motorického vývoje. U většiny S194X homozygotů se rozvinula slabost proximálních svalů dolních končetin již na konci první dekády a v další dekádě vedla ke ztrátě schopnosti samostatné chůze s potřebou používat vozík nebo oporu. V tu dobu byly již u všech jedinců patrné drápkovité deformity prstů a rukou (*Nelis et al., 2002; Birouk et al., 2003; Bouhouche et al., 2007*). Většina Q163X homozygotů byla rovněž nucena používat vozík a byla postižena parézou hlasivek (*Sevilla et al., 2003; Boerkoel et al., 2003; Claramunt et al., 2005*).

Čeští L239F homozygoti podobně jako polští byli postiženi prvními příznaky onemocnění až kolem poloviny první dekády života. Dva sourozenci z polské rodiny začali používat vozík ve druhé a čtvrté dekádě (*Kabzinska et al., 2010*). Jeden český L239F homozygot začal používat při chůzi oporu rovněž až ve čtvrté dekádě. Postižení horních končetin bylo u českých L239F homozygotů lehké u 11 letého chlapce, až středně těžké u 43 letého muže. Ten dosud pracuje jako sochař.

Složení L239F heterozygoti s „missense“ mutacemi v polské studii vykazovali taktéž mírnější fenotyp (*Kabzinska et al., 2010*). Naopak L239F v kombinaci s „frameshift“ nebo „nonsense“ mutací vedlo jejich nositele k těžšímu postižení. Složený heterozygot L239F/E114fs z belgické studie Ammar nebyl již v 11 letech schopen chůze a náš pacient L239F/R194X měl těžké postižení rukou a byl nucen používat při chůzi oporu již v první dekádě (*Ammar et al., 2003*). Počet pacientů ale stále není dostatečný k provádění spolehlivých korelací genotyp-fenotyp.

5.8 Heterozygotní *GDAP1* mutace

Přímé sekvenování všech kódujících exonů a přilehlých intronových oblastí neodhalilo druhou patogenní mutaci u dvou z pěti, a tedy významné části rodin s *GDAP1* mutacemi. Vzhledem k nedávným zjištěním o autozomálně dominantním efektu některých *GDAP1* mutací, provedli jsme též klinické a elektrofyziologické vyšetření rodičů heterozygotních pacientů (*Claramunt et al., 2006*). Naše nálezy neodpovídají dominantnímu přenosu onemocnění a podporují domněnku, že CMT fenotyp heterozygotních pacientů je způsobený postižením i druhé *GDAP1* alely v jiné než sekvenované oblasti, např. v oblasti promotoru nebo v hlubokých intronových úsecích, nebo dokonce postižením jiného genu.

Haplotypová analýza v těchto rodinách ukázala výrazný rozdíl v „nemutovaných“ chromozomových haplotypech, odlišujíc se v 5 ze 6 testovaných mikrosatelitových markerů (data nejsou zobrazena). V české populaci proto mohou existovat další dvě *GDAP1* mutace za předpokladu, že neuvažujeme digenickou příčinu nemoci. Analýza RNA v rodině 5 vyloučila rozsáhlé delece a intronové mutace ovlivňující sestřih mRNA. Nelze také vyloučit náhodný společný výskyt heterozygotní *GDAP1* mutace a CMT s jinou genetickou příčinou, např. u L239F heterozygota z rodiny 4 s lehkým klinickým fenotypem.

6. Závěry

Tato studie věnovaná výzkumu molekulárně-genetických příčin AR CMT forem v populaci ČR a jejich klinickému fenotypu dospěla k následujícím závěrům.

- 1) Zastoupení jednotlivých typů dědičnosti mezi CMT rodinami žijícími v ČR odpovídá zastoupení v jiných evropských populacích s výraznou převahou dominantního přenosu a sporadického výskytu onemocnění nad AR typem dědičnosti.
- 2) Vyšetřením *PRX* genu u 55 CMT1 rodin jsme odhalili pouze jedinou dosud nepopsanou homozygotní mutaci c.3286_3354del71 (p.K1095FsX18) u jednoho romského chlapce. K vyšetření *PRX* genu budou tedy vybírání romští pacienti s demyelinizačním typem CMT. Naopak, *PRX* gen není opodstatněné zařazovat do rutinního diagnostického molekulárně genetického vyšetření české populace.
- 3) Chybění kyselé domény v periaxinu zřejmě sehrává patogenetickou roli u CMT4F.
- 4) V *GDAP1* genu se v české populaci vyskytují jenom dvě mutace, c.571C>T, R191X a c.751C>T, L239F. Potvrdili jsme poměrně vysoký záchyt *GDAP1* mutací jak v skupině vyšetřených AR rodin, tak ve skupině vyšetřených sporadických pacientů. Mutace v *GDAP1* genu jsme prokázali pouze u pacientů s axonálním typem CMT. Testování *GDAP1* genu bude proto zařazeno do rutinního molekulárně genetického vyšetření vybraných českých CMT2 pacientů. Vyšetření se zaměří na exony 4 a 6 *GDAP1* genu, kde tyto mutace leží.
- 5) Missense mutace L239F je v české populaci prevalentní a byla rozšířena efektem zakladatele. K podobnému zjištění dospěli i polští kolegové. Tato zjištění tedy mohou usnadnit a zefektivnit DNA diagnostiku u pacientů s CMT evropských populací zahájením cíleného vyšetřením na tuto mutaci v *GDAP1* genu.

6) L239F homozygoti mají mírnější CMT fenotyp v porovnání s homozygotními nositeli studovaných nonsense mutací Q163X a S194X.

7. Reference

- Ammar N, Nelis E, Merlini L, Barisić N, Amouri R, Ceuterick C, Martin JJ, Timmerman V, Hentati F, De Jonghe P. Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord.* 2003;13:720-8
- Angelicheva D, Turnev I, Dye D, Chandler D, Thomas PK, Kalaydjieva L. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet.* 1999;7:560-6
- Azzedine H, Ruberg M, Ente D, Gilardeau C, Périé S, Wechsler B, Brice A, LeGuern E, Dubourg O. 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
- Barhoumi C, Amouri R, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Machghoul S, Gueddiche M, Hentati F. Linkage of a new locus for autosomal recessive axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q21.3. *Neuromuscul Disord.* 2001;11:27-34
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet.* 2003;30:21-2
- Ben Othmane K, Hentati F, Lennon F, Ben Hamida C, Blél S, Roses AD, Pericak-Vance MA, Ben Hamida M, Vance JM. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet.* 1993;2:1625-8
- Berger P, Young P, Suter U. Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics.* 2002;4:1-15
- Biancheri R, Zara F, Striano P, Pedemonte M, Cassandrini D, Stringara S, Manganelli F, Santoro L, Schenone A, Bellone E, Minetti C. GDAP1 mutation in autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth with pyramidal features. *J Neurol.* 2006;253:1234-5
- Birouk N, Azzedine H, Dubourg O, Muriel MP, Benomar A, Hamadouche T, Maisonobe T, Ouazzani R, Brice A, Yahyaoui M, Chkili T, Le Guern E. 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
- Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, Garcia CA, Leber SM, Rhee-Morris L, Lupski JR. Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2001;68:325-33
- Boerkoel CF, Takashima H, Nakagawa M, Izumo S, Armstrong D, Butler I, Mancias P, Papasozomenos SC, Stern LZ, Lupski JR. CMT4A: identification of a Hispanic GDAP1 founder mutation. *Ann Neurol.* 2003;53:400-5
- Bouché P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P. Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci.* 1983;61:389-99
- Bouhouche A, Birouk N, Azzedine H, Benomar A, Durosier G, Ente D, Muriel MP, Ruberg M, Slassi I, Yahyaoui M, Dubourg O, Ouazzani R, LeGuern E. Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): Phenotype-genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain.* 2007;130:1062-1075
- Chandler D, Angelicheva D, Heather L, Gooding R, Gresham D, Yanakiev P, de Jonge R, Baas F, Dye D, Karagyozov L, Savov A, Blechschmidt K, Keats B, Thomas PK, King RH, Starr A, Nikolova A, Colomer J, Ishpekova B, Tournev I, Urtizberea JA, Merlini L, Butinar D, Chabrol B, Voit T, Baethmann M, Nedkova V, Corches A, Kalaydjieva L. Hereditary motor and sensory neuropathy--Lom (HMSNL): refined genetic mapping in Romani (Gypsy) families from several European countries. *Neuromuscul Disord.* 2000;10:584-91
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, López de Munain A, Berciano J, Cuesta A, Sánchez-Navarro B, Millán JM, Saifi GM, Lupski JR, Vilchez JJ, Espinós C, Palau F. Genetics of Charcot-Marie-

- Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet.* 2005;42:358-65
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, García-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marín I, Vílchez JJ, Palau F. 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
- Davis CJ, Bradley WG, Madrid R. The peroneal muscular atrophy syndrome: clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. I. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *J Genet Hum.* 1978;26:311-49
- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Boccaccio I, Bernard R, Delague V, Grid D, Vallat JM, Lévy N, Mégarbané A. Phenotypic and genetic exploration of severe demyelinating and secondary axonal neuropathies resulting from GDAP1 nonsense and splicing mutations. *J Med Genet.* 2003;40:e87
- Delague V, Bareil C, Tuffery S, Bouvagnet P, Chouery E, Koussa S, Maisonnobe T, Loiselet J, Mégarbané A, Claustres M. Mapping of a new locus for autosomal recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to 19q13.1-13.3 in a large consanguineous Lebanese family: exclusion of MAG as a candidate gene. *Am J Hum Genet.* 2000;67: 236-43
- Di Maria E, Gulli R, Balestra P, Cassandrini D, Pigullo S, Doria-Lamba L, Bado M, Schenone A, Ajmar F, Mandich P, Bellone E. 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
- Dyck P.J., Chance P., Lebo R., Carney J.A. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck P.J., Thomas P.K., Griffin J.W., Low P.A., Poduslo J.F. eds. *Peripheral Neuropathy.* Philadelphia: WB Saunders, 1993:1094-1136
- Dyck PJ a Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy: I Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol.* 1968;18:603-618
- Dyck PJ a Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy: II Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol.* 1968;18:619-625
- Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, Brophy PJ. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem.* 1998;273:5794-800
- Gabreëls-Festen AA, Joosten EM, Gabreëls FJ, Stegeman DF, Vos AJ, Busch HF. Congenital demyelinating motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths. *Brain.* 1990;113:1629-1643
- Gherardi R, Bouché P, Escourolle R, Hauw JJ. Peroneal muscular atrophy. Part 2. Nerve biopsy studies. *J Neurol Sci.* 1983;61:401-16
- Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, Brophy PJ. Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron.* 1994;12:497-508
- Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VC, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ. Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron.* 2000;26:523-31
- Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, Chandler D, Bertranpetit J, Kalaydjieva L. A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet.* 2005;42:e69
- Guilbot A, Williams A, Ravisé N, Verny C, Brice A, Sherman DL, Brophy PJ, LeGuern E, Delague V, Bareil C, Mégarbané A, Claustres M. A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet.* 2001;10:415-21
- Harding AE and Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain.* 1980;103:259-80
- Kabzinska D, Drac H, Sherman DL, Kostera-Pruszczyk A, Brophy PJ, Kochanski A, Hausmanowa-Petrusewicz I. Charcot-Marie-Tooth type 4F disease caused by S399fsx410 mutation in the PRX gene. *Neurology.* 2006;66:745-7

- Kabzinska D, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kochanski A. Charcot-Marie-Tooth disorders with an autosomal recessive mode of inheritance. *Clin Neuropathol.* 2008; 27:1-12
- Kabzińska D, Strugalska-Cynowska H, Kostera-Pruszczyk A, Ryniewicz B, Posmyk R, Midro A, Seeman P, Báranková L, Zimoń M, Baets J, Timmerman V, Guerguelcheva V, Tournev I, Sarafov S, De Jonghe P, Jordanova A, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kočański A. L239F founder mutation in *GDAP1* is associated with a mild Charcot-Marie-Tooth type 4C4 (CMT4C4) phenotype. *Neurogenetics.* 2010 (Epub ahead of print)
- Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F, Shmarov A, Petrova J, Turnev I, Hristova A, Moskov M, Stancheva S, Petkova I, Bittles AH, Georgieva V, Middleton L, Thomas PK. Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 1996;14:214-7
- Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P, Rosenthal A, King RH, Thomas PK. N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet.* 2000;67:47-58
- Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet.* 2001;2:5
- Kijima K, Numakura C, Shirahata E, Sawaishi Y, Shimohata M, Igarashi S, Tanaka T, Hayasaka K. Periaxin mutation causes early-onset but slow-progressive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet.* 2004;49:376-9
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 1995;269:1737-40
- Madrid R, Bradley WG, Davis CJ. The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. Part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies. *J Neurol Sci.* 1977;32:91-122
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marín I. 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
- Martin JJ, Brice A and Van Broeckhoven C. 4th Workshop of the European CMT-Consortium-62nd ENMC International Workshop. Rare forms of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. 16-18 October 1998, Soestduinem, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 1999;9:279-287
- 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
- Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, Belpaire-Dethiou MC, Ceuterick C, Van Gerwen V, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Gabreëls-Festen AA, Verellen C, Tan E, Demirci M, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Topaloglu H, Timmerman V. Mutations in *GDAP1*: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology.* 2002;59:1865-72
- Otagiri T, Sugai K, Kijima K, Arai H, Sawaishi Y, Shimohata M, Hayasaka K. Periaxin mutation in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet.* 2006;51:625-8
- Parman Y, Battaloglu E, Baris I, Bilir B, Poyraz M, Bissar-Tadmouri N, Williams A, Ammar N, Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Najafov A, Deymeer F, Serdaroglu P, Brophy PJ, Said G. Clinicopathological and genetic study of early-onset demyelinating neuropathy. *Brain.* 2004;127:2540-50
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. *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
- Reilly MM. Classification of the hereditary motor and sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2002;13: 561-4
- Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, Thomas PK, Youl B, Tournev I, Gergelcheva V, Kalaydjieva L. A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the *EGR2* region on 10q23. *Am J Hum Genet.* 2000;67:664-71

- Seeman P. and Siskova D. Autosomal recessive ethnic diseases of Czech Gypsies. *Cas Lek Cesk.* 2006;145:557-60
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, Züchner S, De Jonghe P, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Schröder JM. 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
- Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, Mayordomo F, Pedrola L, Palau F, Vilchez JJ. 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
- Scherer SS, Xu YT, Bannerman PG, Sherman DL, Brophy PJ. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glial interactions and polarized localization during development. *Development.* 1995;121:4265-73
- Sherman DL and Brophy PJ. A tripartite nuclear localization signal in the PDZ-domain protein L-periaxin. *J Biol Chem.* 2000;275:4537-40
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron.* 2001;30:677-87
- Shield AJ, Murray TP, Board PG. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347:859-66
- Shy ME. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol.* 2004;17:579-85
- Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet.* 1974;6:98-118
- Stojkovic T, Latour P, Viet G, de Seze J, Hurtevent JF, Vandenberghe A, Vermersch P. 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
- Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, Ceuterick C, Martin JJ, Voit T, Schröder JM, Williams A, Brophy PJ, Timmerman V, Lupski JR. Periaxin mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. *Ann Neurol.* 2002;51:709-15
- Thomas PK, Kalaydjieva L, Youl B, Rogers T, Angelicheva D, King RH, Guerguelcheva V, Colomer J, Lupu C, Corches A, Popa G, Merlini L, Shmarov A, Muddle JR, Nourallah M, Tournev I. Hereditary motor and sensory neuropathy-russe: new autosomal recessive neuropathy in Balkan Gypsies. *Ann Neurol.* 2001;50:452-7
- Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature.* 1997;388:243-9
- Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Müllner-Eidenböck A, Merlini L, Neumann L, Bürger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L. Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet.* 2003;35:185-9
- Züchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE, Walizada G, Zhu D, Pericak-Vance MA, Nicholson G, Timmerman V, Vance JM. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet.* 2005;37:289-94
- Züchner S and Vance M. Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006;8:63-74
- <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>
- <http://www.gdb.org/>

8. Publikace autora

Původní práce v časopisech s IF

- 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. (IF₂₀₀₆ = 2,615)
- Baránková L, Šišková D, Hühne K, Vyhnálková E, Sakmaryová I, Bojar M, Rautenstrauss B, Seeman P. A 71-nucleotide deletion in the periaxin gene in a Romani patient with early-onset slowly progressive demyelinating CMT. *Eur J Neurol*. 2008 Jun;15(6):548-51. Epub 2008 Apr 8. (IF₂₀₀₇ = 2,580)
- 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)
- 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)
- Lassuthová P, Baránková L, Kraus J, Maríková T, Seeman P. Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a novel mutation in the LMNA gene. *Pediatr Neurol*. 2009 Aug;41(2):127-30. (IF₂₀₀₈ = 1,505)
- Lassuthová P, Baránková L, Haberlová J, Mazanec R, Wallace A, Huehne K, Rautenstrauss B, Seeman P. Mutations in the LMNA gene do not cause axonal CMT in Czech patients. *J Hum Genet*. 2009 Jun;54(6):365-8. Epub 2009 May 8. (IF₂₀₀₈ = 2,431)
- Kabzińska D, Strugalska-Cynowska H, Kostera-Pruszczyk A, Ryniewicz B, Posmyk R, Midro A, Seeman P, Báranková L, Zimoń M, Baets J, Timmerman V, Guergueltcheva V, Tournev I, Sarafov S, De Jonghe P, Jordanova A, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kočański A. L239F founder mutation in GDAP1 is associated with a mild Charcot-Marie-Tooth type 4C4 (CMT4C4) phenotype. *Neurogenetics*. 2010 Mar 16. [Epub ahead of print] (IF₂₀₀₉ = 3.0)

Původní práce v časopisech bez IF

- Kobesová A., Smetana P., Suzan J., Smetana V., Baránková L., Horáček O. Zásady protetické péče u pacientů s hereditární motoricko-senzorickou neuropatií (HMSN) *Rehabilitace a fyzikální lékařství*, ročník 11, listopad 2004, č.4, str. 169–175

Přednášky na mezinárodních konferencích

- L. Baránková, O. Horáček, R. Mazanec, P. Smetana, M. Bojar, P. Seeman. How do the Czech CMT patients live and how do they feel about their medical condition? Results of a large Patient Questionnaire Survey. (*přednáška*) in First European and North American Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting July 8-10, 2004, Antwerpen, Belgie

- L. Baránková, E. Mikešová, I. Sakmaryová, R. Mazanec, M. Bojar, P. Seeman. Molekulárne-genetické vyšetrenia u pacientov s autozomálne recesívnymi formami dedičných neuropatií CMT. (*přednáška*) XV. Izakovičov memoriál – Celostátna konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, Nitra, SK, 23.-24. 9. 2004
- 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 – Celostátna konferencia lekárskej genetiky s medzinárodnou účasťou, Nitra, SK, 23.-24. 9. 2004

Přednášky na národních konferencích

- 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, E. Mikešová, I. Sakmaryová, S. Züchner, R. Mazanec, P. Vondráček, M. Bojar, P. Seeman. Výsledky vyšetření GDAP1 genu u českých CMT pacientů s již vyloučenou nejčastější mutací. Studentská vědecká konference 2. LF UK 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
- 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
- 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

Postery na mezinárodních konferencích

- 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. Proceedings of Clinical Neurosciences, Torquay, Devon, 7-9 Sept. 2005, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2006; 77:126-142 (IF₂₀₀₅ = 3,122)
- P. Seeman, R. Mazanec, J. Haberlová, J. Milučká, O. Horáček, A. Kobesová, I. Sakmaryová, L. Baránková, E. Mikešová. Connexin 32 gene (Cx32) mutations 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
- R. Mazanec, P. Seeman, L. Baránková, M. Bojar. Electrophysiological findings in some mutations of the GJB1-connexin 32 (Cx32). 4th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Paris 2004, *European Journal of Neurology* 11, Suppl.2, 2004

- P. Seeman, R. Mazanec, J. Böhm, P. Ridzoň, L. Baránková, C. Windpassrger, M. Auer-Grumbach. Inherited ulcero-mutilating neuropathies CMT2B and HSN1 in Czech families. 2005 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Tuscany, Journal of the Peripheral Nervous System 10, Suppl. 1, 2005
- 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. 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
- 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)

Postery na národních konferencích

- 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
- L. Baránková, E. Mikešová, I. Sakmaryová, E. Nelis, M. Bojar, P. Seeman. Haplotypová analýza u českých CMT4A rodin s prevalentní mutací v GDAP1 genu svědčí pro founder efekt. Studentská vědecká konference 2. LF UK, 28.4. 2005
- 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
- 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

V Praze, 22.6.2010

MUDr.Lucia Baránková

9. Curriculum vitae

Lucia Baránková, MUDr.
Bernolákova 67, 92001 Hlohovec, SR
lbaranek@email.cz
narozena 24.10.1976

Zaměstnání

od 2007 Neurochirurgické oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.,
sekundární lékař zařazen do specializačního oboru neurologie
2003 - 2007 Klinika neurologie dospělých FNM a 2.LF UK, sekundární lékař

Vzdělání

od 2003 2.lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, PhD studium v oboru
neurovědy
1996 – 2003 1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, všeobecné lékařství
2001 (1 semestr) Medizinische Fakultät, Wien Univerzität
1991 – 1996 Bilinguálne anglicko – slovenské gymnázium Sučany

Odborné stáže

11/2004 – 2/2005 Institut der Humangenetik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg, Laboratoř pro nervosvalová onemocnění, stipendium
Projektu mobilit Leonardo da Vinci

Klinické stáže

2007 (4 týdny) Neurologische Abteilung, Kaiser-Franz-Josef Spital Wien

Granty

2004 – 2006 Spoluřešitel grantu IGA MZ ČR (1A8254)
2004 – 2006 Spoluřešitel grantu GAUK (72/2004)

V Praze, 22.6.2010

MUDr.Lucia Baránková

10. Přílohy