

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Oborová rada: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Dana Brožková

**Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů
v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-
Tooth nebo časně hluchoty s neobjasněným genovým defektem**

Doktorská disertační práce

Praha 2011

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

**Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů
v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-
Tooth nebo časně hluchoty s neobjasněným genovým defektem**

**Linkage analyses and characterization of candidate gene locuses and
genes in families with multiple appearance of hereditary neuropathy
Charcot-Marie-Tooth or deafness with unexplained gene defect**

Doktorská disertační práce, Praha 2011

MUDr. Dana Brožková

Školitel: Prof. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D.

Pracoviště: DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FNM
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Oborová rada: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat lidem, kteří mi pomohli s přípravou této práce a během celého studia.

Svému školiteli Prof. MUDr. Pavlu Seemanovi Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky.

Kolektivu DNA laboratoře: RNDr. Janě Lisoňové, Mgr. Janě Sabové, Mgr. Marcele Krůtové a MUDr. Petře Laššuthové; za vstřícnost a pomoc při řešení různých úkolů.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

*

Souhlasím – Nesouhlasím

V Praze, 21.06.2011

Jméno – Příjmení (hůlkovým písmem)

Podpis

*Nehodící se škrtněte

Obsah

Souhrn	8
Summary	11
1 Oddíl - Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth s neobjasněným genovým defektem.....	14
1.1 Úvod.....	14
1.2 Cíle.....	15
1.3 Pacienti.....	15
1.4 Metody	16
1.4.1 Genetická vyšetření.....	16
1.4.2 Klinická a elektrofyziologická vyšetření	17
1.5 Výsledky	17
1.5.1 Rodina T.....	17
1.5.2 Rodina H.....	21
1.5.3 Rodina C	25
1.5.4 Rodina M	29
1.6 Diskuse.....	33
1.7 Závěr	35
2 Oddíl - Homozygotní mapování u romských rodin s časnou nesyndromovou hluchotou nebo dědičnou neuropatií CMT	36
2.1 Úvod.....	36
2.2 Cíle.....	37
2.3 Pacienti.....	37
2.4 Metody	38
2.4.1 Homozygotní mapování.....	38
2.4.2 Sekvenování genu <i>MARVELD2</i>	38
2.4.3 Klinická vyšetření hluchoty metodou SSEP	40
2.5 Výsledky	41
2.5.1 Rodina NSHL-1	41
2.5.2 Rodina NSHL-2	44
2.5.3 Pacientka NSHL-3	46
2.5.4 Pacientka CMT – 1	47
2.5.5 Pacientka CMT - 2.....	48
2.6 Diskuze	49
2.7 Závěr	50
3 Oddíl - Fenotypová exprese nových mutací v genech <i>GJB1</i> , <i>MPZ</i> a <i>PMP22</i>	51
3.1 Úvod.....	51
3.2 Cíle.....	52
3.3 Pacienti.....	52
3.4 Metody	53
3.4.1 Sekvenační analýza genů <i>GJB1</i> , <i>MPZ</i> a <i>PMP22</i>	53
3.4.2 In-silico analýza nalezených mutací	54
3.4.3 Klinická a elektrofyziologická vyšetření	55

3.5	Výsledky	56
3.5.1	Mutace <i>GJB1</i>	56
3.5.2	Mutace <i>MPZ</i>	60
3.5.3	Mutace <i>PMP22</i>	65
3.6	Diskuze	67
3.6.1	Mutace <i>GJB1</i>	67
3.6.2	Mutace <i>MPZ</i>	69
3.6.3	Mutace <i>PMP22</i>	73
3.7	Závěr	74
3.7.1	Mutace <i>GJB1</i>	74
3.7.2	Mutace <i>MPZ</i>	75
3.7.3	Mutace <i>PMP22</i>	75
	Použitá literatura	76
	Seznam publikací autorky	81
	Životopis	83
	Seznam příloh	84

Seznam obrázků

Obrázek 1– rodokmen rodiny T s autozomálně dominantním typem CMT.....	18
Obrázek 2– rodokmen rodiny H s autozomálně dominantním typem CMT.	21
Obrázek 3 – pacienti rodiny H.....	23
Obrázek 4– rodokmen rodiny C s autozomálně dominantním typem CMT.....	25
Obrázek 5– pacienti rodiny C.....	27
Obrázek 6– rodokmen rodiny M s autozomálně dominantním typem CMT a vyznačenými mutacemi v genech <i>EGR2</i> a <i>MPZ</i>	29
Obrázek 7– pacienti rodiny M.....	31
Obrázek 8– Rodokmen rodiny NSHL-1 s vyznačenou konsangvinitou.....	41
Obrázek 9 – Elektroferogram mutace c.1331+2 T>C v genu <i>MARVELD2</i>	43
Obrázek 10 – Odhadovaný audiogram získaný vyšetřením SSEP.	44
Obrázek 11 - rodokmen rodiny NSHL-2.....	44
Obrázek 12 - rodokmen rodiny NSHL-3.....	46
Obrázek 13 - rodokmen rodiny CMT – 1.....	47
Obrázek 14 - rodokmen rodiny CMT – 2.....	48
Obrázek 15 – Rodokmeny rodin s mutacemi v genu <i>GJB1</i>	59
Obrázek 16 – Rodokmeny rodin s mutacemi v genu <i>MPZ</i>	64
Obrázek 17 – mezidruhovú konzervovanost pro mutaci p.Val170Ile v genu <i>GJB1</i>	69
Obrázek 18 - mezidruhovú konzervovanost pozic jednotlivých nových mutací v genu <i>MPZ</i>	72

Seznam tabulek

Tabulka 1– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny T.	19
Tabulka 2– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny T.....	20
Tabulka 3– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny H.....	22
Tabulka 4– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny H.....	24
Tabulka 5– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny C.....	26
Tabulka 6– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny C.....	28
Tabulka 7– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny M.....	30
Tabulka 8– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny M.....	32
Tabulka 9– Přehled primerů pro sekvenování genu <i>MARVELD2</i>	39
Tabulka 10 – Homozygotní oblasti u neslyšícího pacienta VI.1 z rodiny NSHL-1.....	42
Tabulka 11 – Homozygotní oblasti u neslyšící pacientky z rodiny NSHL-2.....	45
Tabulka 12 – Homozygotní oblasti u neslyšící pacientky NSHL-3.....	46
Tabulka 13 – Homozygotní oblasti u pacientky CMT – 1.....	47
Tabulka 14 – Homozygotní oblasti u pacientky CMT - 2.....	48
Tabulka 15 – Šest nových mutací v genu <i>GJB1</i>	56
Tabulka 16 – elektrofyziologické nálezy u vyšetřených pacientů s <i>GJB1</i> mutacemi.....	58
Tabulka 17 – Nové patogenní a nepatogenní mutace v genu <i>MPZ</i>	60
Tabulka 18 – Klinické nálezy u pacientů s kauzálními mutacemi v genu <i>MPZ</i>	61
Tabulka 19 – elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi v genu <i>MPZ</i>	63
Tabulka 20 – souhrn čtyř nových mutací v genu <i>PMP22</i>	65
Tabulka 21 – elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi <i>PMP22</i>	66

Souhrn

Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth s neobjasněným genovým defektem.

Vazebné analýzy jsme prováděli pomocí SNP čipů u celkem čtyř rodin s autozomálně dominantně dědičnou neuropatií CMT.

Vazebná analýza v rodině M vedla k objevení mutace p.Glu412Gly v genu *EGR2*, která segreguje s onemocněním v rodině a považujeme ji za kauzální. Toto tvrzení podporuje i fakt, že ve stejném kodónu byla popsána již jiná mutace, která je považována za kauzální (Szigeti, et al. 2007). V rodině M je výrazně více postižen proband a naopak jeho sestra a matka mají jen mírné známky CMT. Je možné, že těžší postižení je způsobeno přítomností mutace p.Asp246Asn v genu *MPZ*, která byla nalezena u probanda a jeho zdravého otce, a proto je samostatně považována za polymorfismus nebo případně za recesivní mutaci.

Přítomnost obou mutací v genech *EGR2*, který je transkripčním faktorem a *MPZ* může vyvolávat výrazně těžší fenotyp a ovlivňovat správnou funkci myelinu jako obalu periferních nervů (LeBlanc, et al. 2007).

Ve dvou rodinách (H a T) se podařilo vyloučit všechny dosud známé lokusy/geny spojované s autozomálně dominantním typem CMT a jedná se tak pravděpodobně o nový, ještě nepopsaný typ CMT. V rodině T byla nalezena vazba celkem k 9 oblastem s pozitivním LOD skóre, přičemž nejvyššího LOD skóre – 2.105 dosáhly čtyři oblasti na chromozomech 2, 6, 11 a 21. V rodině H byla nalezena vazba k celkem 10 oblastem s pozitivním LOD skóre a

nejvyššího LOD skóre – 1.505 dosáhlo sedm oblastí na chromozomech 3, 7, 10, 11, 11, 12 a 17.

V rodině C zbývá vyloučit případné mutace v genu *RAB7*, který se nachází v oblasti s vazbou, ostatní oblasti spojené s CMT jsou vyloučené.

V rodinách s vyloučenými všemi známými lokusy pro AD CMT bude dalším krokem provedení masivního sekvenování (next generation sequencing) cíleného na oblasti s vazbou.

Homozygotní mapování u romských rodin s časnou nesyndromovou hluchotou nebo dědičnou neuropatií CMT.

Homozygotním mapováním bylo vyšetřeno pět rodin, tři s nesyndromovou hluchotou a dvě s dědičnou neuropatií CMT. V rodině NSHL-1, která je konsangvinní, obsahovala jedna z největších homozygotních oblastí na chromozomu 5 gen *MARVELD2*, jehož mutace již byly popsány u nesyndromové hluchoty DFNB49 (Chishti, et al. 2008; Riazuddin, et al. 2006). Sekvenování genu *MARVELD2* odhalilo mutaci c.1331+2 T>C (IVS4+2 T>C) v homozygotním stavu u neslyšícího pacienta. Vyšetřením dalších 19 romských pacientů byla nalezena stejná mutace ještě u dalších dvou rodin. Jedná se pravděpodobně o významnou příčinu nesyndromové hluchoty v romské populaci v České republice. Při vyšetření 40 pacientů neromského původu s hluchotou nebyla nalezena žádná patogenní mutace v genu *MARVELD2*.

U dalších 4 rodin, které byly zařazeny na homozygotní mapování jsou v nalezených homozygotních oblastech přítomny lokusy/geny, které ještě zbývá vyšetřit sekvenováním na případnou přítomnost patogenních mutací.

Fenotypová exprese nových mutací v genech *GJB1*, *MPZ* a *PMP22*.

Analyzovali jsme charakter a fenotypovou expresi u nově nalezených dosud nepopsaných mutací v genech často spojovaných s dědičnou neuropatií. Ze 6 nově popsáných mutací v genu *GJB1* jsme u 5 z nich prokázali jejich patogenní charakter na základě segregace mutací v rodinách a pomocí počítačových predikčních analýz. Mutace p.Val170Ile je nepatogenním polymorfismem. Pro tento fakt svědčí, že nesegreguje s onemocněním v rodině, výsledky počítačových predikčních analýz a nekonzervovanost pozice 170 mezi druhy. V genu *GJB1* se jedná se o první mutaci vedoucí k záměně aminokyseliny, která není patogenní (Reilly, et al. 2011).

Z 11 nově popsáných mutací v genu *MPZ* jsme prokázali patogenní efekt u 8 z nich. Dvě mutace jsou nepatogenními polymorfismy, protože se vyskytují i u zdravých členů rodin. U mutace p.Val46Met nelze o patogenním efektu jednoznačně rozhodnout, postižená pacientka trpí pouze senzitivní neuropatií bez svalové slabosti.

Ze 4 nových mutací v genu *PMP22* jedna mutace způsobuje těžkou Dejerine-Sottas neuropatií a tři jsou zodpovědné za hereditární neuropatií se sklonem k otlakovým parézám.

Výsledky analýz nových mutací v genech *GJB1*, *MPZ* a *PMP22* jsme publikovali v časopisech *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *Clinical Genetics* a *Muscle and Nerve*.

Summary

Linkage analyses and characterization of candidate gene locuses and genes in families with multiple appearance of hereditary neuropathy Charcot-Marie-Tooth with unexplained gene defect.

We have performed linkage analyses with the use of SNP chips in four families with autosomal dominant hereditary neuropathy CMT.

Linkage analysis in family M has helped to discover the mutation p.Glu412Gly in gene *EGR2* which segregates with the disease in the family and we consider it as causal for the disease. In the same codon another pathogenic mutation was reported (Szigeti, et al. 2007), which supports the pathogenic effect of p.Glu412Gly mutation. The proband from family M is more severely affected than his mother and sister, they both have only mild signs of CMT. The more severe phenotype of the proband may be the result of a combination with the mutation p.Asp246Asn in the *MPZ* gene. This mutation was also found in the healthy father and is considered as a polymorphism or a recessive mutation (Brozkova, et al. 2010). The coincidence of both mutations in *EGR2* and *MPZ* genes can be the reason for severe phenotype and can involve the function of myelin in peripheral nerves (LeBlanc, et al. 2007). All known locuses/genes associated with autosomal dominant type of CMT are excluded in families H and T. The CMT in these families is caused probably due to a new, not yet reported type of CMT. In family T the linkage to 9 regions with positive LOD score was found. The maximum LOD score – 2.105 was found in four regions on chromosomes 2, 6, 11 and 21. In the family H the linkage to 10 regions with positive LOD score was found. The maximum LOD score – 1.505 was found in seven regions on chromosomes 3, 7, 10, 11, 11, 12 and 17.

The mutations in the gene *RAB7* has to be examined in the family C. The gene *RAB7* is located in the region with linkage, other regions associated with the CMT are excluded. Following plan is to perform next generation sequencing focused on regions with linkage in families with excluded all known regions associated with AD CMT.

Homozygosity mapping in Roma families with early non-syndromic hearing loss or hereditary neuropathy CMT.

Five families were examined by homozygosity mapping: three with non-syndromic hearing loss and two with hereditary neuropathy CMT.

The second largest homozygous region in a deaf patient from consanguineous family NSHL-1 was mapped to previously reported DFNB49 region (Chishti, et al. 2008; Riazuddin, et al. 2006). The sequencing of gene *MARVELD2* revealed the homozygous mutation c.1331+2 T>C (IVS4+2 T>C) in deaf patient. Subsequently the same mutation was found in two more Roma families from a 19 unrelated Czech Roma patients with deafness tested for *MARVELD2* gene. Mutations in the *MARVELD2* gene seem to be a significant cause of early non-syndromic hearing loss in Czech Roma and this gene should be tested in this group of patients after *GJB2*. To explore the importance of *MARVELD2* mutations and DFNB49 for the general Czech and Central European population with early hearing loss we have also tested 40 unrelated Czech patients with autosomal recessive NSHL with previously excluded *GJB2* mutations. No pathogenic mutation in *MARVELD2* gene was found in a group of 40 Czech non-Roma patients.

Homozygosity mapping in additional four families revealed regions with locuses/genes associated with non-syndromic hearing loss and they have to be sequenced for possible mutations.

Phenotypic expression of novel mutations in the genes *GJB1*, *MPZ* and *PMP22*.

We have analysed the character and phenotypic expression in novel, not yet reported mutations in genes frequently associated with hereditary neuropathy.

Five of the six novel mutations in the *GJB1* gene were proved to be pathogenic on the basis of segregation in the families and with the use of in-silico computer analyses. Mutation p.Val170Ile is nonpathogenic polymorphism, because it does not segregate in the family and the position 170 is not strongly conserved among species. This is the first mutation leading to an aminoacid change, which is not pathogenic in *GJB1* gene (Reilly, et al. 2011).

We have proven the pathogenic effect in eight out of 11 novel mutations in the *MPZ* gene.

Two mutations are non-pathogenic polymorphisms, because they were found in healthy family members. Whether the mutation p.Val46Met is pathogenic remains unanswered, the affected patient suffer only from sensitive neuropathy without muscle weakness.

One from the four novel mutations in the *PMP22* gene causes the severe Dejerine-Sottas neuropathy and the remaining three are causal for hereditary neuropathy with liability to pressure palsies.

The findings of novel mutations in genes *GJB1*, *MPZ* and *PMP22* were published in journals Genetic Testing and Molecular Biomarkers, Clinical Genetics and Muscle and Nerve.

1 Oddíl - Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth s neobjasněným genovým defektem.

1.1 Úvod

Dědičná neuropatie neboli onemocnění Charcot-Marie-Tooth je nejčastějším nervosvalovým onemocněním s prevalencí 1:2500. Jiný často používaný název je hereditární motoricko-senzitivní neuropatie – HMSN (Thomas, et al. 1974). Základní dělení dědičných neuropatií je podle elektrofyziologických nálezů resp. podle rychlosti vedení vzruchu periferním nervem na typ 1 – demyelinizační a typ 2 – axonální. U demyelinizačního typu (typu 1) je rychlost vedení na n. medianus nižší než 38 m/s, v důsledku postižení myelinového obalu nervu. U axonálního typu (typ 2) jsou rychlosti vedení na n. medianus normální nebo jen lehce snížené, ale vyšší než 38 m/s, převládají však nízké amplitudy sumačního akčního svalového potenciálu v důsledku postižení axonu (Haberlova, et al. 2006; Harding and Thomas 1980). CMT se obvykle projevuje progresivní distální svalovou slabostí a atrofiemi dříve na dolních a později většinou i na horních končetinách. CMT je klinicky i geneticky velice heterogenní onemocnění (Thomas, et al. 1974). Dosud je známo více než 40 genů, jejichž mutace může způsobit CMT a řada dalších lokusů s dosud neobjevenými geny (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/Default.cfm> [cit.2011-05-10]). U CMT jsou známy všechny způsoby mendelovské dědičnosti.

Při rodinném výskytu CMT je možno použít vazebnou analýzu k hledání oblastí v genomu s vazbou k onemocnění. Spolupráce DNA laboratoře s Univerzitou v Antverpách vedla už v minulosti např. k objevu mutace v genu *HSP22* u rodiny s autozomálně dominantní formou

distální motorické neuropatie (dHMNII) pomocí vazebné analýzy s použitím mikrosatelitových markerů (Irobi, et al. 2004).

1.2 Cíle

1. Doplnit klinická a genealogická data vybraných rodin a doplnit a shromáždit chybějící vzorky DNA od všech dostupných a chybějících členů vybraných rodin.
2. Provést celogenomové genotypování pomocí SNP čipů u nejvhodnějších rodin a vyhodnotit výsledky.
3. Charakterizovat chromozomální lokusy s vazbou k onemocnění v rodině. Analyzovat a detekovat kauzální mutace ve vybraných kandidátních genech uvnitř zjištěných lokusů.

1.3 Pacienti

DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie UK 2.LF již od roku 1997 provádí DNA vyšetření pacientů s dědičnou neuropatií a podařilo se tak shromáždit rozsáhlý soubor více než 2500 rodin resp. nepříbuzných pacientů s onemocněním CMT. U přibližně poloviny nepříbuzných pacientů zůstává, i po vyloučení nejčastějších příčin a rodinném výskytu, příčina CMT neznámá.

Z takovéto skupiny bylo vybráno 8 rodin s CMT vhodných, po kompletním doplnění všech klinických dat, pro vazebnou analýzu. U všech osmi rodin se jednalo o autozomálně dominantní (AD) typ přenosu. Čtyři rodiny (rodina C, M, N, O) byly dle EMG nálezu

zařazeny jako demyelinizační – typ CMT1. U zbylých čtyř rodin (rodina E, R, H, T) byl zjištěn axonální typ CMT – CMT2.

Vzorky DNA byly získány buď izolací z periferní krve nebo ze slin. Všichni vyšetření podepsali informovaný souhlas s diagnostikou CMT v jejich rodině.

1.4 Metody

1.4.1 Genetická vyšetření

Celogenomové genotypování pomocí SNP čipů firmy Affymetrix proběhlo na zakázku v Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky (<http://core.img.cas.cz/> [cit.2008-7-20]) ÚMG ČAV. Rodiny byly genotypovány na čipech Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K arrays XbaI 142 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Následné zpracování genotypů a export souborů pro vazebnou analýzu byl proveden s použitím programu Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis Software [GTYPE verze 4.1].

Výpočet vazebné analýzy byl proveden v programu pro statistickou genetiku Merlin [verze 1.1.2] (Abecasis, et al. 2002). Pro výpočet parametrické vazebné analýzy byla použita frekvence postižené alely v populaci 0.0001 a penetrance byla nastavena pro autozomálně dominantní přenos onemocnění s plnou penetrancí (riziko postižení u osoby mající 0,1,2 kopie postižené alely - 0.0001,1.0,1.0)

Pro upřesnění pozice jednotlivých SNP a genů popsanych pro CMT byl použit UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/> [cit 2009-3-10]) s human genome reference assembly GRCh37.

1.4.2 Klinická a elektrofyziologická vyšetření

Klinická vyšetření byla prováděna Prof. MUDr. Pavlem Seemanem, Ph.D v ambulancích Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FNM.

Elektrofyziologická i klinická vyšetření dospělých pacientů prováděl As. MUDr. Radim Mazanec, Ph.D. na Neurologické klinice dospělých 2.LF UK a FNM. Elektrofyziologická i neurologická vyšetření dětských pacientů prováděla na Klinice dětské neurologie 2.LF UK a FNM As. MUDr. Jana Haberlová, Ph.D.

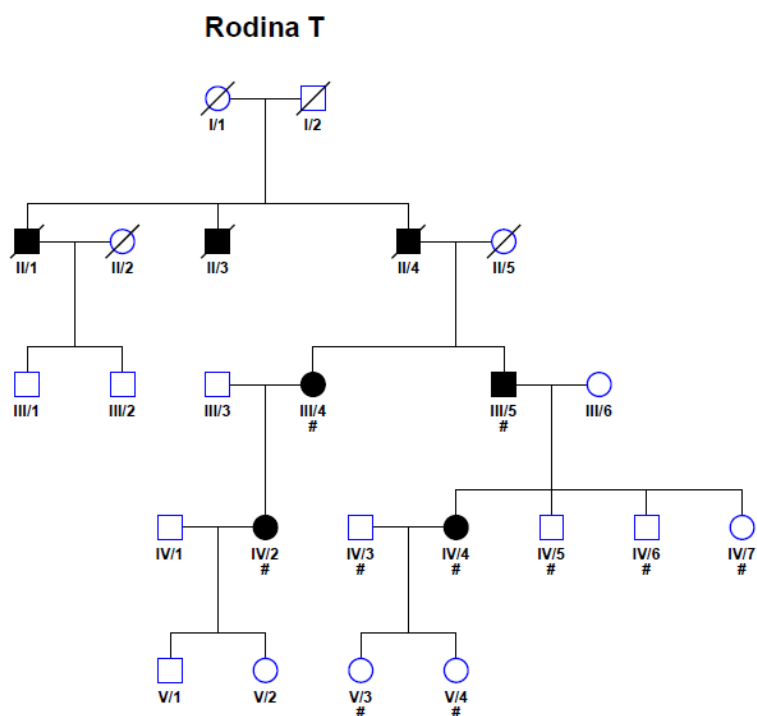
1.5 Výsledky

U rodin N, O, C, se nepodařilo zkompletovat klinické nálezy, vzorky DNA a vyšetřit zbylé členy rodiny. V rodině R byla ještě před začátkem genotypování objevena kauzální mutace v genu *MFN2* zodpovědná za onemocnění CMT v této rodině.

1.5.1 Rodina T

Klinická vyšetření

Opakováním klinického a elektrofyziologického vyšetření u části rodiny T (Obrázek 1) umožnilo upřesnit velice mírný fenotyp axonálního (CMT2) typu CMT v rodině (Tabulka 1). Dle nového EMG vyšetření byl upřesněn nález u pacientky IV/2 a nově byla zařazena jako postižená onemocněním CMT. Podrobnou anamnézou se podařilo vypátrat a získat tkáň již zemřelého člena rodiny T – II/4. Bohužel izolovaná DNA z parafínových bločků byla značně fragmentovaná a nebylo ji možno použít k hybridizaci na čípech a k rozšíření vazebné analýzy.



Obrázek 1– rodokmen rodiny T s autozomálně dominantním typem CMT.

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - členové rodiny genotypovaní na čípech Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K arrays XbaI.

První příznak onemocnění u pacienta III/5 začal ve 35 letech tvrdým došlapováním. V době vyšetření mu bylo 59 let a v posledních 3 letech uvádí chladnutí nohou, nešikovnost rukou a špatnou stabilitu. V klinickém nálezu byly hypotrofie drobných svalů ruky a předloktí a nevybavné reflexy na horních končetinách. Na dolních končetinách byla naznačena deformita pes cavus, oslabena dorsální a plantární flexe nohy. Punčochovitá taktilní hypestezie sahala ke kolenům na DK a k loktům na horních končetinách.

Pacientka III/4 si všimla prvních příznaků v 50 letech, kdy se jí zhoršila chůze, nemohla se rozběhnout a postavit se na špičky. V době vyšetření bylo pacientce 61 let a v nálezu dominovala deformita nohou – vyšší nárt a kladívkové prsty, zhoršená citlivost obou nohou a horší šikovnost prstů obou rukou.

Pacientka IV/4 pozoruje dupavou chůzi od 40 let. Na nohou je patrný vyšší nárt, kladívkové prsty a atrofie drobných svalů nohy. Lehké atrofie jsou patrné i na drobných svalech ruky.

Pacientka IV/2 byla zařazena jako postižená až po opakovaném klinickém a elektrofyziologickém vyšetření. Subjektivně si nestěžuje na žádné problémy. Objektivně má ve 42 letech pouze vyšší nárt s kladívkovými prsty a hypotrofie drobných svalů nohou. Na EMG vyšetření je léze pouze motorických nervů bez postižení senzitivních nervů .

Tabulka 1– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny T.

U postižených členů rodiny T je nález na EMG vyšetření nejvíce abnormní u pacientů III/5 a III/4, kteří jsou i starší a onemocnění u nich trvá již delší dobu. U pacienta III/5 je kromě nižších amplitud patrná i snížená rychlost vedení. U pacientek IV/4 a IV/2 jsou EMG nálezy vyjádřeny jen mírně.

	horní končetiny							
	n. medianus		n. ulnaris		n. medianus		n. ulnaris	
	MNCV	Amplituda	MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda
norma	> 50 m/s	> 4.2 mV	> 50 m/s	> 5.5 mV	> 48 m/s	> 15 µV	> 48 m/s	> 10 µV
III/5	43 m/s	2.6 mV	49 m/s	4.4 mV	29 m/s	4.7 µV	47 m/s	3.9 µV
III/4	58.0 m/s	4.7 mV	72.6 m/s	10.1 mV	61.5 m/s	15.7 µV	nr	-
IV/4	52.6 m/s	11.2 mV	63.0 m/s	7.9 mV	44.4 m/s	39.8 µV	47.2 m/s	26.6 µV
IV/2	59.7 m/s	9.1 mV	60.6 m/s	13.1 mV	57.1 m/s	18.7 µV	60.9 m/s	19.3 µV

	dolní končetiny			
	n. tibialis		n. suralis	
	MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda
norma	> 40 m/s	> 2.5 mV	> 38 m/s	> 8.8 µV
III/5	nr	-	nr	-
III/4	51.7 m/s	0.5 mV	35.4 m/s	7.7 µV
IV/4	38.9 m/s	5.2 mV	nr	-
IV/2	43.9 m/s	5.8 mV	45.2 m/s	7.6 µV

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.-, nevybavné. Abnormní hodnoty jsou zvýrazněné tučně.

V rodině T se jedná o dědičnou neuropatii axonálního typu s pozdním vznikem obtíží a mírným klinickým nálezem, ve kterém dominují deformity nohou typu pes cavus a atrofie drobných svalů ruky a nohy.

Genetická vyšetření

Předchozím DNA vyšetřením, provedeným v naší laboratoři, byly u této rodiny vyloučeny kauzální mutace v genech *GJB1*, *MPZ* a *MFN2*. Pomocí mikrosatelitové fragmentační analýzy byla vyloučena duplikace/delece genu *PMP22*.

Celogenomovým genotypováním bylo vyšetřeno 11 členů rodiny (Obrázek 1). Výpočet vazebné analýzy programem Merlin ukázal 9 oblastí s pozitivním LOD skóre pro rodinu T (Tabulka 2).

Nejvyššího LOD skóre – 2.105 dosáhly čtyři oblasti na chromozomech 2, 6, 11 a 21.

Tabulka 2– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny T.

chr.	LOD max	počet SNP	rozsah oblasti		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band
			začátek	konec	začátek	konec		
2	2.105	4	rs2355056	rs1048610	8,228,731	9,634,856	1.41	2p25.1
4	1.004	4	rs2022302	rs1822320	2,175,733	4,213,339	2.04	4p16.3
6	2.107	161	rs2224003	rs675016	95,156,418	140,233,497	45.08	6q16.1-q24.1
9	1.893	10	rs946816	rs2185935	115,091,259	117,502,242	2.41	9q32
11	2.107	31	rs762044	rs1037412	33,533,485	40,276,725	6.74	11p13-p12
12	0.828	5	rs2895125	rs708354	129,680,945	130,474,184	0.79	12q24.33
18	0.495	7	rs657138	rs2160964	252,559	1,574,274	1.32	18p11.32
20	1.295	11	rs721220	rs1569608	30,006,309	38,016,516	8.01	20q11.21-q12
21	2.107	40	rs2249007	rs1041437	29,762,974	38,198,459	8.44	21q21.3-q22.13

chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

Porovnáním nalezených oblastí s vazbou s oblastmi již popsány u CMT byl nalezen překryv s genem *FIG4* na chromozomu 6. Tento gen byl popsán u rodin s autozomálně recesivním přenosem CMT a proto jsme ho z důvodu AD přenosu CMT v této rodině vyloučili z dalšího testování.

K vyloučení vazby u zbylých AD lokusů/genů byla použita hodnota LOD skóre nižší než –2.

Podářilo se vyloučit všechny AD geny spojené s CMT kromě *HSPB1*, *BSCL2* a *SOX10*.

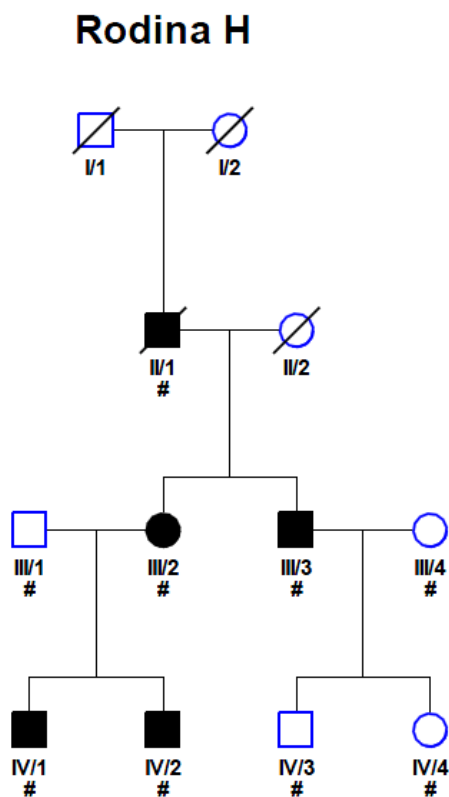
Sekvenování neodhalilo patogenní mutace v genech *HSPB1* a *BSCL2*. Gen *SOX10* neodpovídal fenotypu v rodině a nebyl proto vybrán k sekvenování.

1.5.2 Rodina H

Klinická vyšetření

V rodině H se podařilo doplnit informace o druhé části rodiny (III/3, III/4, IV/3, IV/4) a provést u nich klinická a EMG vyšetření a odběr krve na izolaci DNA (Obrázek 2).

Onemocnění CMT se v rodině přenáší autozomálně dominantně (AD) a dle EMG vyšetření se jedná o axonální (typ 2) formu CMT (Tabulka 3).



Obrázek 2– rodokmen rodiny H s autozomálně dominantním typem CMT.

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - členové rodiny genotypovaní na čípech Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K arrays XbaI.

První příznaky onemocnění - slabost dolních končetin, se objevují kolem 15 let věku (u pacientů IV/1, IV/2) a později kolem 35 let věku (III/2, III/3). U pacientů IV/1 a IV/2 nastupuje slabost horních končetin kolem 28 let věku u pacientů III/2 a III/3 kolem 44 let

věku. U všech postižených členů rodiny jsou výrazné atrofie od kolen distálně (Obrázek 3) se sníženými až vyhaslými reflexy a hypestezií od kolen dolů. Mírné atrofie jsou patrné i na horních končetinách a postižení si stěžují na neobratnost rukou.

Tabulka 3– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny H.

Patrné jsou výrazně snížené amplitudy, které vypovídají o axonálním typu CMT – CMT2. Naopak rychlosti vedení na EMG jsou téměř v normě, kromě pacientů III/2 a III/3, kteří jsou výrazně starší a onemocnění CMT u nich začínalo v mladším věku než u pacientů IV/1 a IV/2.

	horní končetiny							
	n. medianus		n. ulnaris		n. medianus		n. ulnaris	
	MNCV	Amplituda	MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda
norma	> 50 m/s	> 4.2 mV	> 50 m/s	> 5.5 mV	> 48 m/s	> 15 µV	> 48 m/s	> 10 µV
IV/1	55.5 m/s	4.4mV	62.1 m/s	9.0 mV	43.5m/s	30µV	42.8 m/s	18 µV
IV/2	57.3 m/s	10.4 mV	55.7 m/s	10.3 mV	37.8 m/s	12,1 µV	41.5 m/s	5.1 µV
III/2	39.3 m/s	1.2 mV	64.7 m/s	7.5 mV	29.5 m/s	20.0 µV	33.3 m/s	22.0 µV
III/3	48.0 m/s	0.8 mV	57.3 m/s	3.8 mV	31,7 m/s	3.8 µV	34.2 m/s	1.7 µV

	dolní končetiny			
	n. tibialis		n. suralis	
	MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda
norma	> 40 m/s	> 2.5 mV	> 38 m/s	> 8.8 µV
IV/1	51.8 m/s	13.1 mV	32.3 m/s	12 µV
IV/2	44.7 m/s	12.8 mV	38.6 m/s	7.8 µV
III/2	36.0 m/s	2.9 mV	25.5 m/s	5.5 µV
III/3	37.9 m/s	3.2 mV	n.r.	-

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.- nevybavné. Patologické hodnoty jsou zvýrazněné tučně.

Obrázek 3 – pacienti rodiny H

Obrázky dolních končetin ukazují výrazné atrofie od kolen distálně, nejvíce patrné u pacienta IV/1. U pacientky III/2 je vidět i oslabení a neobratnost horních končetin, kdy pacientce dělá problém sevřít prsty do špetky.

Pacientka III/2



Pacient IV/1



Pacient IV/2



Genetická vyšetření

Předchozím DNA vyšetřením, provedeným v naší laboratoři, byly u této rodiny vyloučeny kauzální mutace v genech *MPZ*, *MFN2* a *PMP22*. Případná mutace v genu *GJB1* je vyloučena už v rodokmenu přenosem onemocnění z otce na syna.

Celogenomovým genotypováním bylo vyšetřeno 8 členů rodiny. Výpočet vazebné analýzy programem Merlin ukázal 10 oblastí s pozitivním LOD skóre pro rodinu H (Tabulka 4).

Nejvyššího LOD skóre – 1.505 dosáhlo sedm oblastí na chromozomech 3, 7, 10, 11, 11, 12 a 17.

Tabulka 4– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny H

chr.	LOD max	počet SNP	rozsah oblastí		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band
			začátek	konec	začátek	konec		
1	0.332	10	rs2050632	rs2211638	245,159,567	248,793,746	3.63	1q44
3	1.505	75	rs1351865	rs3906725	678,347	11,666,294	10.99	3p26.3-p25.3
6	0.195	13	rs201249	rs1342008	10,013,680	14,568,669	4.55	6p24.3-p23
7	1.505	51	rs1569095	rs1075042	48,544,033	71,395,150	22.85	7p12.3-q11.22
10	1.505	25	rs2344769	rs1917152	82,505,813	87,603,451	5.10	10q23.1
11	1.505	51	rs2346824	rs1895727	7,397,799	19,777,715	12.38	11p15.4-p15.1
11	1.505	6	rs1431775	rs718239	133,037,343	134,897,304	1.86	11q25
12	1.505	30	rs1392237	rs952724	123,095,041	132,022,561	8.93	12q24.31-q24.33
17	1.505	49	rs781852	rs1589464	3,953,102	25,412,715	21.46	17p13.2-q11.1
18	0.248	3	rs1944014	rs476897	76,025,123	77,166,453	1.14	18q23

chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

Porovnáním nalezených oblastí s vazbou s oblastmi již popsanými u CMT byl nalezen překryv s genem *SBF2* na chromozomu 11, s lokusem CMT4G a s genem *PMP22* na chromozomu 17. Gen *SBF2* a lokus CMT4G jsme z dalšího testování vyloučili, protože mutace genu *SBF2* a lokus CMT4G byly popsány pouze u rodin s autozomálně recesivním přenosem.

K vyloučení vazby u zbylých AD lokusů/genů byla použita hodnota LOD skóre nižší než –2.

Podářilo se vyloučit všechny AD geny spojené s CMT kromě genů *HSPB1* a *HSPB8*.

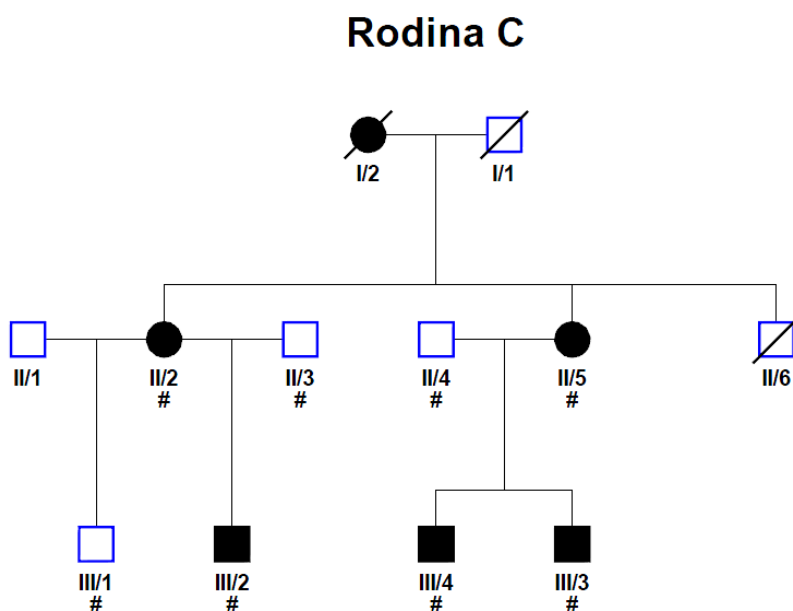
Sekvenování neodhalilo patogenní mutace v genech *HSPB8* a *HSPB1*, ani v genu *PMP22* který se vyskytuje v oblasti s vazbou.

1.5.3 Rodina C

Klinická vyšetření

Rodinu C bohužel nebylo možno doplnit o další příbuzné, a zvýšit tak počet členů genotypovaných na SNP čípech a tak i LOD skóre (Obrázek 4).

V rodině C jde o demyelinizační typ CMT (CMT1) a autozomálně dominantní (AD) typ přenosu.



Obrázek 4– rodokmen rodiny C s autozomálně dominantním typem CMT.

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - členové rodiny genotypovaní na čípech Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K arrays XbaI.

Projev CMT je výraznější u obou starších pacientek II/2 a II/5 (45 a 50 let v době vyšetření), které mají slabost nejen na dolních, ale i na horních končetinách a zhoršenou jemnou motoriku. U pacientky II/2 jsou patrné svalové atrofie na pravém předloktí a nevýbavné reflexy na horních končetinách.

U mladších pacientů III/2, III/3 a III/4 se onemocnění CMT projevuje pouze na dolních končetinách a to sníženými až vyhaslými reflexy a omezenou dorsální flexí. U pacientů III/3

a III/4 je deformita nohy typu pes planovalgus, u pacienta III/2 je spíše vyšší klenba chodidla (Obrázek 5).

Dle nálezu na EMG (Tabulka 5) se jedná o těžkou demyelinizační formu CMT.

Tabulka 5– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny C.

U všech vyšetřených členů rodiny C jsou jak na horních, tak na dolních končetinách patrné výrazně snížené rychlosti vedení pod 38 m/s, které svědčí pro typ CMT 1 – demyelinizační. Distální motorické latence jsou v normě.

	horní končetiny							
	n. medianus		n. ulnaris		n. medianus		n. ulnaris	
	MNCV	DML	MNCV	DML	SNCV	DML	SNCV	DML
norma	> 50 m/s	> 3.6 ms	> 50 m/s	> 2.5 ms	> 48 m/s	> 15 μ V	> 48 m/s	> 10 μ V
II/5	21.0 m/s	7.5 ms	19.6 m/s	4.4 ms	n.r.	-	n.r.	-
III/4	34.1 m/s	5.8 ms	30.8 m/s	3.5 ms	NA	-	NA	-
III/3	32.4 m/s	7.1 ms	23.8 m/s	4.9 ms	NA	-	NA	-
II/2	19.9 m/s	9.0 ms	26.7 m/s	6.5 ms	NA	-	NA	-
III/2	32.1 m/s	4.0 ms	40.0 m/s	2.9 ms	NA	-	NA	-

	dolní končetiny			
	n. tibialis		n. suralis	
	MNCV	DML	SNCV	DML
norma	> 40 m/s	> 5.1 ms	> 38 m/s	> 8.8 μ V
II/5	n.r.	-	n.r.	-
III/4	26.1 m/s	7.0 ms	NA	-
III/3	23.1 m/s	7.5 ms	NA	-
II/2	15.3 m/s	8.0 ms	NA	-
III/2	31.3 m/s	6.0 ms	NA	-

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.- nevybavné. NA – hodnota není k dispozici. Abnormní hodnoty jsou zvýrazněné tučně.

Obrázek 5– pacienti rodiny C

Na obrázcích pacientek II/5 a II/2 jsou patrné deformity chodidel – pes cavus. U pacientů III/3 a III/4 jsou spíše chodidla plochá a u pacienta III/2 je patrna vyšší klenba. Atrofie svalů dolních končetin nejsou patrné.

Pacientka II/5



Pacient III/3



Pacient III/4



Pacientka II/2



Pacient III/2



Genetická vyšetření

Předchozím DNA vyšetřením, provedeným v naší laboratoři, byly u této rodiny vyloučeny kauzální mutace v genech *MPZ*, *GJB1*. Pomocí mikrosatelitové analýzy byla vyloučena duplikace/delece genu *PMP22*.

Celogenomovým genotypováním bylo vyšetřeno 8 členů rodiny. Výpočet vazebné analýzy programem Merlin odhalil 21 oblastí s pozitivním LOD skóre pro rodinu C (Tabulka 6).

Nejvyššího LOD skóre – 1.2 dosáhlo deset oblastí.

Tabulka 6– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny C

chr.	LOD max	počet SNP	rozsah oblasti		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band
			začátek	konec	začátek	konec		
1	1.154	36	rs1393064	rs728611	3,099,138	19,948,507	16.85	1p36.32-1p36.13
3	1.204	233	rs1036051	rs1369548	69,899,367	149,260,080	79.36	3p13-3q25.1
4	1.204	95	rs2324240	rs1105434	23,962,127	57,793,751	33.83	4p15.2-4q12
4	1.203	115	rs4129776	rs1112139	165,282,315	190,716,184	25.43	4q32.3-4q35.2
5	1.204	247	rs1371810	rs2312165	34,503,352	104,992,579	70.49	5p13.2-5q21.3
6	1.203	86	rs1418708	rs2077780	205,610	18,321,071	18.12	6p25.3-6p22.3
7	1.203	3	rs1074977	rs1181740	139,492,647	141,133,121	1.64	7q34
7	1.087	23	rs1382191	rs842437	148,707,217	158,555,449	9.85	7q36.1-7q36.3
11	1.204	179	rs1944714	rs763857	79385403	113,997,335	34.61	11q14.1-11q23.2
13	1.204	50	rs726249	rs1026727	72,652,421	81,824,427	9.17	13q21.33-13q31.1
14	1.173	11	rs1950710	rs2378971	29,659,737	32,370,206	2.71	14q12
14	1.204	138	rs2332909	rs726996	73,163,314	107,240,991	34.08	14q24.2-14q32.33
16	1.174	12	rs1364193	rs1420576	29,234,698	51,236,129	22.00	16p11.2-16q12.1
18	1.199	26	rs2006747	rs2083020	47,968,358	54,567,759	6.60	18q21.1-18q21.31
18	0.266	11	rs666198	rs952857	59,663,565	61,374,572	1.71	18q21.33
18	1.182	37	rs967975	rs476897	67,062,025	77,166,453	10.10	18q23-18q22.2
19	1.167	17	rs1366444	rs2411320	48,563,534	51,901,439	3.34	19q13.33-19q13.41
20	1.194	36	rs916954	rs720607	51,859,302	61,895,909	10.04	20q13.2-20q13.33
21	1.201	21	rs2409523	rs2032092	35,918,051	39,782,971	3.86	21q22.12-21q22.2
21	0.438	9	rs915847	rs1598206	43,657,248	45,058,776	1.40	21q22.3
22	1.198	21	rs763668	rs2340603	37,511,076	50,578,813	13.07	22q12.3-22q13.33

chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

Porovnáním nalezených oblastí s vazbou s oblastmi již popsanými u CMT byl nalezen překryv se třemi geny – *MFN2*, *RAB7*, *SOX10* a jednou oblastí- HMSN-P . Gen *SOX10* a oblast HMSN-P jsme z dalšího testování vyloučili, protože fenotyp popsaný u těchto příčin CMT neodpovídá projevu onemocnění u rodiny C. Sekvenování neodhalilo patogenní mutace v genu *MFN2*. Gen *RAB7* ještě nebyl dosud testován.

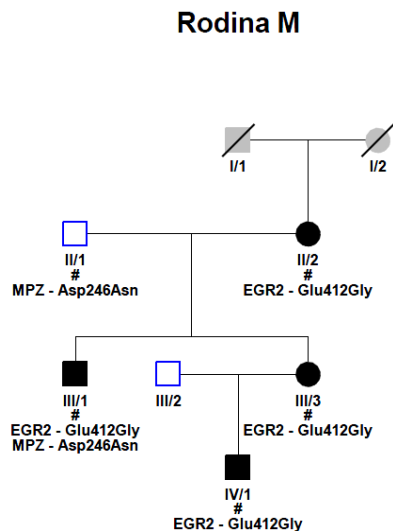
K vyloučení vazby u zbylých AD lokusů/genů byla použita hodnota LOD skóre nižší než –2.

Podářilo se vyloučit všechny AD geny spojené s CMT.

1.5.4 Rodina M

Klinická vyšetření

Rodina M je nejmenší rodinou, která byla vybrána na celogenomové vyšetření pomocí SNP čipů (Obrázek 6).



Obrázek 6– rodokmen rodiny M s autozomálně dominantním typem CMT a vyznačenými mutacemi v genech *EGR2* a *MPZ*.

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - členové rodiny genotypovaní na čípech Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K arrays XbaI.

HMSN bylo v této rodině diagnostikováno díky těžšímu postižení probanda III/1, který byl pro své problémy vyšetřen v 10 letech a byla mu stanovena diagnóza dědičné neuropatie CMT, demyelinizační typ, tedy HMSN I. Pomocí elektrofyziologického vyšetření byla HMSN I diagnostikována i u probandovy matky a sestry, které mají klinicky jen zcela mírné postižení, ale rychlosti vedení periferními nervy jsou u nich výrazně sniženy (Tabulka 7).

Proband III/1 měl v době vyšetření ve 37 letech výrazné svalové atrofie od kolen distálně, periferní svalovou slabost s oslabením flexe a extenze chodidla (Obrázek 7). Pacient rovněž prodělal ortopedické korekce obou nohou – ve 14 a 22 letech. Výrazné svalové atrofie byly u něj přítomné také na horních končetinách a sahaly až na předloktí.

První problémy u matky probanda - II/2 se objevily až ve 45 letech. Vyšetření v 65 letech ukázalo mírné svalové atrofie od kolen distálně se zkrácením obou Achillových šlach. Flexe a extense chodidla je jen mírně oslabená (MRC 4/5). Na horních končetinách nejsou žádné atrofie ani oslabení svalové síly.

U sestry probanda III/3 byla diagnóza CMT stanovena také na základě EMG vyšetření, ona sama nepozoruje žádné omezení ze strany nemoci. Vyšetření ve 45 letech ukázalo zkrácení Achillových šlach s mírnými atrofiemi od kolen distálně a mírně omezenou extenzí chodidla. Na horních končetinách nejsou žádné atrofie ani omezení svalové síly.

Pacienta IV/1 nebylo možné vyšetřit, ale na základě staršího výsledku EMG vyšetření, měl také výrazně snížené rychlosti vedení periferním nervem.

Tabulka 7– Elektrofyziologická vyšetření postižených členů rodiny M.

U postižených členů rodiny M byly zjištěny výrazně snížené rychlosti vedení periferním nervem na horních i dolních končetinách, které je řadí jako typ demyelinizační – CMT1 resp. HMSN I.

U těžce postiženého pacienta III/1 a jeho matky II/2 nejsou výbavné senzitivní neurogramy pro n. ulnaris. Všichni tři pacienti mají nevýbavné senzitivní a motorické neurogramy pro tibiální a surální nervy na dolních končetinách. Pacient III/1 má i snížené amplitudy, které svědčí pro již pokročilou sekundární axonopatii.

	horní končetiny							
	n. medianus		n. ulnaris		n. medianus		n. ulnaris	
	MNCV	Amplitude	MNCV	Amplitude	SNCV	Amplitude	SNCV	Amplitude
norma	> 50 m/s	> 4.2 mV	> 50 m/s	> 5.5 mV	> 48 m/s	> 15 µV	> 48 m/s	> 10 µV
II/2	39.0 m/s	5.2mV	43.0 m/s	6.7 mV	36.0m/s	3µV	n.r.	-
III/1	27.0 m/s	0.2 mV	37.0 m/s	1.2 mV	28.0 m/s	1,0 µV	n.r.	-
III/3	34.0 m/s	6.1 mV	41.0 m/s	6.9 mV	35.0 m/s	6.0 µV	29.0 m/s	9.0 µV

	dolní končetiny			
	n. tibialis		n. suralis	
	MNCV	Amplitude	SNCV	Amplitude
norma	> 40 m/s	> 2.5 mV	> 38 m/s	> 8.8 µV
II/2	n.r.	-	n.r.	-
III/1	n.r.	-	n.r.	-
III/3	n.r.	-	n.r.	-

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.- nevýbavné. Abnormální hodnoty jsou zvýrazněné tučně.

Obrázek 7– pacienti rodiny M

Na obrázcích pacientky II/2 (ve věku 65 let) jsou patrné mírné svalové atrofie od kolen distálně, s vyšším nártem a bez známek atrofií na horních končetinách. U pacienta III/1 (ve věku 37 let) jsou patrné výrazné atrofie od kolen distálně, a deformity chodidel již po korekčních ortopedických operacích. Pacientka III/3 (ve věku 45 let) nemá žádné atrofie dolních končetin.

Pacientka II/2



Pacientka III/3



Pacient III/1



Genetická vyšetření

Předchozím DNA vyšetřením byly v této rodině vyloučeny kauzální mutace v genech *MPZ*, *GJB1*, *PMP22*. Pomocí mikrosatelitové analýzy byla již dříve vyloučena duplikace/delece genu *PMP22*.

Celogenomovým genotypováním bylo vyšetřeno 5 členů rodiny. Výpočet vazebné analýzy programem Merlin odhalil 35 oblastí s pozitivním LOD skóre pro rodinu M (Tabulka 8). Nejvyšší LOD skóre všech oblastí bylo – 0.6.

Tabulka 8– Přehled oblastí s pozitivním LOD skóre nalezených u rodiny M

chr.	LOD max	počet SNP	rozsah oblasti		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band
			začátek	konec	začátek	konec		
1	0.602	140	rs2206321	rs706440	12,540,763	58,909,250	46.37	1p36.22-p32.2
1	0.602	187	rs1338685	rs1419276	157,252,102	201,339,380	44.09	1q23.1-q32.1
2	0.602	110	rs666384	rs2311398	79,225,545	121,483,732	42.26	2p12-q14.2
2	0.602	100	rs1583765	rs207820	188,970,900	217,137,980	28.17	2q32.1-q35
2	0.602	54	rs1835338	rs699662	218,630,599	231,402,891	12.77	2q35-37.1
3	0.602	30	rs1351865	rs1391962	678,347	5,337,049	4.66	3p26.3-p26.1
3	0.602	107	rs728330	rs1112438	9,286,438	39,152,345	29.87	3p25.3-p22.2
3	0.602	152	rs950266	rs726443	57,349,865	105,438,320	48.09	3p14.3-q13.11
3	0.602	37	rs1829867	rs2872249	172,093,296	183,636,273	11.54	3q26.31-q27.1
4	0.602	146	rs718429	rs1367297	408,952	39,161,234	38.75	4p16.3-p14
4	0.602	54	rs1396113	rs1823535	40,998,525	62,737,412	21.74	4p14-q13.1
4	0.602	30	rs726896	rs1373667	81,213,792	85,468,878	4.26	4q21.21-q21.23
4	0.602	64	rs722832	rs1112139	178,140,942	190,716,184	12.58	4q34.3-q35.2
5	0.602	3	rs931117	rs889014	171,103,318	172,984,114	1.88	5q35.1-q35.2
6	0.602	271	rs724941	rs607623	76,723,011	145,430,900	68.71	6q14.1-q24.2
6	0.602	6	rs1977656	rs4110877	150,292,741	151,446,716	1.15	6q25.1
7	0.602	243	rs196571	rs763434	36,305,925	124,144,999	87.84	7p14.2-q31.33
8	0.602	141	rs725173	rs1477556	23,464,770	68,649,585	45.18	8p21.2-q13.2
8	0.601	8	rs2879668	rs2010016	95,130,815	99,068,254	3.94	8q22.1-q22.2
10	0.602	139	rs927099	rs1900018	33,525,836	70,047,439	36.52	10p11.22-q21.3
11	0.602	59	rs2188194	rs720459	2,616,530	17,612,776	15.00	11p15.5-p15.1
11	0.602	65	rs1557281	rs411280	114,932,960	131,392,688	16.46	11q23.3-q25
12	0.602	78	rs953385	rs953334	223,422	24,471,815	24.25	12p13.33-p12.1
13	0.602	9	rs2009772	rs2892734	95,829,588	99,017,212	3.19	13q32.1-q32.2
13	0.602	15	rs496916	rs723395	110,851,014	115,022,014	4.17	13q34
14	0.602	50	rs722462	rs726996	94,270,080	107,240,991	12.97	14q32.12-q32.33
16	0.602	29	rs2107321	rs2253911	2,807,263	10,756,055	7.95	16p13.3-p13.13
16	0.602	135	rs3901517	rs726122	50,391,386	82,801,388	32.41	16q12.1-23.3
16	0.600	4	rs717482	rs2353033	86,304,997	89,385,561	3.08	16q24.1-q24.3
17	0.359	6	rs1367950	rs723656	3,618,298	5,865,515	2.25	17p13.2
18	0.602	87	rs657138	rs2077811	252,559	24,304,199	24.05	18p11.32-q11.2
19	0.602	31	rs3905288	rs260445	49,955,222	58,745,931	8.79	19q13.33-q13.43
20	0.602	77	rs763659	rs1040546	15,793,045	42,668,388	26.88	20p12.1-q13.12
X	0.602	53	rs3848938	rs721422	4,205,573	32,352,714	28.15	Xp22.33-p21.1
X	0.602	65	rs946455	rs725301	110,273,995	144,884,837	34.61	Xq23-q27.3

chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

Porovnáním nalezených oblastí s vazbou s oblastmi již popsány u CMT byl nalezen překryv s těmito pěti geny – *YARS*, *MPZ*, *HSPB1*, *NEFL*, *EGR2* a oblastí- HMSN-P (proximální) a oblastí pro distální HMN (dHMN).

Oblasti dHMN a HMSN-P byly z dalšího testování vynechány, protože se zásadně odlišovaly od pozorovaného fenotypu onemocnění v rodině, tedy HMSNI. Sekvenováním genu *EGR2* byla nalezena mutace c.1235 A>G (p.Glu412Gly), která segreguje s onemocněním v rodině, postihuje konzervovaný kodon a byla popsána jiná mutace stejného kodonu, proto ji považujeme za kauzální. Zbývající geny *YARS*, *HSPB1* a *NEFL* byly také vyšetřeny sekvenováním všech kódujících exonů a přílehlých intronových sekvencí a to bez nálezů patogenní mutace. Kódující oblast genu *MPZ* byla sekvenována již před vyšetřením rodiny na čipech a byla v ní nalezena mutace p.Asp246Asn, která však byla nalezena i u probandova zdravého otce a sama je považována za polymorfismus nebo případně za recesivní mutaci (Brozkova, et al. 2010).

1.6 Diskuse

Celogenomové genotypování na SNP čipech bylo provedeno u čtyř rodin, u kterých se podařilo upřesnit klinický nález a dovyšetřit všechny dostupné příbuzné.

V rodinách T a H se podařilo vyloučit všechny autozomálně dominantní lokusy spojené s CMT. V lokusech s vazbou se nacházel pouze gen *PMP22* u rodiny H a jeho sekvenováním nebyla nalezena žádná patogenní mutace a jako příčina onemocnění CMT v této rodině je s velkou pravděpodobností vyloučen. Sekvenováním dalších genů s dominantním typem dědičnosti, které se nacházely v oblastech s vyšším LOD skóre než -2 byly vyloučeny i zbylé geny spojené s AD typem CMT. Vyloučením všech dosud popsáných genů spojovaných s AD CMT se bude jednat pravděpodobně o novou, ještě nepopsanou formu CMT. U rodiny

H je 7 oblastí s nejvyšším LOD skóre 1.5, u rodiny T jsou 4 oblasti s nejvyšším LOD skóre 2.1.

V rodině C se vyskytuje 10 oblastí s vazbou a nejvyšším LOD skóre 1.2. Geny spojené s CMT nacházející se v pozitivní oblasti byly vyloučeny sekvenováním, zbývá ještě sekvenovat gen *RAB7*. Zbylé geny s AD dědičností jsou vyloučeny, protože se nacházejí v oblastech s LOD skóre nižším než -2. Pokud nebude v genu *RAB7* sekvenováním odhalena kauzální mutace bude se jednat také o novou formu CMT.

V rodině M vedlo použití vazebné analýzy k odhalení 35 pozitivních lokusů s vazbou. Nacházelo se v nich 5 genů a 2 lokusy spojené s CMT. Sekvenováním těchto genů se našla kauzální mutace p.Glu412Gly v genu *EGR2*. Ve stejném kodónu byla již dříve popsána mutace p.Glu412Lys (Szigeti, et al. 2007), aminokyselina 412 se nachází v třetím zinkovém prstu a je mezidruhově konzervovaná, což podporuje patogenní charakter nalezené mutace p.Glu412Gly.

Zajímavým nálezem je současný výskyt mutace v genu *EGR2* a *MPZ* u výrazně více postiženého probanda (III/1). Mutace p.Asp246Asn v genu *MPZ* byla nalezena i u zdravého otce (II/1) a je proto samostatně považována za polymorfismus nebo případně recesivní mutaci. Je možné, že interakce těchto dvou mutací je odpovědná za těžší fenotyp probanda. Gen *EGR2* kóduje transkripční faktor, který hraje důležitou roli ve vývoji myelinu a v aktivaci genů jako je *MPZ* (LeBlanc, et al. 2007).

SNP genotypování dohromady s vazebnou analýzou může pomoci najít kauzální mutaci i v tak malé rodině, kde jsou mutace v nejčastějších geny již vyloučené.

1.7 Závěr

Vazebné analýzy umožnily vyloučit řadu známých genů a lokusů u rodin s CMT bez nutnosti sekvenování jednotlivých genů.

U rodin H a T se podle dosavadních výsledků zřejmě jedná o novou formu CMT. V rodině C zbývá vyloučit gen *RAB 7* jako možnou příčinu CMT.

V těchto rodinách, kde byla prokázána vazba k více chromozomálním oblastem, dosud nespojovaným s CMT, bude dalším krokem masivní sekvenování (tzv. next generation sequencing – NGS) všech exonů genů ležících ve zjištěných oblastech s vazbou.

V rodině M vedlo genotypování na SNP čipech a vazebná analýza k nálezmu mutace p.Glu412Gly v genu *EGR2*, kterou považujeme za kauzální a jako příčinu CMT v rodině.

2 Oddíl - Homozygotní mapování u romských rodin s časnou nesyndromovou hluchotou nebo dědičnou neuropatií CMT

2.1 Úvod

K homozygotnímu mapování byli vybráni pacienti rómského původu (oba rodiče Romové), u kterých je vysoké procento endogamie a tím i vyšší riziko autozomálně recesivního onemocnění. Ve většině případů AR chorob s již objasněnou molekulární podstatou onemocnění jsou Romové homozygoty pro kauzální mutaci. V posledních letech byla popsána řada onemocnění způsobených u Romů na podkladě tzv. zakladatelské mutace - nalezení stejné mutace stejného genu u více skupin Romů z různých oblastí. Mezi takováto onemocnění patří např.: hereditární motoricko-senzitivní neuropatie typu Lom (HMSN-L) (Kalaydjieva, et al. 2000), kongenitální myastenický syndrom (CMS) (Abicht, et al. 1999), syndrom kongenitální katarakty a faciálního dysmorfismu a demyelinizační neuropatie (CCFDN) (Varon, et al. 2003), pletencová svalová dystrofie typ 2C (LGMD2C) (Piccolo, et al. 1996) a kongenitální glaukom (Plasilova, et al. 1999). Některá tato onemocnění jsou pouze lokální. U jiných jde o kauzální mutaci s původem již v Indii, ještě před odchodem původních předků dnešních Romů směrem do Evropy a může se proto vyskytovat v různých zemích.

Nesyndromová hluchota (NSHL) je geneticky velice heterogenní onemocnění, které se nejčastěji přenáší autozomálně recesivně (AR). Zdaleka nejčastější příčinou AR nesyndromové hluchoty (40-50 %) jsou mutace v genu *GJB2* (Rabionet, et al. 2000), jde o typ DFNB1. U převážné většiny Romů postižených nesyndromovou hluchotou je v genu

GJB2 nalezena mutace p.Trp24X v homozygotním stavu, která je častá i v Indii (Alvarez, et al. 2005; Minarik, et al. 2003; Seeman, et al. 2004a).

Nesyndromová hluchota typ DFNB49 byla popsána a spojena s chromozomální oblastí 5q12.3-q14.1 již v roce 2004 Ramzanem (Ramzan, et al. 2005). O dva roky později byly v oblasti DFNB49 objeveny kauzální mutace v genu *MARVELD2*. Mutace byly prokázány u 8 pákistánských rodin s časnou AR hluchotou (Riazuddin, et al. 2006). Chisti (Chishti, et al. 2008) popsal v roce 2008 další 3 pákistánské rodiny s jednou novou a dvěma popsányými mutacemi v genu *MARVELD2*. Frekvence mutací v genu *MARVELD2* v evropské populaci s časnou nesyndromovou hluchotou je neznámá.

2.2 Cíle

Lokalizovat homozygotní oblasti u neslyšících pacientů, které jsou heterozygotní u jejich zdravých rodičů a najít kauzální geny v těchto oblastech.

2.3 Pacienti

Pro homozygotní mapování bylo vybráno pět pacientů. Pacienti CMT-1 a CMT-2 jsou postiženi dědičnou neuropatií CMT demyelinizačního typu. Pacienti NSHL-1, NSHL-2 a NSHL-3 jsou postiženi časnou nesyndromovou hluchotou. U všech pacientů byl podepsán souhlas s DNA analýzou k vyšetření genetické příčiny hluchoty případně dědičné neuropatie.

U pacientů NSHL-1 a NSHL-2 byli vyšetřeni i další členové rodiny – oba rodiče a u pacienta NSHL-1 i jeho sestra.

U pacientů s NSHL byly již dříve vyloučeny mutace v genu *GJB2*, jako nejčastější příčina AR NSHL. U pacientů s CMT byla předem vyloučena mutace p.Arg148Stop v genu *NDRG1*, která je zodpovědná za neuropatii HMSN- typu Lom (HMSN-L).

2.4 Metody

2.4.1 Homozygotní mapování

Genomová DNA byla izolována z periferní krve dle standardních protokolů. Celogenomové genotypování pomocí SNP čipů firmy Affymetrix proběhlo na zakázku v Servisní laboratoři funkční genomiky a bioinformatiky ÚMG ČAV (<http://core.img.cas.cz/> [cit.2008-7-20]). Pacienti a případně další členové rodiny byli genotypováni na čipech Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Následné zpracování genotypů a výpočet homozygotních oblastí byl proveden s použitím programu Genotyping Console od firmy Affymetrix (verze 4.1).

Pro upřesnění pozice jednotlivých SNP a homozygotních oblastí pro CMT a hluchotu byl použit UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/> [cit.2009-3-10]) s human genome reference assembly 36.1 a GRCh37.

Hledali jsme homozygotní oblasti u postižených pacientů, které jsou heterozygotní u obou rodičů (pokud byli rodiče také vyšetřeni). Pro další analýzu jsme používali segmenty o velikosti 2Mb a větší.

2.4.2 Sekvenování genu *MARVELD2*

Šest kódujících exonů a sousedících částí intronů genu *MARVELD2* bylo namnoženo pomocí PCR za použití 7 párů primerů (Tabulka 9) navržených pomocí programu ExonPrimer (<http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html> [cit.2010-8-10]). První kódující exon – exon 2 byl namnožen ve dvou fragmentech, za použití dvojic primerů 2aF-2bR a 2cF a 2cR.

Tabulka 9– Přehled primerů pro sekvenování genu *MARVELD2*.

primer	Sekvence 5' - 3'
MARV - 2aF	TCAGCATCATTGAGAGGATAAG
MARV - 2aR	ACCCTCCGTAGGGATCTTTG
MARV - 2bF	ATCTCCGATGGAGTGGAGTG
MARV - 2bR	CATGGACATGCCAAGAACC
MARV - 2cF	ATTGGGCAGTATGTATGGGG
MARV - 2cR	GACTTTTGAATCTCAGACCATTG
MARV - 3F	TTGGGCTATAAATGCAAATGG
MARV - 3R	CACCACACCTGGCCAATAG
MARV - 4F	CACCCACCTGATCTTCTTC
MARV - 4R	CAAACCTGGAAAATGAAAGGACC
MARV - 5F	GCTGATTTCCCATTCAGCTTC
MARV - 5R	GCCTGGCAACAGAACAAGAC
MARV - 6F	CAGTGTGCTTTGAGATATGATTTG
MARV - 6R	CATCCAGCAGCCATTTTCTC
MARV - 7F	TCATTTCTCTGGGTGACAATG
MARV - 7R	AAATTAGCGGGGTGTGGC

Pro exony 2a-b, 2c, 3 a 6 byl použit k PCR amplifikaci premix – PPP Master Mix (Top Bio, s.r.o., ČR). PCR program – 95°C - 5 minut, 35 cyklů: 95°C- 30 sekund, 63°C- 30 sekund, 72°C- 45 sekund; 72°C- 10 minut, 10°C - ∞.

Pro exony 4, 5, 7 byl k PCR amplifikaci použit premix – Combi PPP Master Mix (Top Bio, s.r.o., ČR). Pro amplifikaci byl použit touch-down program pro PCR: 94°- 4minuty, 10 cyklů: 94° - 20 sekund, 72° (-1°C/cyklus) minuta; 25 cyklů: 94°C – 20 sekund, 60°C – 20 sekund, 72°C – 40 sekund; 72°C – 10 minut, 10°C - ∞.

Čištění namnoženého produktu po PCR bylo provedeno pomocí Exonukleázy I a krevetové alkalické fosfatázy (SAP) –(MBI Fermentas – Litva).

Přečištěný produkt byl sekvenován za použití kitu BigDye Terminator v3.1(ABI, USA), čištění produktu po sekvenační reakci bylo provedeno za použití chemikálií CleanSEQ. Přečištěný produkt byl po rozpuštění ve vodě analyzován na automatickém kapilárním genetickém analyzátoru ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Vyhodnocování sekvencí bylo prováděno s použitím softwaru Mutation Surveyor [verze 3.97] (SoftGenetics, USA) a Sequencing Analysis [verze 5.4](ABI, USA), pro kontrolu byla použita referenční sekvence NM_001038603.1.

2.4.3 Klinická vyšetření hluchoty metodou SSEP

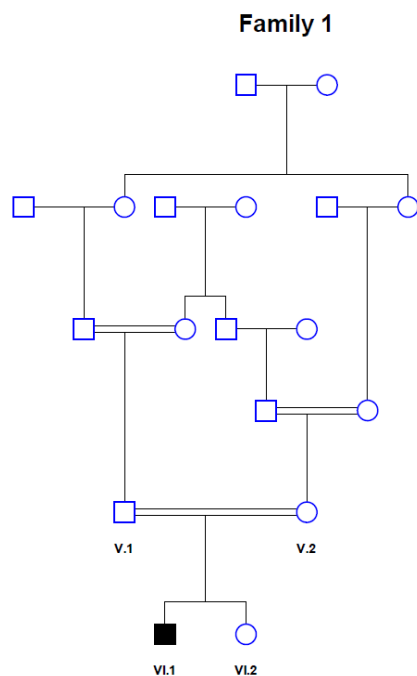
Vyšetření sluchu bylo provedeno jako rutinní klinické vyšetření v rámci zdravotní péče, hrazené ze zdravotního pojištění. Vzhledem k nízkému věku vyšetřovaných pacientů bylo vyšetření ztráty sluchu provedeno pomocí somatosenzorických evokovaných potenciálů (SSEP). Vyšetření bylo provedeno na frekvencích 500, 1000, 2000 a 4000 Herzů a ze zjištěných prahových hodnot pro ztrátu sluchu byly sestaveny pravděpodobné audiogramy.

2.5 Výsledky

2.5.1 Rodina NSHL-1

Molekulárně genetický nále

Homozygotní mapování u romské rodiny se známou konsangvinitou (Obrázek 8) odhalilo u postiženého pacienta VI.1 dvacet homozygotních oblastí o velikosti 2 Mb a větší, které byly heterozygotní u rodičů (Tabulka 10).



Obrázek 8– Rodokmen rodiny NSHL-1 s vyznačenou konsangvinitou

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený (v tomto případě pacient VI.1)

Tabulka 10 – Homozygotní oblasti u neslyšícího pacienta VI.1 z rodiny NSHL-1

Oblast vyznačená šedě obsahuje gen *MARVELD2* popsany u nesyndromové hluchoty DFNB49. Použit build 36.1.

chr.	rozsah oblasti		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band
	začátek	konec	začátek	konec		
1	rs652451	rs9429076	38,876,856	45,592,076	6.72	1p34.3-p34.1
2	rs2289017	rs13426140	26,869,407	29,112,661	2.24	2p23.3-p23.2
2	rs4853154	rs10179514	75,533,715	79,411,561	3.88	2p12
2	rs4851370	rs7600321	100,704,941	102,905,486	2.20	2q11.2-q12.1
2	rs1724188	rs6542088	108,710,277	113,220,301	4.51	2q13
3	rs11917811	rs17610830	7,817,073	10,195,830	2.38	3p26.1-p25.3
5	rs4867268	rs4596408	30,447,267	39,482,816	9.04	5p13.3-p13.1
5	rs325857	rs13354798	41,080,373	45,492,834	4.41	5p13.1-p12
5	rs16879113	rs6897534	49,746,467	54,088,672	4.34	5q11.1-q11.2
5	rs6859219	rs37572	55,474,337	58,869,629	3.40	5q11.2
5	rs6875850	rs16891223	59,244,555	62,220,844	2.98	5q12.1
5	rs10461382	rs6453031	64,218,736	73,223,416	9.00	5q12.3-13.2
6	rs1224715	rs6918047	58,534,951	62,658,788	4.12	6p11.1-q11.1
6	rs9495424	rs12194883	139,672,151	144,071,842	4.40	6q24.1-q24.2
11	rs1508535	rs295585	42,370,100	55,232,246	12.86	11p12-q11
11	rs483182	rs11826261	56,227,770	58,271,739	2.04	11q11-q12.1
11	rs8181503	rs7106929	60,020,879	62,640,257	2.62	11q12.2-q12.3
12	rs12426204	rs704073	85,784,777	88,265,842	2.48	12q21.32-q21.33
16	rs7203694	rs4786314	592,942	2,652,029	2.06	16p13.3
18	rs4302128	rs17773471	53,875,316	56,128,357	2.25	18q21.31-q21.32

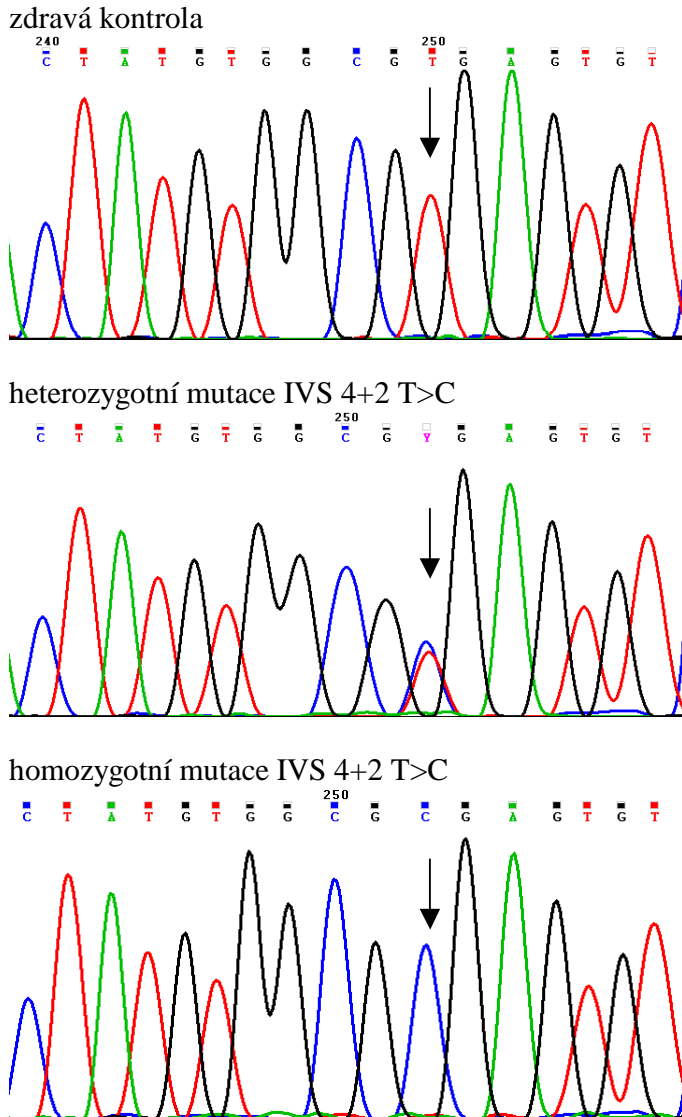
chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

Zjištěné homozygotní oblasti byly porovnány s již známými oblastmi a geny pro nesyndromovou autozomálně recesivní hluchotu (DFNB). Pouze v jedné z největších oblastí na chromozomu 5 (9Mb: 64.218.736-73.223.416) se nacházel již dříve popsany gen spojovaný s nesyndromovou hluchotou a to *MARVELD2*. Sekvenováním všech 6 kódujících exonů a přilehlých intronových částí genu *MARVELD2* byla u pacienta VI.1 nalezena mutace c.1331+2 T>C (IVS 4+2 T>C) v homozygotním stavu. Tato mutace byla nalezena i u rodičů pacienta (V.1, V.2) a sestry (VI.2), ale v heterozygotním stavu (Obrázek 9). Tato mutace byla již dříve popsána jako příčina DFNB49 u pákistánských rodin (Chishti, et al. 2008; Riazuddin, et al. 2006).

Testováním dalších 19 romských hluchých pacientů bez mutací v genu *GJB2*, byla objevena stejná mutace ještě u dalších 2 nepříbuzných rodin.

Testování 40 hluchých pacientů neromského původu bez mutací v genu *GJB2* neodhalilo žádné mutace v genu *MARVELD2*.

Obrázek 9 – Elektroferogram mutace c.1331+2 T>C v genu *MARVELD2*



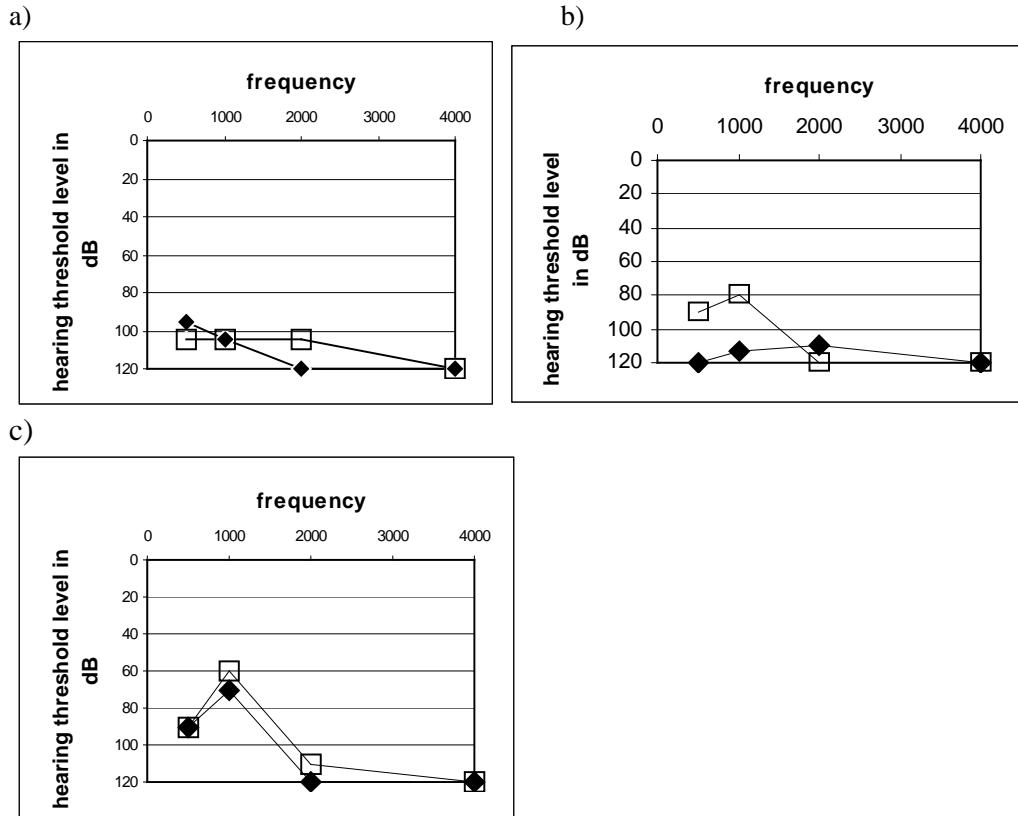
Klinický nález

Klinické vyšetření pacienta VI.1 z rodiny NSHL-1 a dalších 2 pacientek z rodiny 2 ukázalo těžkou a velmi časnou oboustrannou ztrátu sluchu. Pacient VI.1 byl vyšetřen ve věku 4 let a ztráta sluchu byla mezi 95-120dB, obě pacientky z rodiny 2 byly vyšetřeny ve věku 3 let a 14

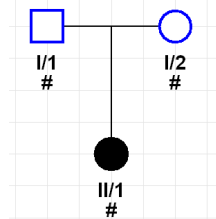
měsíců se ztrátou sluchu 80-110dB (Obrázek 10). Všichni tři postižení pacienti trpí tedy těžkou a časnou ztrátou sluchu.

Obrázek 10 – Odhadovaný audiogram získaný vyšetřením SSEP.

Levé ucho – ♦, pravé ucho -□, a - pacient VI.1 – rodina NSHL-1, b – pacient II.2 and c- pacient II.3 z rodiny 2. Vyšetření bylo provedeno na frekvencích 500, 1000, 2000 a 4000 Hz, sluchové prahy jsou v dB. U všech pacientů byla nalezena těžká ztráta sluchu větší než 80 respektive 60 dB.



2.5.2 Rodina NSHL-2



Obrázek 11 - rodokmen rodiny NSHL-2

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - pacienti vyšetření na čipech Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI arrays

Homozygotní mapování u romské rodiny s jedním postiženým dítětem a zdravými rodiči odhalilo 37 homozygotních oblastí o velikosti 2 Mb a větší (Tabulka 11), které byly homozygotní pouze u postiženého dítěte a byly současně heterozygotní u obou rodičů.

Tabulka 11 – Homozygotní oblasti u neslyšící pacientky z rodiny NSHL-2

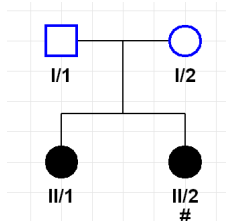
Oblasti, které se překrývaly s geny/oblastmi již popsány u hluchoty jsou vypsány v posledním sloupci. Použit build 36.1.

chr.	rozsah oblasti		pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band	geny/oblasti
	začátek	konec	začátek	konec			
1	rs3117096	rs3120047	40,162,553	43,536,671	3.37	1p34.2	-
2	rs11678276	rs1401220	31,518,612	35,798,198	4.28	2p23.1-p22.3	-
2	rs2359681	rs6733934	207,274,185	211,446,697	4.17	2q33.3-q34	-
2	rs10498039	rs1550425	216,034,013	223,594,312	7.56	2q35-q36.1	-
3	rs7646819	rs12489012	195,206,318	199,318,155	4.11	3q29	-
4	rs1824331	rs9762376	128,985,524	141,267,345	12.28	4q28.1-q31.1	DFNB26
4	rs2083938	rs17027575	146,492,071	152,516,338	6.02	4q31.22-q31.3	DFNB26
4	rs10021604	rs13125269	161,693,853	165,487,799	3.79	4q32.2-q32.3	-
4	rs4691142	rs6552224	166,146,236	168,883,401	2.74	4q32.3	-
4	rs17053871	rs6849068	169,411,644	174,522,954	5.11	4q32.3-q34.1	-
5	rs12655990	rs2161592	45,265,149	50,808,311	5.54	5p12-q11.2	-
5	rs1286371	rs10041443	68,029,954	70,992,267	2.96	5q13.1-q13.2	MARVELD2
5	rs6876182	rs10447291	124,845,919	128,759,480	3.91	5q23.2-q23.3	DFNB60
6	rs1855410	rs1337515	57,527,564	65,221,047	7.69	6p11.2-q12	-
6	rs9490801	rs17053993	123,896,506	127,030,775	3.13	6q22.31-q22.32	-
6	rs6925601	rs1932116	127,767,194	130,562,636	2.80	6q22.33-q23.1	-
6	rs17080705	rs7742306	151,382,147	164,114,282	12.73	6q25.1-q26	DFNB38
6	rs396916	rs16901474	164,385,683	170,716,684	6.33	6q26-q27	DFNB38
7	rs17167507	rs1448657	13,762,749	17,565,794	3.80	7p21.2-21.1	-
7	rs7796939	rs4722120	18,921,508	22,271,325	3.35	7p21.1-p15.3	-
7	rs2049475	rs7783356	70,108,773	73,054,378	2.95	7q11.22-q11.23	-
9	rs4740158	rs11137379	132,315,293	140,147,760	7.83	9q34.11-q34.3	TPRN
10	rs12572139	rs746203	20,841,599	22,870,547	2.03	10p12.31-p12.2	-
10	rs1830204	rs210270	37,304,813	42,320,816	5.02	10p11.21-q11.21	-
11	rs12289376	rs611714	45,333,910	48,426,575	3.09	11p11.2	-
11	rs11228915	rs11230463	56,634,575	60,282,828	3.65	11q12.1-q12.2	-
11	rs566416	rs2714087	118,264,820	122,863,025	4.60	11q23.3-q24.1	TECTA
12	rs1882148	rs11113353	104,155,887	106,419,942	2.26	12q23.3	-
12	rs7310199	rs2062713	107,096,646	113,660,935	6.56	12q23.3-24.21	DFNB50
13	rs7984571	rs2202360	86,983,722	89,051,040	2.07	13q31.2-q31.3	-
14	rs12885067	rs1286291	87,599,344	90,382,733	2.78	14q31.3-q32.11	-
15	rs4983698	rs6576634	19,407,629	21,467,722	2.06	15q11.2	-
15	rs8026608	rs28627578	38,274,294	44,168,214	5.89	15q15.1-q21.1	STRC
15	rs12902857	rs11855644	72,104,924	74,750,010	2.65	15q24.1-q24.3	DFNB48
15	rs9972301	rs7169385	92,152,681	100,192,115	8.04	15q26.2-q26.3	-
16	rs8062961	rs11642741	10,920,235	13,796,291	2.88	16p13.13-p13.12	-
17	rs8067682	rs8068318	54,574,173	56,838,548	2.26	17q22-q23.2	-

chr. – chromozom, Mb – mega base pairs

V rodině bylo provedeno sekvenování všech kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí genu *MARVELD2*, ale bez nálezu kauzální mutace.

2.5.3 Pacientka NSHL-3



Obrázek 12 - rodokmen rodiny NSHL-3

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - pacientka vyšetřená na čipu Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI arrays

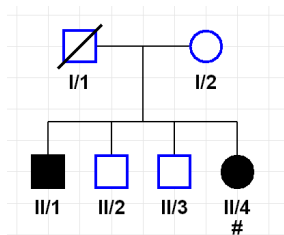
Homozygotní mapování u romské pacientky ukázalo 32 oblastí. V těchto oblastech se nacházela oblast DFNB13 spojovaná s dědičnou hluchotou, ale bez známého genu a dále gen *STRC*, jehož mutace jsou zodpovědné za dědičnou hluchotu DFNB16 (Tabulka 12).

Tabulka 12 – Homozygotní oblasti u neslyšící pacientky NSHL-3

Oblasti, které se překrývaly s geny/oblastmi již popsány u hluchoty jsou vypsány v posledním sloupci. Pro vyhodnocení pozice jednotlivých SNP byl použit build 36.1.

chr.	pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band	geny/oblasti
	začátek	konec			
1	173,909,882	180,438,056	6.53	1q25.1-q25.3	-
2	47,045,872	53,346,636	6.30	2p21-p16.2	-
2	79,169,009	102,685,908	23.52	2p12-q12.1	-
2	193,091,448	195,337,056	2.25	2q32.3	-
2	197,786,195	200,457,612	2.67	2q33.1	-
3	195,734,026	199,318,155	3.58	3q29	-
4	7,560,658	13,469,212	5.91	4p16.1-p15.33	-
4	26,189,170	28,883,558	2.69	4p15.2-p15.1	-
5	42,879,878	45,492,834	2.61	5p12	-
5	89,631,048	94,288,398	4.66	5q14.3-q15	-
5	150,802,483	155,742,492	4.94	5q33.1-q33.3	-
5	160,148,771	168,749,027	8.60	5q34-q35.1	-
5	174,121,495	176,673,602	2.55	5q35.2-q35.3	-
5	178,140,271	180,261,965	2.12	5q35.3	-
6	56,629,710	62,693,246	6.06	6p12.1-q11	-
7	69,726,845	74,896,316	5.17	7q11.22-q11.23	-
7	135,105,764	147,644,191	12.54	7q33-q36.1	DFNB13
8	107,475,585	122,542,232	15.07	8q23.1-q24.13	-
9	118,134,366	121,283,867	3.15	9q33.1	-
10	20,841,599	22,870,547	2.03	10p12.31-p12.2	-
10	37,416,363	41,753,546	4.34	10p11.21-q11	-
10	45,468,756	49,033,015	3.56	10q11.21-q11.22	-
11	1,863,391	12,621,117	10.76	11p15.5-p15.2	-
11	51,420,212	55,977,651	4.56	11p11-q11	-
12	120,166,070	122,609,249	2.44	12q24.31	-
14	63,829,737	66,956,534	3.13	14q23.2-q23.3	-
15	27,703,958	30,740,356	3.04	15q13.1-q13.3	-
15	37,321,696	40,119,660	2.80	15q14-q15.1	-
15	40,214,125	43,672,146	3.46	15q15.1-q21.1	<i>STRC</i>
15	51,527,292	54,128,188	2.60	15q21.3	-
16	31,010	4,300,315	4.27	16p13.3	-
22	44,258,096	46,595,929	2.34	22q13.31	-

2.5.4 Pacientka CMT – 1



Obrázek 13 - rodokmen rodiny CMT – 1

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - pacientka vyšetřená na čipu Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI arrays

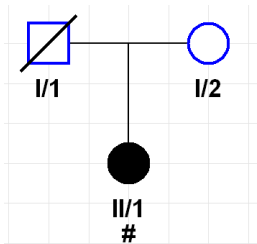
U pacientky s demyelinizačním typem CMT bylo homozygotním mapováním odhaleno 27 oblastí o velikosti 2 Mb a větší. V těchto oblastech se nachází pouze jeden dosud popsáný gen pro AR CMT, a to gen *EGR2* (Tabulka 13).

Tabulka 13 – Homozygotní oblasti u pacientky CMT – 1

Oblasti, které se překrývaly s geny/oblastmi již popsány v dědičné neuropatii jsou vypsány v posledním sloupci. Pro vyhodnocení pozice jednotlivých SNP byl použit build 36.1.

chr.	pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band	geny/oblasti
	začátek	konec			
1	89,222,850	98,556,001	9.33	1p22.2-p21.3	-
1	102,472,053	104,599,997	2.13	1p21.1	-
1	156,772,810	159,862,907	3.09	1q23.1-q23.3	-
1	201,516,635	204,685,498	3.17	1q32.1	-
1	235,942,911	238,162,315	2.22	1q43	-
2	43,092,929	45,106,219	2.01	2p21	-
2	91,328,902	98,271,986	6.94	2p11.2-q11.2	-
2	145,457,997	147,959,334	2.50	2q22.3	-
3	39,332,309	53,158,425	13.83	3p22.1-p21.1	-
3	89,467,256	96,084,107	6.62	3p11.2-q11.2	-
4	36,196,846	38,661,247	2.46	4p14	-
4	48,441,366	52,663,234	4.22	4p12-q12	-
4	90,726,787	95,951,324	5.22	4q22.1-q22.3	-
5	16,915,998	25,719,368	8.80	5p15.1-p14.1	-
6	15,149,922	21,308,261	6.16	6p23-p22.3	-
6	73,322,013	75,959,524	2.64	6q13-q14.1	-
6	127,570,902	129,954,780	2.38	6q22.33	-
7	14,245,599	16,593,540	2.35	7p21.2q21.1	-
8	39,423,310	54,510,156	15.09	8p11.23-q11.23	-
8	118,871,900	121,326,826	2.45	8q24.11-q24.12	-
10	61,064,446	71,043,773	9.98	10q21.1-q21.3	<i>EGR2</i>
10	116,756,326	119,652,082	2.90	10q25.3-q26.11	-
12	42,837,334	44,861,188	2.02	12q12-q13.11	-
14	96,673,702	99,184,191	2.51	14q32.2	-
15	62,832,344	64,877,332	2.04	15q22.31	-
17	10,775,281	13,662,034	2.89	17p13.1-p12	-
20	24,110,977	31,389,139	7.28	20p11.21q11.21	-

2.5.5 Pacientka CMT - 2



Obrázek 14 - rodokmen rodiny CMT – 2

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený, # - pacientka vyšetřená na čipu Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K NspI arrays

U pacientky s demyelinizačním typem CMT bylo nalezeno 25 homozygotních oblastí, ve kterých se nenachází zatím žádná popsaná oblast ani geny spojované s AR CMT (Tabulka 14).

Tabulka 14 – Homozygotní oblasti u pacientky CMT - 2

Oblasti, které se překrývaly s geny/oblastmi již popsanými u hluchoty jsou vypsány v posledním sloupci. Pro vyhodnocení pozice jednotlivých SNP byl použit build 36.1.

chr.	pozice na chromozomu		velikost (Mb)	band	geny/ oblasti
	začátek	konec			
1	100,941,916	114,388,110	13.45	1p21.2-p13.2	-
2	34,755,957	38,850,065	4.09	2p22.3-p22.1	-
3	50,199,229	55,782,111	5.58	3p21.31-p14.3	-
4	48,758,236	53,427,202	4.67	3p11-q12	-
4	137,950,411	140,709,541	2.76	4q28.3-q31.1	-
5	45,394,783	51,346,406	5.95	5p12-q11.2	-
5	112,544,608	115,177,955	2.63	5q22.2-q22.3	-
6	26,453,120	30,339,808	3.89	6p22.1-p21.33	-
6	31,829,012	34,624,566	2.80	6p21.33-p21.31	-
6	147,151,746	155,813,731	8.66	6q24.3-q25.3	-
7	68,179,354	70,850,931	2.67	7q11.22	-
8	34,208,072	37,125,220	2.92	8p12	-
8	140,555,996	146,035,977	5.48	8q24.3	-
9	36,717,652	41,217,099	4.50	9p13.2-p12	distal HMN/ jerash type
9	93,922,891	96,544,328	2.62	9q22.31-q22.32	-
10	37,565,902	41,753,546	4.19	10p11.21q11	-
10	73,849,077	76,068,446	2.22	10q22.1-q22.2	-
11	37,640,308	40,031,169	2.39	11p12	-
11	49,122,246	55,033,178	5.91	11p11.12-q11	-
12	23,023,936	26,337,892	3.31	12p12.1-p11.23	-
14	64,281,211	67,013,123	2.73	14q23.3-q24.1	-
14	95,432,859	98,882,428	3.45	14q32.2	-
15	33,653,376	36,337,109	2.68	15q14	-
16	10,237,778	14,395,803	4.16	16p12.3-p13.12	-
16	64,760,270	71,394,247	6.63	16q21-q22.3	-

2.6 Diskuze

Homozygotní mapování s použitím SNP čipů a následné sekvenování genů, které se nacházejí v homozygotních oblastech, vedlo k nálezu kauzální mutace v genu *MARVELD2* v romské rodině. Jedná se pravděpodobně o první nález mutace v oblasti DFNB49 v romské populaci. Stejná mutace c.1331+2 T>C (IVS 4+2 T>C) v genu *MARVELD2* byla popsána Riazuddinem (Riazuddin, et al. 2006) a Chishti (Chishti, et al. 2008) v šesti pákistánských rodinách. Na základě funkčních studií jako exon-trapping apod. obě výzkumné skupiny potvrdily, že mutace c.1331+2 T>C vede k posunu čtecího rámce a tím k tvorbě zkráceného proteinu. To, že jsme našli stejnou mutaci i u Romů v České republice ukazuje pravděpodobně na velmi starou mutaci, která vznikla u společného předka ještě ve střední Asii, jako to bylo popsáno i v jiných genech (Alvarez, et al. 2005; Piccolo, et al. 1996).

Ztráta sluchu u homozygotů pro tuto mutaci je velmi časná, pravděpodobně vrozená a je těžká (90-110dB). Gen *MARVELD2* kóduje protein ze skupiny tzv. tight-junctions, který se vyskytuje v mnoha epiteliálních tkáních a je důležitý k tvorbě epiteliální bariéry. Je překvapivé, že pacienti s mutacemi v genu *MARVELD2* trpí pouze hluchotou (Chishti, et al. 2008; Riazuddin, et al. 2006).

Stejná sestřihová mutace c.1331+2 T>C byla nalezena u 3 nepříbuzných českých romských rodin. U dalších 17 romských rodin nebyla nalezena patologická mutace v genu *MARVELD2*. Žádná mutace nebyla v tomto genu nalezena u skupiny 40 neslyšících pacientů neromského původu s již dříve vyloučenými mutacemi v *GJB2* genu.

U zbylých 4 pacientů, kteří byli vyšetřeni homozygotním mapováním, se ukázalo několik oblastí, ve kterých se nacházejí geny již popsané u hluchoty a CMT a k ozřejmění příčiny onemocnění těchto pacientů bude potřeba nalezené geny a chromozomální oblasti vyšetřit

sekvenováním, a to kombinací klasického sekvenování Sangerova a nových technologií nové generace (next generation sequencing – NGS).

2.7 Závěr

Výsledky testování ukazují, že mutace v genu *MARVELD2* jsou pravděpodobně významnou a dříve neznámou příčinou nesyndromové hluchoty u českých Romů a dá se předpokládat, že podobné výsledky budou nalezeny i v jiných zemích.

3 Oddíl - Fenotypová exprese nových mutací v genech *GJB1, MPZ a PMP22*.

3.1 Úvod

Charcot-Marie-Tooth je klinicky a geneticky různorodá skupina dědičných onemocnění periferních nervů, charakterizovaná progresivní svalovou slabostí, atrofiemi a ztrátou citlivosti, která postihuje dříve a více dolní končetiny, později i horní končetiny.

Základní dělení je dle rychlostí vedení periferním nervem na typ CMT1 – demyelinizační (rychlost vedení pod 38m/s na n. medianus) a typ CMT2 – axonální (Harding and Thomas 1980).

Nejčastějším typem dědičné neuropatie je CMT1A, která vzniká na podkladě 1.4Mb velké rekurentní a tandemové duplikace na krátkém raménku 17. chromozomu (Lupski, et al. 1991; Raeymaekers, et al. 1991). Tato duplikace obsahuje dávkově senzitivní gen *PMP22*. Delece stejného chromozomálního úseku postihující také gen *PMP22* se projevuje mírným typem neuropatie nazývaným dědičná neuropatie se sklonem k tlakovým obrnám (HNPP-hereditary neuropathy with liability to pressure palsies) (Chance, et al. 1993; de Jong 1947). Nejčastějším projevem HNPP jsou přechodné periferní parézy po kratším tlaku na periferní nervy. Neuropatie CMT1A a HNPP mohou být vzácně způsobeny i bodovými mutacemi v genu *PMP22*.

Druhou nejčastější příčinou CMT jsou mutace v genu *GJB1* (Casasnovas, et al. 2006; Ionasescu 1995; Nelis, et al. 1996; Seeman, et al. 2000a) . Tento typ dědičné neuropatie má vazbu na chromosom X, její projev je tudíž těžší a dřívější u mužů kde jsou rychlosti vedení na horních končetinách mezi 25-40 m/s (Nicholson and Nash 1993). U žen se onemocnění

projeví zpravidla později a méně, stejně tak rychlosti vedení periferním nervem jsou téměř normální (Hahn, et al. 1990; Nicholson and Nash 1993).

Mutace v genu *MPZ* jsou další častou příčinou dědičných neuropatií (Reilly and Shy 2009; Seeman, et al. 2004b; Warner, et al. 1996). U mutací v genu *MPZ* se můžeme setkat se 4 projevy onemocnění: 1) CMT1B – demyelinizační neuropatie, která se velmi podobá nejčastější neuropatii CMT1A (Harding and Thomas 1980); 2) Dejerine-Sottas neuropatie (DSN) – těžký typ neuropatie, bývá opožděný nástup samostatné chůze, je povšechná hypotonie a distální svalová slabost se objevuje již v dětském věku; 3) kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN) – velmi těžká neuropatie, která se projevuje již od narození a bývá spojena se zkrácenou délkou života; 4) později začínající (late onset) CMT2 – axonální neuropatie se sníženými amplitudami CMAP, ale normálními rychlostmi vedení (Seeman, et al. 2004b; Seeman, et al. 2004c; Shy, et al. 2004).

3.2 Cíle

1. Charakterizovat nově nalezené mutace v genech *GJB1*, *MPZ* a *PMP22*.
2. Prokázat segregaci mutací společně s fenotypem.
3. Počítačovou analýzou ověřit či vyloučit jejich patogenní vliv na rozvoj CMT.

3.3 Pacienti

Pacienti byli vyšetřeni v rámci rutinní DNA diagnostiky v naší DNA laboratoři. U všech pacientů byla vyloučena nejčastější příčina CMT – CMT1A duplikace/ HNPP delece pomocí setu 17 mikrosatelitových markerů (Seeman, et al. 2000b). Všichni pacienti podepsali

informovaný souhlas s vyšetřením genů souvisejících s dědičnou neuropatií. V případě nálezu mutace u pacienta, byli dovyšetřeni dostupní členové rodiny, aby se prokázala případná segregace mutace s onemocněním.

3.3.1.1 *GJB1*

Pacienti vybraní pro testování genu *GJB1* splňovali obecná klinická a elektrofyziologická kritéria pro dědičné neuropatie. V rodokmenech nebyl přítomný přenos CMT z otce na syna. Gen *GJB1* se testuje jako druhý v pořadí u demyelinizačního typu neuropatie.

3.3.1.2 *MPZ*

Pro testování genu *MPZ* byli vybráni pacienti, kteří splňují jeden ze 4 možných fenotypů známých u *MPZ* mutací: CMT1B, HMSNIII (DSN), CMT2- late onset nebo CHN.

3.3.1.3 *PMP22*

Pro vyšetření genu *PMP22* byli vybráni pacienti s demyelinizačním typem neuropatie CMT1, dále pacienti s těžkou formou neuropatie Dejerine-Sottas a pacienti s příznaky či podezřením na dědičnou neuropatii se sklonem k tlakovým obrnám (HNPP).

3.4 Metody

3.4.1 Sekvenační analýza genů *GJB1*, *MPZ* a *PMP22*

Kódující oblast genu *GJB1* byla namnožena v jedné PCR reakci za použití jednoho páru primerů. Přímé sekvenování 2. exonu proběhlo ve dvou fragmentech a analýza byla provedena na kapilárním genetickém analyzátoru ABI3130 Genetic Analyzer (ABI, USA). Data byla analyzována za použití programu Sequencing Analysis [verze 3.7] (ABI, USA).

Šest kódujících exonů genu *MPZ* bylo namnoženo ve 4 PCR reakcích. Primery byly navrženy podle publikace Nelis (Nelis, et al. 1994). Přímé sekvenování proběhlo na

kapilárním genetickém analyzátoru ABI3130 Genetic Analyzer (ABI, CA). Data byla analyzována za použití programu Sequencing Analysis [verze 3.7] (ABI, USA).

Čtyři kódující exony genů *PMP22* byly namnoženy za použití 4 párů primerů. Přímé sekvenování proběhlo na kapilárním genetickém analyzátoru ABI3130 Genetic Analyzer (ABI, USA).

Pro kontrolu sekvencí byly použity tyto referenční sekvence: pro *GJB1* - NM_001097642.2
pro *MPZ* –z historických důvodů se používá sekvence D10537, u které je iniciační kodon o 30 nukleotidů dále a proteinová sekvence je díky tomu o 10 AMK kratší než referenční sekvence NM_000530.6.

pro *PMP22* – NM_000304.2

3.4.2 In-silico analýza nalezených mutací

PANTHER

Pro potvrzení nebo vyloučení patogenity nalezených mutací byl použit program PANTHER (Thomas, et al. 2006) (www.pantherdb.org [cit.2009-1-15]), který na základě porovnání sekvencí evolučně příbuzných proteinů vypočítá hodnotu subPSEC (substitution position-specific evolutionary conservation score) pro zaměněnou aminokyselinu. Hodnoty subPSEC pod –3 svědčí spíše pro patologickou mutaci.

BLAST

Porovnání konzervovanosti sekvencí aminokyselin mezi druhy bylo provedeno pomocí programu BLAST na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [cit.2009-5-20].

MUTATION TASTER

Program Mutation Taster (Schwarz, et al. 2010) (www.mutationtaster.org [cit.2011-2-13]) byl použit pro potvrzení nebo vyloučení patogenity nalezených mutací. Mutation Taster

spojuje informace z různých biomedicínských databází, jako jsou: evoluční konzervovanost, sestřihové změny, ztráta proteinových znaků a změny, které mohou mít vliv na množství mRNA. Výsledky testů jsou vyčísleny pomocí Bayes hodnoty, která udává pravděpodobnost patogenity mutace.

NETGENE2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/> [cit.2011-03-23]) (Brunak, et al. 1991) a EXONSCAN (<http://genes.mit.edu/exonscan/> [cit.2011-03-23])(Fairbrother, et al. 2002; Wang, et al. 2004; Yeo and Burge 2004)

Tyto programy byly použity k testování sestřihových mutací v genu *PMP22*. Na základě změněné sekvence předpokládají, jak se změní rozpoznávací místo pro sestřih a zda zanikne původní místo pro sestřih nebo zda vznikne nové sestřihové místo.

3.4.3 Klinická a elektrofyziologická vyšetření

Klinická vyšetření a genetické konzultace se sdělením výsledků molekulárně genetických analýz u pacientů s nově objevenými mutacemi v CMT asociovaných genech byly prováděny Prof. MUDr. Pavlem Seemanem, Ph.D v ambulanci Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FNM.

Elektrofyziologická vyšetření dospělých pacientů prováděl As. MUDr. Radim Mazanec, Ph.D. na Neurologické klinice dospělých 2.LF UK a FNM. Elektrofyziologická vyšetření dětských pacientů prováděla na Klinice dětské neurologie 2.LF UK a FNM As. MUDr. Jana Haberlová, Ph.D.

3.5 Výsledky

3.5.1 Mutace *GJB1*

Šest nových mutací bylo objeveno v šesti rodinách, jejich přehled je uveden v tabulce (Tabulka 15). Jedná se o mutace typu missense, kdy dochází k záměně jedné aminokyseliny za jinou. Hodnoty obou programů podporují patogenní efekt u pěti z nich: p.Met1Arg, p.Leu9Phe, p.Ser17Tyr, p.Val63Phe, p.Leu212Phe. Žádná z těchto mutací nebyla nalezena u 200 zdravých kontrol.

Tabulka 15 – Šest nových mutací v genu *GJB1*

Ve sloupci rodinná historie je v závorce uveden počet postižených členů v rodině.

Rodina/ Pacient	Pozice nukleotidu	Změna aminokyseliny	Proteinová Doména	Rodinná historie	Charakter Mutace	PANTHER - SubPSEC	Mutation Taster efekt
Z - 11	c.2T>G	p.Met1Arg	N-term	familiární (2)	patogenní	-6.57975	patogenní
J - 21	c.27G>T	p.Leu9Phe	N-term	familiární (5)	patogenní	-4.10977	patogenní
O - 31	c.50C>A	p.Ser17Tyr	N-term	familiární (2)	patogenní	-8.84553	patogenní
P - 41	c.187G>T	p.Val63Phe	EC1	familiární (2)	patogenní	-5.68924	patogenní
A - 51	c.508G>A	p.Val170Ile	EC2	familiární (3)	polymorfismus	-3.19634	polymorfismus
S - 61	c.634C>T	p.Leu212Phe	TM4	de novo (1)	patogenní	-6.71855	patogenní

Rodina Z

V této rodině byla nalezena mutace nahrazující metionin v prvním kodonu. Pacient 11 je ve věku 27 let velmi těžce postižen, má svalové atrofie na horních i dolních končetinách a deformity nohou typu pes cavus. Rychlosti vedení jsou sníženy jak na horních, tak dolních končetinách. Jeho matka, které bylo v době vyšetření 52 let, si nestěžuje na žádné obtíže a hlavním nálezem při klinickém vyšetření jsou snížené reflexy na dolních končetinách, při EMG vyšetření jsou patrné mírně snížené rychlosti vedení periferním nervem.

Rodina J

V této rodině byla mutace Leu9Phe objevena u pěti jejích členů. Oba muži v této rodině jsou těžce postiženi. Pacient 21 byl vyšetřen ve věku 53 let a jsou u něj patrné těžké atrofie

dolních i horních končetin. K chůzi používá hůl. Pacient 22 byl vyšetřen ve věku 41 let a má výrazné svalové atrofie dolních i horních končetin, chybějící reflexy na dolních končetinách a deformitu obou chodidel typu pes cavus. Naopak tři ženy z této rodiny jsou postiženy jen zcela mírně. Obě pacientky 24 a 25 mají v klinickém nálezů patrné pouze snížené až chybějící reflexy na dolních končetinách a známky neuropatie při EMG vyšetření jsou patrné pouze u pacientky 24, její sestra 25 má zatím normální nález. Jejich matka, pacientka 25, má ve věku 47 jen mírné svalové atrofie na horních i dolních končetinách a k chůzi používá hůl.

Rodina O

V této rodině byla mutace Ser17Tyr nalezena u 2 pacientů. U pacientky 31 jsou v klinickém nálezů patrné mírné atrofie na horních i dolních končetinách a chybějící reflexy na dolních končetinách. Mutace p.Ser17Tyr byla nalezena i u pacientčiny dcery- 32, která je zatím ve věku 31 let bez subjektivních obtíží.

Rodina P

U obou pacientů z rodiny P byly nalezeny jen mírné atrofie na horních a dolních končetinách a snížené až chybějící reflexy na dolních končetinách. Pacientka 42 byla vyšetřena ve věku 54 let a subjektivně se cítí zdravá. Její syn, pacient 41 byl vyšetřen ve věku 19 let a výsledky na EMG vyšetření ukazují výrazně snížené rychlosti vedení oproti jeho matce, která je o 35 let starší.

Rodina A

Mutace p.Val170Ile nalezená v této rodině je pravděpodobně polymorfismem. Pacientka 51 má jen mírné obtíže a stejná mutace byla nalezena i u jejího otce, který je zdravý a EMG vyšetření u něho ukázalo zcela normální hodnoty. Programy PANTHER a MutationTaster

klasifikují tuto mutaci také jako polymorfismus. Kodon 170 je navíc variabilní – není silně konzervovaný mezi druhy.

Rodina S

V této rodině vznikla mutace p.Leu212Phe de novo u pacienta 61. Oba jeho rodiče jsou zdraví a mutace nebyla nalezena u jeho matky, od které zdědil svůj jediný X-chromosom. Pacient je ve věku 27 let těžce postižený s těžkými atrofiemi, nestabilní chůzí a deformitami pes cavus.

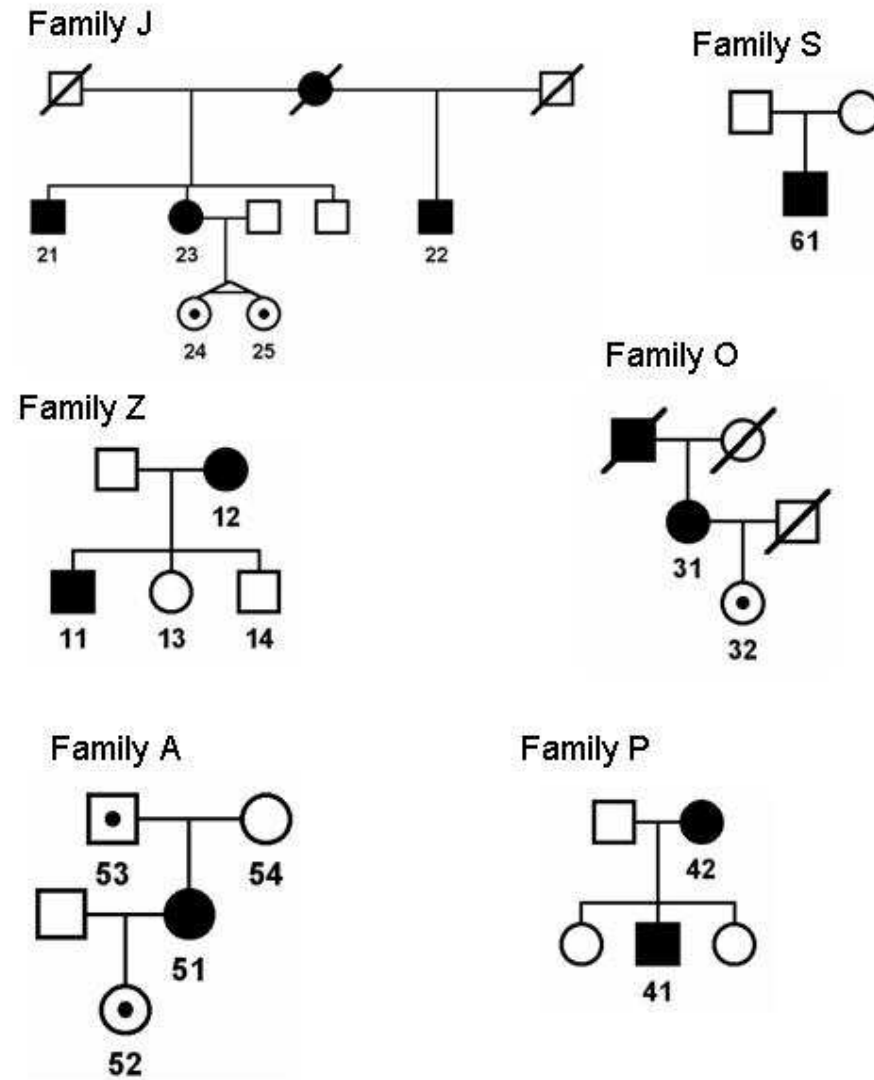
Výsledky elektrofyziologického vyšetření jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 16).

Tabulka 16 – elektrofyziologické nálezy u vyšetřených pacientů s *GJB1* mutacemi

		Horní končetiny							
		n. medianus		n. ulnaris		n. medianus		n. ulnaris	
Rodina/ Pacient	Pohlaví	MNCV	Amplituda	MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda
		> 50 m/s	> 4.2 mV	> 50 m/s	> 5.5 mV	> 48 m/s	> 15 µV	> 48 m/s	> 10 µV
Z - 11	M	nr	-	25 m/s	2.0 mV	36 m/s	2 µV	34 m/s	6 µV
Z - 12	Ž	44 m/s	5.9 mV	44 m/s	5.8 mV	59 m/s	18 µV	37 m/s	11 µV
J - 21	M	nr	-	53 m/s	0.4 mV	nr	-	nr	-
J - 22	M	nr	-	31 m/s	2.2 mV	nr	-	NA	NA
J - 23	Ž	48 m/s	0.4 mV	55 m/s	7.6 mV	43 m/s	10 µV	NA	NA
J - 24	Ž	53 m/s	10.0 mV	48 m/s	10.2 mV	53 m/s	24 µV	NA	NA
J - 25	Ž	54 m/s	7.6 mV	48 m/s	9.4 mV	36 m/s	20 µV	36 m/s	36 µV
P - 41	M	36 m/s	1.5 mV	30 m/s	4.1 mV	NA	NA	nr	-
P - 42	Ž	55 m/s	4.6 mV	44 m/s	7.5 mV	57 m/s	4 µV	NA	NA
S - 61	M	nr	-	30 m/s	0.5 mV	nr	-	nr	-
		Dolní končetiny							
		n. tibialis				n. suralis			
Rodina/ Pacient		MNCV	Amplituda	SNCV	Amplituda				
		> 40 m/s	> 2.5 mV	> 38 m/s	> 8.8 µV				
Z - 11		29 m/s	0.1 mV	nr	-				
Z - 12		31 m/s	1.1 mV	nr	-				
J - 21		nr	-	NA	NA				
J - 22		nr	-	NA	NA				
J - 23		NA	NA	NA	NA				
J - 24		43 m/s	7.6 mV	45 m/s	15 µV				
J - 25		38 m/s	11.1 mV	42 m/s	13 µV				
P - 41		NA	NA	NA	NA				
P - 42		33 m/s	1.1 mV	nr	-				
S - 61		21 m/s	0.1 mV	NA	NA				

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.-, nevybavné, NA –, nevyšetřeno

Hodnoty EMG vyšetření jsou více abnormální u mužů než u žen. Rodokmeny vyšetřených rodin jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Rodokmeny rodin s mutacemi v genu *GJB1*.

Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený pacient, ikona vyplněná černou tečkou – zdravý člen rodiny nesoucí mutaci, přeškrtnutá ikona – zemřelý, čísla u osob značí, že byly testovány na přítomnost mutace.

3.5.2 Mutace *MPZ*

Při vyšetření genu *MPZ* bylo nalezeno 11 nových mutací, které jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 17). Osm mutací považujeme za patogenní, protože segregují s onemocněním v rodině, případně vznikly de novo. Dvě mutace p.Gly213Arg a p.Asp246Asn považujeme za polymorfismy nebo případně recesivní mutace, protože byly nalezeny i u zcela zdravých členů rodiny (Obrázek 16). Navíc byla nalezena v prvním exonu mutace p.Ala15Ala, která nezpůsobuje záměnu aminokyseliny. Žádná z uvedených mutací nebyla nalezena při vyšetření 94 nepříbuzných kontrolních DNA.

Tabulka 17 – Nové patogenní a nepatogenní mutace v genu *MPZ*

Ve sloupci rodinná historie je v závorce uveden počet postižených členů v rodině. Programem PANTHER lze hodnotit pouze mutace, u kterých dojde k záměně aminokyseliny.

Pozice Nukleotidu	Změna Aminokyseliny	Proteinová Doména	Rodina	Rodinná historie	Charakter Mutace	PANTHER - SubPSEC
c.136 G>A	p.Val46Met	EC (Ig-like)	1.	familiární (2)	nejasná	-4.27719
c.143T>A	p.Leu48Gln	EC (Ig-like)	2.	familiární (3)	patogenní	-7.24343
c.143T>A	p.Leu48Gln	EC (Ig-like)	3.	familiární (7)	patogenní	-7.24343
c.194C>A	p.Thr65Asn	EC (Ig-like)	4.	de novo (1)	patogenní	-2.34049
c.289_292delGAGC	p.Glu97fs	EC (Ig-like)	5.	familiární (4)	patogenní	
c.307G>T	p.Gly103Trp	EC (Ig-like)	6.	de novo (2)	patogenní	-8.33821
c.394C>A	p.Pro132Thr	EC (Ig-like)	7.	de novo (1)	patogenní	-6.21197
c.428C>G	p.Thr143Arg	EC (Ig-like)	8.	familiární (3)	patogenní	-1.99378
c.437T>G	p.Val146Gly	EC	9.	familiární (2)	patogenní	-5.32747
c.645+1G>T		IC	10.	de novo (1)	patogenní	
c.637G>C	p.Gly213Arg	IC	11.	familiární (3)	nepatogenní	-2.8563
c.736G>A	p.Asp246Asn	IC	12.	familiární (2)	nepatogenní	-3.0027
c.45 T>G	p.Ala15Ala	signal peptid	12.	familiární (4)	nepatogenní	

U mutace p.Val46Met nemohla být její patogenita jednoznačně rozhodnuta. Může se jednat o méně častou variantu, která způsobuje pozdě vznikající (late onset) mírnou formu neuropatie nebo může jít o vzácný nepatogenní polymorfismus. Postižená pacientka trpěla pouze senzitivní neuropatií bez svalové slabosti, což jsou obtíže spíše netypické pro poruchu *MPZ* genu.

Klinické nálezy pacientů s mutacemi v genu *MPZ* jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 18).

Tabulka 18 – Klinické nálezy u pacientů s kauzálními mutacemi v genu *MPZ*.

Rodina/ Pacient	Pohlaví	Vznik obtíží (roky)	Věk při vyšetření (roky)	Deformity nohou	DK reflexy	DK atrofie	HK atrofie	Schopnost chůze	Fenotyp
1/1	Ž	49	51	ne	chybí	ne	ne	normální	sensitivní neuropatie
2/1	M	2.dekáda	60	pes cavus	chybí	těžké	těžké	hůlka	CMT1B
2/2	Ž	n.d.	35	lehký pes cavus	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
2/3	Ž	n.d.	38	pes cavus	chybí	střední	ne	normální	CMT1B
3/1	Ž	2.dekáda	54	ne	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
3/2	M	2.dekáda	29	pes cavus	chybí	střední	ne	normální	CMT1B
3/3	Ž	24	28	ne	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
3/4	Ž	asympt.	29	pes cavus	chybí	střední	ne	normální	CMT1B
3/5	Ž	2.dekáda	34	pes cavus	chybí	střední	ne	normální	CMT1B
3/6	M	asympt.	5	pes planovalgus	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
3/7	M	asympt.	3	ne	normální	ne	ne	normální	CMT1B
4	M	dětství	15	pes cavus	chybí	střední	ne	nestabilní	HSMN III
5/1	Ž	2.dekáda	33	vysoko klenutá noha	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
5/2	M	2.dekáda	68	pes equinus	chybí	střední	střední	nestabilní	CMT1B
5/3	M	asympt.	43	vysoko klenutá noha	snížené	ne	ne	normální	CMT1B
5/4	Ž	asympt.	9	ne	snížené	ne	ne	normální	CMT1B
6/1	M	dětství	20	pes cavus	chybí	těžké	ne	nestabilní	HSMN III
6/2	Ž	dětství	51	pes cavus	chybí	střední	ne	hůlka	HSMN III
7	Ž	dětství	2	pes planovalgus	chybí	ne	ne	nestabilní	HSMN III
8/1	M	asympt.	30	ne	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
8/2	Ž	asympt.	37	ne	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
8/3	M	asympt.	62	ne	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
9/1	Ž	40	66	vysoko klenutá noha	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
9/2	M	asympt.	34	vysoko klenutá noha	chybí	ne	ne	normální	CMT1B
10	M	12	22	pes cavus	n.d.	střední	ne	normální	CMT1B

DK, dolní končetiny, HK horní končetiny, asympt. – asymptomatický, n.d. – chybí informace

Tři mutace – p.Thr65Asn, p.Gly103Trp a p.Pro132Thr – způsobují těžký fenotyp HSMNIII, který se projevuje již v dětství. Pacienti začali chodit samostatně až po 18.měsíci života a mají problémy s chůzí i v dospělosti. U všech pacientů s HSMN III kromě nejmladšího

(pacient 7, 2 roky) byla přítomna skolióza. Rychlosti vedení vzruchu periferním nervem byly extrémně sníženy u všech pacientů s HMSN III (Tabulka 19).

Pět mutací – p.Leu48Gln, p.Glu97fs, p.Thr143Arg, p.Val146Gly a c.645+1 G>T – bylo nalezeno u pacientů s neuropatií CMT1B. Projev onemocnění u těchto pacientů je velmi mírný a podobný v postižených rodinách. První symptomy vznikají nejčastěji začátkem 2. dekády, rychlosti vedení vzruchu periferním nervem jsou však výrazně sníženy, ale stále jsou vyšší než 30 m/s (Tabulka 19). V rodinách 8 a 9 je klinický projev neuropatie tak mírný, že u nich bylo onemocnění CMT diagnostikováno náhodně, jen v rámci jiných obtíží a následnému EMG vyšetření, které podstoupili. V těchto většinou pouze chybí šlachokosticové reflexy a na elektrofyziologickém vyšetření je přítomna demyelinizační neuropatie (CMT1B).

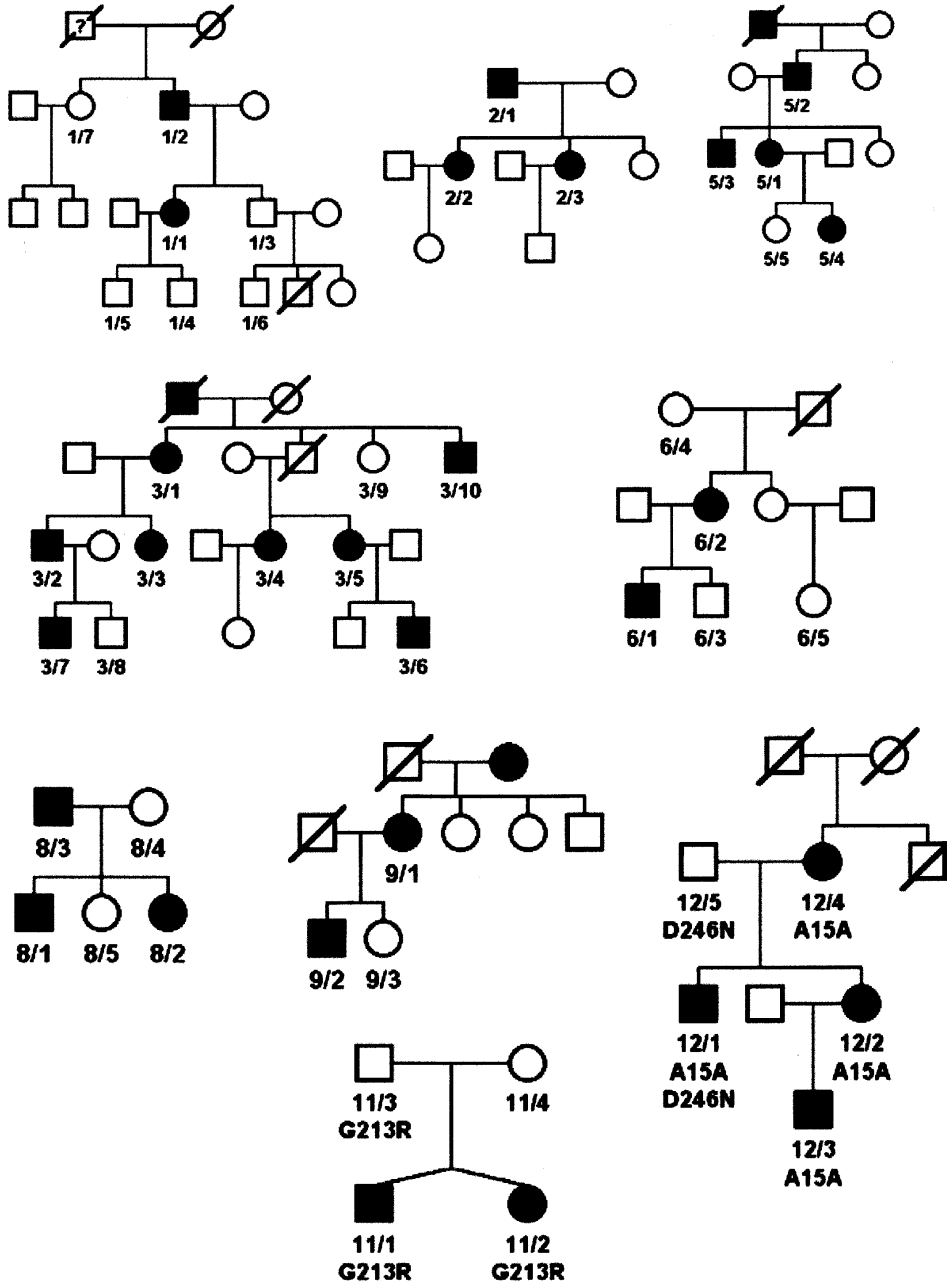
Vyšetření programem PANTER potvrdilo hodnotou menší než -3 u 5 nových mutací a tím i jejich patologický charakter.

Tabulka 19 – elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi v genu *MPZ*.

Rodina/ Pacient	Motorické nervy						Senzitivní nervy					
	n. medianus		n. ulnaris		n. tibialis		n. medianus		n. ulnaris		n. suralis	
	MNCV (m/s)	Ampl. (mV)	MCNV (m/s)	Ampl. (mV)	MNCV (m/s)	Ampl. (mV)	SNCV (m/s)	Ampl. (μ V)	SNCV (m/s)	Ampl. (μ V)	SNCV (m/s)	Ampl. (μ V)
norma	> 50	> 4.2	> 50	> 5.5	> 40	> 2.5	> 48	> 15	> 48	> 10	> 38	> 8.8
1/1	48	7.6	53	12.7	37	1.4	38	21	43	18	46	7
2/1	35.2	6.9	36.7	6.4	26	3.5	34.4	6.3	43.8	5.8	nr	-
2/2	31.9	8.9	35.6	5.5	26.6	5.6	40	32.9	42.5	12.5	31	4.7
2/3	32.5	11.6	37.8	6.1	26.6	8.2	42.1	20.6	33.7	2.9	29.5	9.6
3/1	31.1	5.1	36.9	7.5	27.9	2.2	38.5	15	34.7	8	NA	NA
3/2	35.9	6.6	32.8	4.9	22.2	3.7	38.4	26	35.7	11.3	27	10.5
3/3	33.8	8	38	9.6	23.8	3.3	36.5	36.1	NA	NA	NA	NA
3/4	31.7	11.4	41.4	8.2	21.5	0.4	32.2	14.2	32.9	10.9	31.1	11.8
3/5	29.9	6.9	31.1	8.2	18.7	2.1	31.5	28.4	30.7	18	nr	-
3/6	35.6	5.2	35.1	3.8	29.3	4.2	31.7	19	29.2	11	40	15
4	4 -12	1.8	6 - 11	1.7	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-
5/1	35	5.8	NA	NA	NA	NA	35	19.4	32	15.9	nr	-
5/2	31	4.5	37	6.3	23	1.7	nr	-	33	10.1	nr	-
5/3	37.3	9.3	44	4.5	29.5	4.7	41.6	4.5	36.5	5.4	36.8	13.2
5/4	42.1	1.4	42.3	2.3	38.8	0.8	45.2	67	44.8	14	37	20
6/1	17.6	2	28.3	7.5	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-
6/2	22	5.8	27	3.3	6	0.1	nr	-	nr	-	nr	-
7	nr	-	3		nr	-	nr	-	nr	-	nr	-
8/1	43.4	7.4	44.4	9.2	32.4	6.6	34.9	7.7	36.8	8.5	33.7	16.4
8/2	37	10.3	41	8.4	29	5	31	17.7	32	23.7	27	7.7
8/3	33	4.4	37	5.4	24	3	31	14.7	16	9.3	nr	-
9/1	n.d.	n.d.	45	7.7	31.8	0.9	n.d.	n.d.	37.8	7.1	29.8	0.7
9/2	35.4	9.5	43.9	7.7	29.5	2.6	42.5	4.3	41.9	1.6	nr	-
10	32.6	8.4	n.d.	n.d.	22.7	1.3	31	2.58	n.d.	n.d.	nr	-
11/1	50	5.2	64	1.2	34	0,04	52	21.3	44	14.9	nr	-
11/2	50	6.5	49	5.9	37	4.1	48	59	42	55.7	41	13.7
11/3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	49	16.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48	17.9

MNCV – (motor nerve conduction velocity) – rychlost vedení motorickými vlákny, SNCV – (sensory nerve conduction velocity) – rychlost vedení senzitivními vlákny, n.r.- nevybavné, n.d. –nevyšetřeno

Obrázek 16 – Rodokmeny rodin s mutacemi v genu *MPZ*



Kruh – žena, čtverec – muž, černý vyplněný symbol – postižený pacient, přeškrtnutá ikona – zemřelý pacient, čísla u pacientů značí, že pacienti byli testováni na přítomnost mutace. V rodinách 11 a 12, kde mutace nesegregují s onemocněním v rodině, jsou genotypy vyznačené u vyšetřených osob.

3.5.3 Mutace *PMP22*

Souhrn čtyř nových mutací v genu *PMP22* je uveden v tabulce (Tabulka 20). Tři mutace byly nalezeny v pěti rodinách s fenotypem HNPP. Jedna de-novo mutace způsobuje Dejerine-Sottas neuropatii.

Tabulka 20 – souhrn čtyř nových mutací v genu *PMP22*

Pacient	Pozice Nukleotidu	Mutace	Pozice	Fenotyp
1	c.235 T>A	p.Ser79Thr	exon 3	DSN
2	c.78+5 G>A	IVS 1+5 G>A / 5' splice site	intron 1	HNPP
3	c.78+5 G>A	IVS 1+5 G>A / 5' splice site	intron 1	HNPP
4	c.320-1 G>C	IVS 4-1 G>C / 3' splice site	intron 4	HNPP
5	c.320-1 G>C	IVS 4-1 G>C / 3' splice site	intron 4	HNPP
6	c.419 G>A	p.Trp140X	exon 4	HNPP

Pacient 1, u kterého byla nalezena mutace p.Ser79Thr pocházel z in-vitro fertilizace, kde těhotenství a porod proběhly bez komplikací. Pacient začal chodit samostatně až od 25 měsíců věku. Vyšetření ve věku 3 let ukázalo u pacienta povšechnou hypotonii, chybějící reflexy, nejistou chůzi a deformity chodidel typu planovalgus. Rychlosti vedení periferním nervem byly extrémně snižené na 3 m/s na horních končetinách (Tabulka 21). Dvojče pacienta (bratr) je zdravé a mutace u něj nebyla nalezena, ani u rodičů a jedná se tak o mutaci de-novo.

Sestřihová mutace c.78+5 G>A byla nalezena u rodin 2 a 3. U pacienta 2, se jako první projev onemocnění objevila ve 14 letech periferní paréza peroneálního nervu. Pacientova matka (2a) a teta trpí opakovanými slabostmi horních končetin se sníženou citlivostí po námaze. U pacientovy sestry (2b) byla při elektrofyziologickém vyšetření již patrná demyelinizační neuropatie, ale klinicky si ve věku 19 let nestěžuje na žádné problémy.

Pacient 3 byl vyšetřen ve věku 51 let. V 18-ti letech si stěžoval na slabost pravého zápěstí. Od té doby trpěl několika epizodami přechodné slabosti horních končetin. Jeho dcery (3a-20

let, 3b-22 let) mají známky neuropatie pouze na EMG vyšetření, anamnesticky si nestěžují na žádné projevy slabosti nebo snížené citlivosti.

Další sestřihová mutace c.320-1 G>C byla nalezena v rodinách 4 a 5. Pacientka 4 měla ve věku 54 let jednu ataku přechodné periferní neuropatie s parestézií obou zápěstí. Její dcera (4a) má známky HNPP pouze na EMG vyšetření, jinak si ve věku 28 let nestěžuje na žádné hypostézie ani slabost.

Pacient 5 měl přechodnou slabost a sníženou citlivost horních končetin ve věku 18 let. Jeho dcera (5a) si ve věku 24 let stěžuje na parestézie horních končetin po námaze. U jeho syna (5b) proběhla ve věku 13 let oboustranná peroneální paréza. Dnes, ve věku 26 let uvádí parestézie horních a dolních končetin po delším útlaku rizikových míst.

U pacientky 6, která trpí již od dětství opakovanými periferními parézami byla nalezena mutace p.Trp140X. Rodiče jsou zdraví, ale nebylo je možné vyšetřit.

Tabulka 21 – elektrofyziologické nálezy u pacientů s mutacemi PMP22

Rodina/ Pacient	Fenotyp	Věk při vyšetření	n. medianus		n. ulnaris		n. tibialis		n. medianus		n. ulnaris		n. suralis	
			MNCV (m/s)	Ampl. (mV)	MNCV (m/s) pod/ nad loktem	Ampl. (mV)	MNCV (m/s)	Ampl. (mV)	SNCV (m/s)	Ampl. (μV)	SNCV (m/s)	Ampl. (μV)	SNCV (m/s)	Ampl. (μV)
	norma		> 50	> 4.2	> 50	> 5.5	> 40	> 2.5	> 48	> 15	> 48	> 10	> 38	> 8.8
1	DSN	2.5	2	0.3	3	0.1	NA	-	NR	-	NR	-	NA	-
2	HNPP	15	NA	-	NA	-	40	15	NA	-	NA	-	42	5
2a	HNPP	48	NA	-	NA	-	36	2	NA	-	NA	-	32	7
2b	HNPP	20	NA	-	NA	-	40	7	NA	-	NA	-	34	23
3	HNPP	51	47	8	53/29	8/7	33	5	30	6	35	13	NR	-
3a	HNPP	24	42	14	50/35	8/7	41	9	39	10	32	9	34	4
3b	HNPP	22	46	12	48/26	10/9	35	11	37	25	31	12	29	10
4	HNPP	54	41	3	56/30	8/8	37	5	20	2	30	12	42	10
4a	HNPP	27	46	11	53/32	11/10	NA	-	25	7	23	4	43	18
5	HNPP	50	48	12	58/39	1.5/1.5	NA	-	-	-	-	-	36	6.1
5a	HNPP	24	56	11	55/44	8/7	NA	-	30	9	37	21	35	16
6	HNPP	39	44	4	40/31	6/6	28	1	28	4	28	7	32	8

Výsledky elektrofyziologických vyšetření u pacientů s HNPP ukazují primárně demyelinizační motoricko-senzitivní neuropatii s více postiženými senzitivními nervy na horních končetinách a známkami zpomalení vedení přes oblasti komprese (MNCV n.ulnaris)

In silico analýza nalezených mutací podporuje jejich patogenní charakter. Vyšetření mutace p.Ser79Thr odhalilo velkou pravděpodobnost ($p=0.989$), že je patogenní a způsobuje onemocnění, pro mutace p.Trp140X je velká pravděpodobnost (0.999), že způsobuje zkrácení proteinu PMP22 o 21 aminokyselin. Patogenita obou mutací byla testována programem Mutation Taster (Schwarz, et al. 2010). Pro vyšetření sestřihových mutací c.78+5G>A a c.320-1 G>C byly použity programy NetGene (Brunak, et al. 1991) a ExonScan (Fairbrother, et al. 2002; Wang, et al. 2004; Yeo and Burge 2004). Porovnáním obou nových mutací s referenční sekvencí se ukázalo, že v mutované sekvenci dojde ke zrušení donorového (intron 1-c.78+5G>A) resp. akceptorového (intron 4- c.320-1 G>C) místa pro sestřih, které jsou v referenční sekvenci velice dobře rozpoznány.

3.6 Diskuze

3.6.1 Mutace *GJB1*

Mutace p.Met1Arg, která mění aminokyselinu na 1. pozici v proteinu je první popsanou mutací postihující iniciační (start) kodon v genu *GJB1*. Zatím byly v genu *GJB1* popsány jen delece celého genu (Ainsworth, et al. 1998; Hahn, et al. 1999; Lin, et al. 1999; Takashima, et al. 2003). Je pravděpodobné, že u mutace p.Met1Arg povede náhrada prvního kodonu k alternativnímu začátku translace na dalším tripletu ATG, který se nachází o 34 kodonů dále a tím k tvorbě kratšího proteinu.

Pro mutace p.Val63Phe, která se nachází v 1. extracelulární doméně, již byla na stejné pozici popsána jiná aminokyselinová záměna – Val63Ile (Bone, et al. 1997; Casasnovas, et al. 2006; Fairweather, et al. 1994; Matsuyama, et al. 2001; Takashima, et al. 2003).

De novo mutace v genu *GJB1* jsou velmi vzácné (Di Iorio, et al. 2000; Meggouh, et al. 1998). Nová mutace p.Leu212Phe byla nalezena pouze u pacienta, jeho matka i otec jsou zdraví, mutace u nich nebyla nalezena. I když u této de novo mutace není možné prokázat segregaci s onemocněním v rodině, mutace se nachází v mezidruhově konzervované části proteinu a analýza programu PANTHER potvrzuje patogenní efekt mutace.

Zajímavým nálezem je nová mutace p.Val170Ile u ženy s mírnými projevy CMT. Jedná se pravděpodobně o nepatogenní polymorfismus, protože stejná mutace byla nalezena i u otce pacientky, který je podle neurologického a elektrofyziologického vyšetření zdravý. Mutace nebyla nalezena u matky pacientky. Valin a Isoleucin jsou podobné aminokyseliny ze stejné skupiny a navíc pozice Valin170 není silně konzervovaná mezidruhově (Obrázek 17). Hodnota SubPSEC je -3.19634 , což je velmi blízko hranici -3 pro nepatogenní polymorfismus a je mnohem vyšší než u dalších 5 mutací. Mutace p.Val170Ile je první mutací v kódující části genu *GJB1*, která je pouhým polymorfismem a nezpůsobuje onemocnění CMT, na rozdíl od všech zatím popsáných mutací v genu *GJB1* (Reilly, et al. 2011)(www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/ [cit.2011-05-10]).

U pacientky s mutací p.Ser17Tyr se objevily první symptomy onemocnění v druhé dekádě. Dcera pacientky je zatím bez příznaků hlavně díky jejímu nízkému věku. Tuto mutaci i přesto považujeme za patogenní hlavně díky výsledkům programu PANTHER .

Obrázek 17 – mezidruhová konzervovanost pro mutaci p.Val170Ile v genu *GJB1*

Pozice 170 je mezidruhově nepříliš konzervovaná, což svědčí pro zařazení mutace p.Val170Ile jako polymorfismu.

	170
Homo sapiens/NP_001091111.1	YVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMLAASGI
Pan troglodytes/XP_001146273.1	YVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMLAASGI
Canis lupus familiaris/XP_857573.1	YVFYLLYPGYAMVRLVKCEAYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMLAASGI
Bos taurus/NP_776494.1	YVFYLLYPGYAMVRLVKCDAYPCPNTVDCFVSRPTEKTIFTVFMLAASGI
Mus musculus/NP_032150.2	YVFYLLYPGYAMVRLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMLAASGI
Rattus norvegicus/NP_058947.1	YVFYLLYPGYAMVRLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTVFMLAASGI
Gallus gallus/NP_989702.1	YLFYMIYPGYQMVRLVKCEAYPCPNTVDCFVSRPTEKTIFTVFMLVTSV
Danio rerio/NP_571886.1	YLFYMIYPGYKMFRLVKCDSTPCPNIIVDCFVSRPTEKTVFTIFMLAVSGV

3.6.2 Mutace *MPZ*

Klinické, genealogické a in silico vyšetření mutací ukázalo, že 8 z 11 nových mutací v genu *MPZ* můžeme považovat za patogenní a dvě budou nepatogenní, protože neselegují s onemocněním v rodině. U jedné mutace zůstává otázka ohledně patogenity nedořešená.

U pěti námi nově popsanych mutací byly již dříve popsány patogenní mutace, které postihují stejný kodon: p.Leu48Pro – s variabilním fenotypem, p.Pro132Leu – CMT1B, p.Thr143Met – nejsou uvedena klinická data, p.Val146Phe – DSN (Fabrizi, et al. 2001; Haites, et al. 1998; Ohnishi, et al. 2000; Sorour and Upadhyaya 1998; Szabo, et al. 2005). Na pozici 103 je fenotyp podobný jako u naší záměny. V pozicích 132 a 146 se fenotyp u našeho pacienta od již popsaného liší.

U pacienta 10 byla nalezena mutace sestřihového místa na 5'konci c.645+1G>T. Předpokládáme, že intronová mutace může poškodit protein přeskočením exonu 5 s posunem čtecího rámce nebo retencí intronu 5. Sabet (Sabet, et al. 2006) provedl analýzu mRNA z dermálních nervů u mutace c.584+2T>G na 5'konci v genu *MPZ* a prokázal vynechání exonu 4. Podobné vyšetření jsme nemohli zopakovat, protože rodina odmítla dát souhlas s dalším invazivním vyšetřením.

V rodině 11 s axonálním typem CMT a v rodině 12 s demyelinizačním typem CMT byly nalezeny mutace p.Gly213Arg a p.Asp246Asn. Tyto mutace jsou pravděpodobně nepatogenní a nejsou kauzální pro CMT v těchto rodinách, protože neselegují s onemocněním v rodině (Obrázek 16). Mutace p.Gly213Arg byla nalezena u klinicky a elektrofyziologicky zdravého otce ve věku 50 let a vznik axonální CMT u dětí byl kolem 6 let věku. Navíc u časně se projevujících mutací v genu MPZ ještě nebyla popsána CMT2 (axonální) neuropatie. Mutace p.Asp246Asn byla nalezena u pacientova zdravého otce a nebyla nalezena u další tři příbuzných, také postižených onemocněním CMT. Náš závěr ohledně nepatogenních polymorfismů byl podpořen také výsledkem programu PANTHER a porovnáním konzervovaností aminokyselin mezi druhy (Obrázek 18). Tyto varianty nebyly nalezeny mezi 94 DNA kontrolami a jedná se pravděpodobně o velmi vzácné polymorfismy nebo případně recesivní mutace.

Mezi nepatogenní polymorfismy byly programem PANTHER zařazeny i mutace u rodin 4 a 8. Přesto si myslíme, že se jedná o kauzální a patogenní mutace. Mutace p.Thr65Asn vznikla de novo na velmi konzervované aminokyselinové pozici a pacient je výrazně a časně postižen Dejerine-Sottas neuropatií s extrémně sníženými rychlostmi vedení na horních končetinách (4-12 m/s) a nevýbavnými hodnotami pro dolní končetiny. Rodiče jsou zdraví a nenesou mutaci. Aminokyselinová pozice pro druhou mutaci p.Thr143Arg je vyhodnocena programem PANTHER těsně na hranici polymorfismu a není ani výrazně mezidruhově konzervovaná. Přesto ji považujeme za patogenní, protože segreguje s onemocněním v rodině a již dříve byla popsána patogenní mutace postihující stejný kodon (Haiteš, et al. 1998).

Otázka ohledně patogenity mutace p.Val46Met zůstává nezodpovězena. Mutace byla nalezena u pacientky, která trpí poruchou citlivosti od 49 let a později i poruchou chůze, ale nemá žádnou svalovou slabost. Na rozdíl od později vznikající (late onset) neuropatie CMT2 v důsledku mutace v genu *MPZ* ukazují výsledky elektrofyziologického vyšetření u pacientky primárně demyelinizační typ s lehkou sekundární axonopatií a pouze na dolních končetinách. Otec pacientky trpěl údajně podobnými problémy od 50 let, bohužel jsme neměli možnost ho vyšetřit. Ostatních 5 členů této rodiny nemá mutaci a jsou zdraví. Tento fenotyp není typický pro mutace v *MPZ* genu a příčinu pouze senzitivní neuropatie u pacientky bude potřeba dále dovyšetřit. Mutace p.Val46Met mohla být zachycena náhodně jako pouhý nepatogenní polymorfismus. Pro konečnou interpretaci této nové mutace bude potřeba vyšetřit větší rodinu, kde segregací mutace s fenotypem bude moci být kauzalita potvrzena nebo naopak vyloučena.

Shy (Shy, et al. 2004) ve své publikaci naznačil, že většinu pacientů s *MPZ* mutacemi lze rozdělit pouze do dvou skupin – časně a pozdně začínající, pouze u minima pacientů můžeme vidět klasický CMT fenotyp. Mezi pacienty, které jsme vyšetřovali my, je však velký podíl pacientů, kteří mají CMT1B fenotyp. U těchto pacientů je jen minimální až subklinický nález jako chybějící reflexy a snížené rychlosti vedení periferním nervem. Velké množství námi zachycených pacientů s CMT1B může být vysvětlitelné např. díky DNA vyšetření u pacientů s minimálním nálezem.

Obrázek 18 - mezidruhová konzervovanost pozic jednotlivých nových mutací v genu *MPZ*

pozice jednotlivých mutací je zvýrazněná obdélníkem a číslem aminokyseliny

	46	48	
MYP0_MOUSE	M	A	60
MYP0_RAT	M	A	60
MYP0_HUMAN	M	A	60
MYP0_HORSE	M	A	60
Q5JZM5_PIG	-----	-----	-----
MYP0_BOVIN	-----	I	31
MYP0_CHICK	M	A	60
A0JM41_XENTR	M	A	57
A2VD98_XENLA	M	A	59
B0S5Q7_DANRE	-----	I	52
	65	103	
MYP0_MOUSE	D	I	120
MYP0_RAT	D	I	120
MYP0_HUMAN	D	I	120
MYP0_HORSE	D	I	120
Q5JZM5_PIG	-----	P	51
MYP0_BOVIN	D	I	91
MYP0_CHICK	D	I	120
A0JM41_XENTR	D	I	116
A2VD98_XENLA	D	I	118
B0S5Q7_DANRE	E	V	112
	132	143 146	
MYP0_MOUSE	D	L	180
MYP0_RAT	D	L	180
MYP0_HUMAN	D	L	180
MYP0_HORSE	D	L	180
Q5JZM5_PIG	D	L	111
MYP0_BOVIN	D	L	151
MYP0_CHICK	D	L	180
A0JM41_XENTR	D	L	176
A2VD98_XENLA	D	L	178
B0S5Q7_DANRE	D	L	172
	213		
MYP0_MOUSE	Y	R	239
MYP0_RAT	Y	R	239
MYP0_HUMAN	Y	R	239
MYP0_HORSE	Y	R	239
Q5JZM5_PIG	Y	R	169
MYP0_BOVIN	Y	R	210
MYP0_CHICK	F	R	239
A0JM41_XENTR	Y	R	233
A2VD98_XENLA	Y	R	235
B0S5Q7_DANRE	F	R	193
	246		
MYP0_MOUSE	L	K	248
MYP0_RAT	L	K	248
MYP0_HUMAN	L	K	248
MYP0_HORSE	L	K	248
Q5JZM5_PIG	L	--	176
MYP0_BOVIN	L	K	219
MYP0_CHICK	A	K	249
A0JM41_XENTR	G	K	243
A2VD98_XENLA	G	K	245
B0S5Q7_DANRE	K	Q	203

3.6.3 Mutace *PMP22*

Zachytili jsme tři mutace nalezené u celkem pěti rodin, které pravděpodobně povedou ke ztrátě jedné funkční kopie genu *PMP22* a které jsou kauzální pro onemocnění HNPP u těchto pacientů. A jednu mutaci p.Ser79Thr, která vznikla de-novo a způsobuje Dejerine-Sottas neuropatii.

Předpokládáme, že u sestřihových mutací c.78+5 G>A a c.320-1 G>C dojde buď k přeskočení exonu, nevystřížení intronu nebo použitím jiného sestřihového místa k poškození normálního sestřihu proteinu *PMP22*. Nesprávný sestřih povede k nefunkčnímu proteinu.

Obě tyto mutace segregují s onemocněním v rodině, což podporuje jejich kauzalitu.

Dosud byly popsány pouze tři sestřihové mutace, které způsobují HNPP neuropatii. U pacienta s mutací c.78+1 G>T se analýzou mRNA v leukocytech ukázalo, že dochází k vynechání 1. exonu a mutovaná alela je nefunkční (Bort, et al. 1997). Druhá popsaná mutace je c.179-1 G>C, která pravděpodobně vede k vynechání 3. exonu nebo narušuje sestřih použitím skrytého sestřihového místa (Meuleman, et al. 2001). Třetí sestřihová mutace c.179+1 G>C narušuje sestřih částečným nevystřížením 2. intronu a vzniká tak abnormální mRNA (Bellone, et al. 2006).

Stop mutace p.Trp140X byla nalezena pouze u jedné pacientky, ovšem charakter této mutace a in silico analýza přesvědčivě svědčí pro její patogenitu a kauzalitu pro HNPP. Předčasný stop kodon povede ke vzniku zkráceného proteinu a pravděpodobně jeho degradaci.

Již dříve byly popsány dvě různé mutace na pozici p.Ser79 (Bort, et al. 1998; Roa, et al. 1993). Mutace p.Ser79Pro byla nalezena u dívky s opožděnou chůzí a rychlostmi vedení na n. medianus a n. tibialis pod 10 m/s. Mutace p.Ser79Cys byla popsána v rodině s fenotypem CMT1A, kde se první klinické příznaky objevily v 10 letech věku. Tyto nálezy potvrzují

patogenní charakter mutace p.Ser79Thr a ukazují, že kodon 79 je hotspot pro mutace v genu *PMP22*.

Bodové mutace v genu *PMP22* jsou obecně velice vzácné u CMT1 pacientů, ale naše zkušenosti ukazují, že je více pravděpodobně, že budou zachyceny u pacientů s podezřením na HNPP než u pacientů s CMT1 po vyloučení CMT1A duplikace/HNPP delece. Ze skupiny 108 nepříbuzných pacientů vyšetřených pro mutaci v genu *PMP22* v naší laboratoři byla ve skupině 51 pacientů s podezřením na CMT1 nalezena pouze 1 mutace a naopak mezi 57 pacienty s podezřením na HNPP bylo nalezeno 5 mutací. Z tohoto důvodu bude sekvenování genu *PMP22* užitečnější u pacientů s HNPP bez HNPP delece než u CMT1 pacientů bez CMT1A duplikace, kde jsou pravděpodobnějšími příčinami kauzální mutace i v ostatních genech jako *GJB1*, *MPZ* a *SH3TC2*.

3.7 Závěr

3.7.1 Mutace *GJB1*

Popsali jsme šest nových mutací v genu *GJB1* z nichž p.Val170Ile je pravděpodobně nepatogenní polymorfismus. Unikátním je nález mutace p.Met1Arg, kde předpokládáme, že následkem mutace iniciačního kodonu dochází k začátku transkripce až od dalšího tripletu ATG, lokalizovaném o 34 kodonů dále. Fenotyp pacienta se však zásadně neliší od jiných CMTX pacientů. Nález mutace p.Leu212Phe u pacienta s těžkým postižením ukazuje na výskyt mutace de novo, které jsou v tomto genu jen zcela výjimečné.

3.7.2 Mutace *MPZ*

Z nově nalezených 11 mutací v genu *MPZ* můžeme osm klasifikovat jako patogenní a dvě jako nepatogenní polymorfismy. Zajímavý je nález většího počtu pacientů s fenotypem CMT1B, kteří mají jen mírné projevy CMT, může to být způsobeno DNA vyšetřením pacientů s minimálním nálezem.

3.7.3 Mutace *PMP22*

Při testování genu *PMP22* byly zachyceny čtyři nové mutace s fenotypy Dejerine Sottas neuropatie a HNPP. Naše výsledky ukazují, že bodové mutace v genu *PMP22* jsou po vyloučení CMT1A/HNPP více pravděpodobné u pacientů s HNPP než u pacientů s CMT1.

Tyto výsledky byly publikovány v časopisech:

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Šubrt I, Seeman P. Six New Gap Junction Beta 1 Gene Mutations and Their Phenotypic Expression in Czech Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2010 Feb;14(1):3-7.**

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Seeman P. Clinical and in silico evidence for and against pathogenicity of 11 new mutations in the *MPZ* gene. **Clinical Genetics 2010 Jul;78(1):81-7.**

Brožková D, Mazanec R, Rychlý Z, Haberlová J, Böhm J, Staněk J, Plevová P, Lisoňová J, Sabová J, Sakmaryová I, Seeman P. Four novel point mutations in the *PMP22* gene with phenotypes of HNPP and Dejerine-Sottas Neuropathy. **Muscle and Nerve in press.**

Použitá literatura

- Abecasis, G. R., et al.
2002 Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30(1):97-101.
- Abicht, A., et al.
1999 A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology* 53(7):1564-9.
- Ainsworth, P. J., et al.
1998 Genotype/phenotype correlation in affected individuals of a family with a deletion of the entire coding sequence of the connexin 32 gene. *Hum Genet* 103(2):242-4.
- Alvarez, A., et al.
2005 High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A* 137A(3):255-8.
- Bellone, E., et al.
2006 An abnormal mRNA produced by a novel PMP22 splice site mutation associated with HNPP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(4):538-40.
- Bone, L. J., et al.
1997 Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis* 4(3-4):221-30.
- Bort, S., et al.
1997 Mutational analysis of the MPZ, PMP22 and Cx32 genes in patients of Spanish ancestry with Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 99(6):746-54.
- Bort, S., et al.
1998 Dejerine-Sottas neuropathy associated with de novo S79P mutation of the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Hum Mutat Suppl* 1:S95-8.
- Brozkova, D., et al.
2010 Clinical and in silico evidence for and against pathogenicity of 11 new mutations in the MPZ gene. *Clin Genet* 78(1):81-7.
- Brunak, S., J. Engelbrecht, and S. Knudsen
1991 Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* 220(1):49-65.
- Casasnovas, C., et al.
2006 Clinical and molecular analysis of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Spanish population. *Clin Genet* 70(6):516-23.
- Chance, P. F., et al.
1993 DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72(1):143-51.
- Chishti, M. S., et al.
2008 Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J Hum Genet* 53(2):101-5.
- de Jong, JGY
1947 Over families met Hereditaire dispositie tot het optreden

- van Neuritiden, gecorreleerd met Migraine [On families with hereditary disposition of the occurrence of neuritides, correlated with migraine]. *Psychiatrische en Neurologische Bladen* 50:60–76.
- Di Iorio, G., et al.
2000 A new de novo mutation of the connexin-32 gene in a patient with X-linked Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Neurol Sci* 21(2):109-12.
- Fabrizi, G. M., et al.
2001 A somatic and germline mosaic mutation in MPZ/P(0) mimics recessive inheritance of CMT1B. *Neurology* 57(1):101-5.
- Fairbrother, W. G., et al.
2002 Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297(5583):1007-13.
- Fairweather, N., et al.
1994 Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Mol Genet* 3(1):29-34.
- Haberlova, J., R. Mazanec, and P. Seeman
2006 Dědičné periferní neuropatie. *Neurologie pro praxi* 7(3):147-152.
- Hahn, A. F., et al.
1999 Genotype/phenotype correlations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann N Y Acad Sci* 883:366-82.
- Hahn, A. F., et al.
1990 X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain* 113 (Pt 5):1511-25.
- Haites, N. E., E. Nelis, and C. Van Broeckhoven
1998 3rd workshop of the European CMT consortium: 54th ENMC International Workshop on genotype/phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies 28-30 November 1997, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 8(8):591-603.
- Harding, A. E., and P. K. Thomas
1980 The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103(2):259-80.
- Ionasescu, V. V.
1995 Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* 18(3):267-75.
- Irobi, J., et al.
2004 Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 36(6):597-601.
- Kalaydjieva, L., et al.
2000 N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet* 67(1):47-58.
- LeBlanc, S. E., R. M. Ward, and J. Svaren
2007 Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* 27(9):3521-9.
- Lin, C., et al.
1999 Deletion and nonsense mutations of the connexin 32 gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease. *Tohoku J Exp Med* 188(3):239-44.

- Lupski, J. R., et al.
1991 DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66(2):219-32.
- Matsuyama, W., et al.
2001 Phenotypes of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease and altered trafficking of mutant connexin 32 (GJB1). *J Hum Genet* 46(6):307-13.
- Meggouh, F., et al.
1998 The first de novo mutation of the connexin 32 gene associated with X linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J Med Genet* 35(3):251-2.
- Meuleman, J., et al.
2001 A novel 3'-splice site mutation in peripheral myelin protein 22 causing hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neuromuscul Disord* 11(4):400-3.
- Minarik, G., et al.
2003 High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen Physiol Biophys* 22(4):549-56.
- Nelis, E., et al.
1994 Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 94(6):653-7.
- Nelis, E., et al.
1996 Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 4(1):25-33.
- Nicholson, G., and J. Nash
1993 Intermediate nerve conduction velocities define X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy families. *Neurology* 43(12):2558-64.
- Ohnishi, A., et al.
2000 [A case of Charcot-Marie-Tooth disease 1 B with Val 146Phe mutation of myelin protein zero showing a severe clinical phenotype]. *Rinsho Shinkeigaku* 40(3):268-70.
- Piccolo, F., et al.
1996 A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet* 5(12):2019-22.
- Plasilova, M., et al.
1999 Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet* 36(4):290-4.
- Rabionet, R., P. Gasparini, and X. Estivill
2000 Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat* 16(3):190-202.
- Raeymaekers, P., et al.
1991 Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1(2):93-7.
- Ramzan, K., et al.

- 2005 A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Hum Genet* 116(1-2):17-22.
- Reilly, M. M., S. M. Murphy, and M. Laura
2011 Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System* 16(1):1-14.
- Reilly, M. M., and M. E. Shy
2009 Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(12):1304-14.
- Riazuddin, S., et al.
2006 Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79(6):1040-51.
- Roa, B. B., et al.
1993 Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 329(2):96-101.
- Sabet, A., et al.
2006 Skin biopsies demonstrate MPZ splicing abnormalities in Charcot-Marie-Tooth neuropathy 1B. *Neurology* 67(7):1141-6.
- Schwarz, J. M., et al.
2010 MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 7(8):575-6.
- Seeman, P., et al.
2004a Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet* 66(2):152-7.
- Seeman, P., R. Mazanec, and O. Horacek
2004b Divergent phenotypes of Charcot-Marie-Tooth disease: demyelinating with childhood onset and axonal with late onset and slow pupillary reaction, resulting from different myelin protein zero (MPZ, P0) gene mutations. *Cesk Slov Neurol Neurochir* (67):321-329.
- Seeman, P., et al.
2000a Charcot-Marie-Tooth gonosomal dominant type (CMTX1) - First findings of mutations in the gene for connexin 32 in the Czech Republic. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 63(4):219-225.
- Seeman, P., et al.
2004c Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation. *Neurology* 63(4):733-5.
- Seeman, P., et al.
2000b Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): reliable detection of the CMT1A duplication and HNPP deletion using 8 microsatellite markers in 2 multiplex PCRs. *Int J Mol Med* 6(4):421-6.
- Shy, M. E., et al.
2004 Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 127(Pt 2):371-84.
- Sorour, E., and M. Upadhyaya
1998 Mutation analysis in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 (CMT1). *Hum Mutat Suppl 1*:S242-7.
- Szabo, A., et al.

- 2005 Marked phenotypic variation in a family with a new myelin protein zero mutation. *Neuromuscul Disord* 15(11):760-3.
- Szigeti, K., et al.
2007 Functional, histopathologic and natural history study of neuropathy associated with EGR2 mutations. *Neurogenetics* 8(4):257-62.
- Takashima, H., et al.
2003 Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand* 107(1):31-7.
- Thomas, P. D., et al.
2006 Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W645-50.
- Thomas, P. K., D. B. Calne, and G. Stewart
1974 Hereditary motor and sensory polyneuropathy (peroneal muscular atrophy). *Ann Hum Genet* 38(2):111-53.
- Varon, R., et al.
2003 Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet* 35(2):185-9.
- Wang, Z., et al.
2004 Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 119(6):831-45.
- Warner, L. E., et al.
1996 Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17(3):451-60.
- Yeo, G., and C. B. Burge
2004 Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11(2-3):377-94.

Seznam publikací autorky

(součet IF 6.761)

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Šubrt I, Seeman P. Six New Gap Junction Beta 1 Gene Mutations and Their Phenotypic Expression in Czech Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers** 2010 Feb;14(1):3-7. IF₂₀₀₉ = 1.170

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Seeman P. Clinical and in silico evidence for and against pathogenicity of 11 new mutations in the *MPZ* gene. **Clinical Genetics** 2010 Jul;78(1):81-7. IF₂₀₀₉ = 3.304

Brožková D, Mazanec R, Rychlý Z, Haberlová J, Böhm J, Staněk J, Plevová P, Lisoňová J, Sabová J, Sakmaryová I, Seeman P. Four novel point mutations in the *PMP22* gene with phenotypes of HNPP and Dejerine-Sottas Neuropathy. **Muscle and Nerve** in press. IF₂₀₀₉ = 2.287

Prezentace na kongresech

Přednášky:

Brožková D, Mazanec R, Rautenstrauss B, Nevšimalová S, Seeman P: Charcot-Marie-Tooth typ 1D s novou mutací *EGR2* genu v české rodině – přínos vazebné analýzy pomocí SNP čipů. Československý Neurologický sjezd 2010, Hradec Králové 24.-27.11.2010

Dana Brožková, Radim Mazanec, Jana Haberlová, Iva Sakmaryová, Pavel Seeman: Šest nových GJB1 mutací u českých CMT X1 pacientů. Vědecká konference UK 2.LF 2009, Praha, 22.-23.4.2009

Postery:

Brožková D., Laštůvková J., Štěpánková H., Seeman P: Hereditary non-syndromic deafness DFNB49 in Czech Gypsy families - usefulness of homozygosity mapping on SNP chips. Vědecká konference UK 2.LF 2011, Praha, 13.-14.4.2011

Brožková D, Laštůvková J, Seeman P: Hearing loss DFNB49 in a Czech Gypsy family usefulness of homozygosity mapping on SNP chips. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Německo, Regensburg, 16.-18.3.2011

Brožková D, Mazanec R, Rautenstrauss B, Nevšimalová S, Seeman P: Use of SNP linkage analysis in diagnosis of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. GOLDEN HELIX® SYMPOSIUM "Genetic Analysis in Translational Medicine", Řecko, Athény, 1.-4.12.2010

D. Brožková, P. Zavad'áková, R. Mazanec, R. Ivánek, J. Haberlová, R. Chrast, C. Rivolta, P. Seeman: Linkage analysis in two Czech families with an axonal type of autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2), Third International Charcot-Marie-Tooth Consortium Meeting, Belgie, Antwerpy, 9.-11.7.2009

Brožková D., Zavad'áková P., Ivánek R., Mazanec R., Haberlová J., Seeman P.: Vazebné analýzy pomocí biočipů u českých rodin s autosomálně dominantními dědičnými neuropatiemi Charcot-Marie-Tooth, 22. Český a Slovenský neurologický sjezd, Olomouc, 27.-30.11.2008

Brožková D., Zavad'áková P., Ivánek R., Mazanec R., Haberlová J., Seeman P.: Vazebné analýzy na čipech u českých rodin s autosomálně dominantními dědičnými neuropatiemi Charcot-Marie-Tooth, Vědecká konference UK 2.LF 2008, Praha, 23.-24.4.2008

Životopis

Jméno a příjmení: Dana Brožková

Adresa: Semická 12, Praha 12, 143 00

Datum narození: 28.04.1981

Vzdělání:

2007 – dosud Univerzita Karlova, 2.LF, Praha, postgraduální studium,
Obor: Molekulární a buněčná biologie, virologie, genetika
2000 – 2007 Univerzita Karlova, 2.LF, Praha, magisterské studium,
Obor: Všeobecné lékařství, titul MUDr.
1996 – 1999 Gymnázium Turnov, ukončeno maturitní zkouškou

Zaměstnání:

2008 – dosud Klinika dětské neurologie, 2.LF UK a FNM, vědecký pracovník

Jazykové znalosti:

Angličtina pokročilý

Granty:

2009-2011 Hlavní řešitel grantu GAUK 309

Seznam příloh

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Šubrt I, Seeman P. Six New Gap Junction Beta 1 Gene Mutations and Their Phenotypic Expression in Czech Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers** 2010 Feb;14(1):3-7.

Brožková D, Mazanec R, Haberlová J, Sakmaryová I, Seeman P. Clinical and in silico evidence for and against pathogenicity of 11 new mutations in the *MPZ* gene. **Clinical Genetics** 2010 Jul;78(1):81-7.

Brožková D, Mazanec R, Rychlý Z, Haberlová J, Böhm J, Staněk J, Plevová P, Lisoňová J, Sabová J, Sakmaryová I, Seeman P. Four novel point mutations in the *PMP22* gene with phenotypes of HNPP and Dejerine-Sottas Neuropathy. **Muscle and Nerve** in press.