

Divergentní fenotypy choroby Charcot-Marie-Tooth: demylinizační s infantilním začátkem a axonální s pozdním začátkem a zpomalenou fotoreakcí následkem různých mutací myelin protein zero (MPZ, P0) genu

Seeman P.¹, Mazanec R.², Horáček O.³, Svobodová V.⁴, Ridzoň P.⁴, Beneš III. V.¹, Malíková M.⁵, Sixtová K.⁶, Šišková D.⁶, Špaček J.⁷, Rautenstrauss B.⁸

¹Klinika dětské neurologie, DNA laboratoř, ²Neurologická klinika, ³Klinika rehabilitace UK 2. LF a FN Motol Praha, ⁴Neurologická klinika IPVZ a FTN Praha Krč, ⁵Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol Praha, ⁶Klinika dětské neurologie IPVZ a FTN Praha Krč, ⁷Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice UK Hradec Králové, ⁸Institut für Humangenetik Universität Erlangen

Souhrn

Úvod. Mutace genu pro periferní myelin protein zero (MPZ, P0) jsou již 10 let jednou ze známých příčin demyelinizačního typu choroby Charcot-Marie-Tooth (CMT) kam kromě klasické formy CMT1 patří i časně začínající a těžká forma Dejerineovy-Sottasovy neuropatie (DSS) a ještě časnější a těžší kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN). P0 protein je hlavní součástí periferního myelinu a hraje zásadní roli v procesu periferní myelinizace. V posledních letech byly popsány rodiny s axonálním typem CMT v důsledku mutací v P0 genu. Pacienti a výsledky. Popisujeme 3 české rodiny s výskytem dvou zcela odlišných začátků, průběhů a forem choroby CMT, u kterých byly jako příčiny prokázány mutace v P0 genu. Šlo o mutace již dříve popsané v jiných zemích a sice: Arg98Cys u dvou rodin se třemi postiženými, jednou ve 2 generacích, s těžkou demylinizační formou, infantilním začátkem a stabilním průběhem a s extrémně nízkou rychlostí vedení periferním nervem a dále mutaci Thr124Met u pacientky s pozdním začátkem axonální formy CMT na konci 4. dekády, abnormní fotoreakcí a poměrně rychlou progresí nemoci. U mutace Arg98Cys šlo v obou rodinách o vznik de-novo, a u mutace Thr124Met sice nebylo možné rodiče pacientky dovyšetřit, ale anamnesticky trpí matka pacientky chorobou CMT. U syna i dcery pacientky u kterých dosud nejsou žádné klinické známky polyneuropatie je též abnormní fotoreakce a u syna byla též prokázána stejná mutace, u dcery nebylo vyšetření provedeno. Závěry. Těžká demyelinizační dědičná neuropatie s infantilním začátkem (DSS) a axonální pozdně začínající CMT2 představují opačné póly spektra poruchy myelinizace způsobené mutacemi P0 genu. Kodon 98 Arg P0 genu je místem opakovaného vzniku mutací i u českých pacientů. Objasnění proč některé mutace v P0 genu vedou k velmi časnému začátku demyelinizační neuropatie a jiné mutace stejného genu k pozdnímu začátku axonální neuropatie by mohlo poskytnout klíč k molekulární interakci mezi axonem a Schwannovou buňkou.

Klíčová slova: HMSN III, Dejerine-Sottas, P0, MPZ, myelin protein zero, Charcot-Marie-Tooth, CMT

Summary

Seeman P., Mazanec R., Horáček O., Svobodová V., Ridzoň P., Beneš III. V., Malíková M., Sixtová K., Šišková D., Špaček J., Rautenstrauss B.: Divergentní fenotypy choroby Charcot-Marie-Tooth: demylinizační s infantilním začátkem a axonální s pozdním začátkem a zpomalenou fotoreakcí následkem různých mutací myelin protein zero (MPZ, P0) genu

Úvod. Mutace genu pro periferní myelin protein zero (MPZ, P0) jsou již 10 let jednou ze známých příčin demyelinizačního typu choroby Charcot-Marie-Tooth (CMT) kam kromě klasické formy CMT1 patří i časně začínající a těžká forma Dejerineovy-Sottasovy neuropatie (DSS) a ještě časnější a těžší kongenitální hypomyelinizační neuropatie (CHN). P0 protein je hlavní součástí periferního myelinu a hraje zásadní roli v procesu periferní myelinizace. V posledních letech byly popsány rodiny s axonálním typem CMT v důsledku mutací v P0 genu. Pacienti a výsledky. Popisujeme 3 české rodiny s výskytem dvou zcela odlišných začátků, průběhů a forem choroby CMT, u kterých byly jako příčiny prokázány

mutace v P0 genu. Šlo o mutace již dříve popsané v jiných zemích a sice: Arg98Cys u dvou rodin se třemi postiženými, jednou ve 2 generacích, s těžkou demyelinizační formou, infantilním začátkem a stabilním průběhem a s extrémně nízkou rychlostí vedení periferním nervem a dále mutací Thr124Met u pacientky s pozdním začátkem axonální formy CMT na konci 4. dekády, abnormní fotoreakcí a poměrně rychlou progresí nemoci. U mutace Arg98Cys šlo v obou rodinách o vznik de-novo, a u mutace Thr124Met sice nebylo možné rodiče pacientky dovyšetřit, ale anamnesticky trpí matka pacientky chorobou CMT. U syna i dcery pacientky u kterých dosud nejsou žádné klinické známky polyneuropatie je též abnormní fotoreakce a u syna byla též prokázána stejná mutace, u dcery nebylo vyšetření provedeno. Závěry. Těžká demyelinizační dědičná neuropatie s infantilním začátkem (DSS) a axonální pozdně začínající CMT2 představují opačné póly spektra poruchy myelinizace způsobené mutacemi P0 genu. Kodon 98 Arg P0 genu je místem opakovaného vzniku mutací i u českých pacientů. Objasnění proč některé mutace v P0 genu vedou k velmi časnému začátku demyelinizační neuropatie a jiné mutace stejného genu k pozdnímu začátku axonální neuropatie by mohlo poskytnout klíč k molekulární interakci mezi axonem a Schwannovou buňkou.

Klíčová slova: HMSN III, Dejerine-Sottas, P0, MPZ, myelin protein zero, Charcot-Marie-Tooth, CMT

Úvod

Choroba Charcot-Marie-Tooth (CMT) je společný název pro klinický i geneticky heterogenní skupinu dědičných periferních neuropatií (1). Jde o skupinu nejčastějších dědičných nervosvalových onemocnění. Typickými klinickými příznaky jsou distální svalová slabost a atrofie, více a dříve na dolních než na horních končetinách, snížené až vyhaslé šlachosvalové reflexy, poruchy cití a většinou i poruchy chůze a jemné motoriky (2). U převážné většiny pacientů se choroba projeví v prvních dvou dekádách života (2, 3). U chorob CMT se vyskytují všechny typy mendelovského přenosu přičemž nejčastějším je autosomálně dominantní typ následovaný gonosomálně dominantním typem (4, 5). Elektrofyziologicky je u CMT rozlišován častější typ demyelinizační (CMT1) s výrazně sníženou rychlostí vedení periferním nervem – obvykle pod 38 m/s na n. medianus vpravo a vzácnější typ axonální (CMT2) s normální nebo jen mírně sníženou rychlostí vedení – obvykle do 38 m/s na n. medianus vpravo a s výrazně sníženou amplitudou akčních potenciálů (1). Histopatologicky je typ CMT1 spojen se segmentální demyelinizací a tvorbou klasických cibulových formací v biopsii nervu. Pro typ CMT2 je naopak typické snížení počtu velkých myelinizovaných vláken se shluky regenerujících malých vláken a s relativně zachovalými myelinovými obaly (2). U 50–70 % pacientů s CMT lze prokázat tzv. CMT1A duplikaci, resp. HNPP delecí na chromozomu 17p11.2, obsahující gen pro periferní myelin protein 22 (PMP22) (6). Mutace v genech pro connexin 32 (Cx32) (7), myelin protein nula (P0) (8) a PMP22 (9, 10, 11) jsou dalšími známými příčinami chorob CMT.

Na rozdíl od CMT1A, která je vždy spojena s demyelinizačním fenotypem CMT1, byly mutace v Cx32 i v P0 v poslední době prokázány kromě pacientů s CMT1 i pacientů s CMT2 (5, 12, 13).

Myelin protein zero (P0) je hlavní strukturální složkou kompaktního myelinu periferních nervů a je

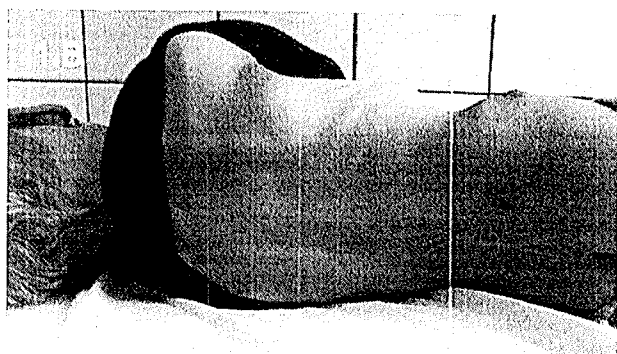
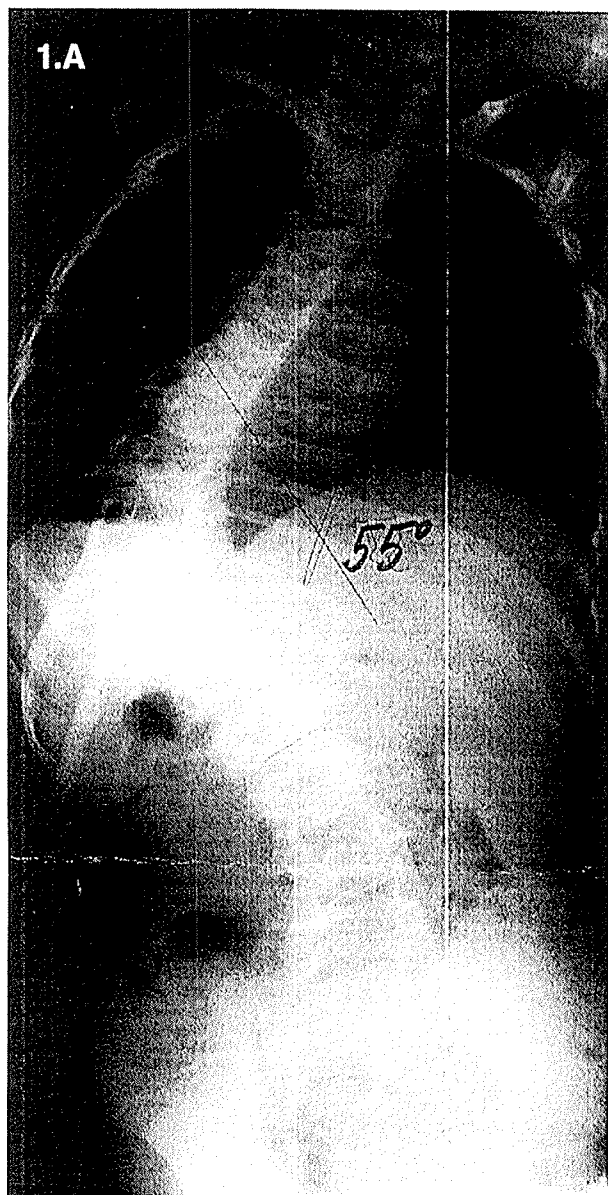
membránovým proteinem exprimovaným ve Schwannových buňkách (14, 15). P0 hraje esenciální roli v procesu myelinizace a jeho porucha, chybění či nadbytek vede k jejím závažným poruchám (15). Mutace v P0 genu jsou nacházeny u pacientů s chorobami CMT s již vyloučenou CMT1A duplikací resp. HNPP delecí v 5–10 % případů (16–18).

Mutacemi v P0 genu se projevují velkou variabilitu fenotypu nejen klinického, ale i elektrofyziologického a histopatologického (8, 19). Oproti očekávání – při poruše myelinového genu, je pozorován u pacientů nejen demyelinizační fenotyp, ale i axonální a to jak elektrofyziologicky tak i v biopsii nervu (8, 13, 20). Dosud bylo v P0 genu popsáno přes 90 mutací všech typů, nejvíce typu missense a mutace se vyskytují nejčastěji v exonu 3, který kóduje extracelulární doménu proteinu (11, 21). Většina mutací má dominantní efekt, projeví se tedy na fenotypu již v heterozygotním stavu, byly však již popsány případy recesivních mutací v P0 genu (22).

Zde popisujeme první případy českých CMT pacientů s mutacemi v P0 genu, se zcela odlišným průběhem a typem dědičné neuropatie.

Pacienti

Pacientka 283: v době vyšetření 8 let, rodiče pacientky jsou zdraví, v rodině se žádné nervosvalové onemocnění nevyskytlo, sourozence nemá. Těhotenství a porod pacientky byly bez komplikací, porodní hmotnost byla 3800 g a délka 51 cm, od 2 měsíců byla dívka sledována pro hypotonii a opoždění motorického vývoje – sama stála od 18 měsíců a chodila sama od 3,5 roku. Od 18 měsíců věku je popisována skolióza páteře (obr. 1A) a dívka již do současnosti prodělala 5 ortopedických korekčních operací páteře (obr. 1B). EMG vyšetření v 18 měsících věku ukázalo extrémně sníženou rychlost vedení periferními nervy (6–8 m/s) a u pacientky byly v té době stanoveny diagnóza hereditární motoricko-senzitivní neuropatie typ III (HMSN III), resp. Dejerineova-Sottasova neuropatie. **Neurologické vyšetření v 8 letech věku:** drobná dívka, mentálně odpovídající věku, s povšechnou svalovou hypotonií a hypotonií postihující jak distální, tak i proximální svaly, po opakovaných ortopedických korekčních operacích páteře používá korzet (obr. 2). Foto-



Obr. 1A. Rtg páteře s těžkou skoliózou u pacientky 283 před první ortopedickou korekční operací páteře. 1B. Současný stav pacientky 283 po opakovaných korekčních operacích páteře. Všimněte si povšechných hypotrofií a atrofií zádoových svalů.

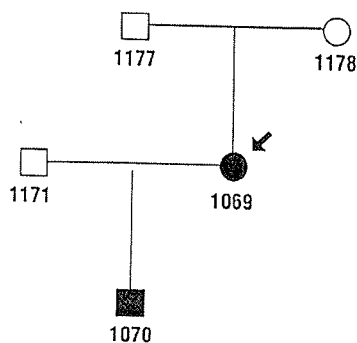
reakce je normálně výbavná, sluch má normální. Deformity nohou nemá (obr. 2). Areflexie šlachosvalová na všech končetinách, pyramidové jevy spastické nejsou výbavné, chůze nejistá s rozšířenou bází, ze dřepu se zvedá šplháním. **Pacientka 1069** v době vyšetření 44 let, oba rodiče pacientky jsou zdraví, netrpěli



Obr. 2. Pacientka 283 ve věku 8 let, všimněte si povšechných svalových atrofií na dolních končetinách a nepřítomnosti deformit nohou.

ani netrpí žádným nervosvalovým onemocněním, sourozence pacientka nemá, 19letý syn trpí obdobným postižením s velmi časným začátkem v útlém věku (obr. 3).

Pacientka má výrazné motorické postižení od zcela útlého věku – od 3. měsíce věku je popisovaná hypotonie a opoždování



Obr. 3. Rodokmen rodiny pacientů 1069 a 1070, rodiče pacientky jsou zdraví, pacientka má však stejně postiženého syna – situace svědčí pro de-novo vznik mutace s dominantním vlivem. Kulaté symboly značí ženy, hranaté symboly značí muže, plně černé symboly značí osoby postižené chorobou CMT.

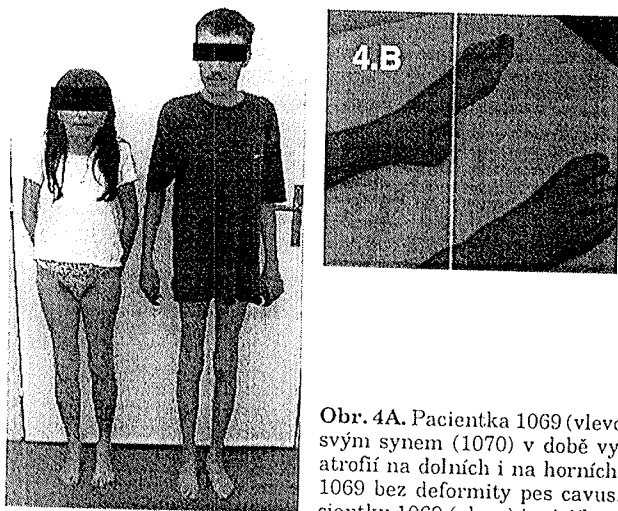
motorického vývoje, samostatně chodila až od 4 let, nikdy však nebyla schopna samostatně normální chůze. Od útlého dětství je též popisována skolióza páteře. Ortopedickou operaci dosud žádnou neprodělala. V dětském a dorostovém věku byla sledována na neurologii a bylo jí postupně sděleno několik různých diagnóz – mj. Friedreichova ataxie a dětská mozková obrna (DMO). Až ve 23 letech byly po podrobném vyšetření neurologickém a elektrofyziologickém a po vyšetření biopsie nervu pacientce stanovena správná diagnóza hereditární motoricko-senzitivní neuropatie typ III (HMSN III), resp. Dejerineova-Sottasova neuropatie. Průběh onemocnění je po-

měrně stabilní, bez zhoršování. Asi od 25 let pozoruje zhoršování sluchu a v současnosti byla ztráta sluchu objektivizována až na 70dB. Probandka porodila ve svých 26 letech syna, který též trpí HMSN III.

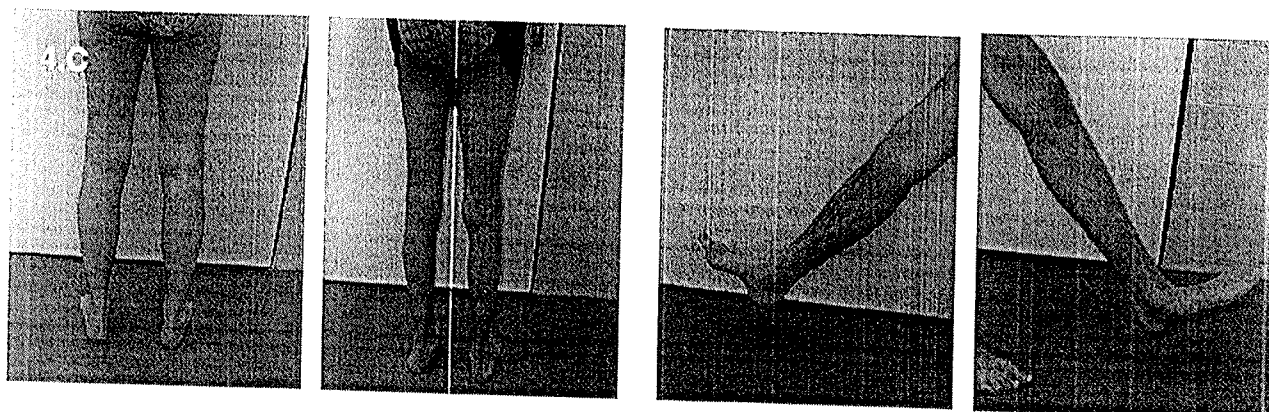
Neurologické vyšetření ve 44 letech: lucidní, nedoslýchavá žena, s výraznou svalovou slabostí jak distálně, tak i proximálně, bez deformit nohou a rukou (obr 4A, B, C). Při fotoreakci je zpomalená následná mydriáza po ukončení osvětlu. Šlachosvalová areflexie na všech končetinách, nevýbavné pyramidové jevy spastické, výrazná punčochovitá a rukavicovitá hypestezie. Samostatný stoj bez opory není možný, pokud se pacientka drží okolí, udrží se ve stoji sama. Chůze samostatná je nemožná, chodí s oporou a s výraznými titubacemi, ze dřepu se nezvedne.

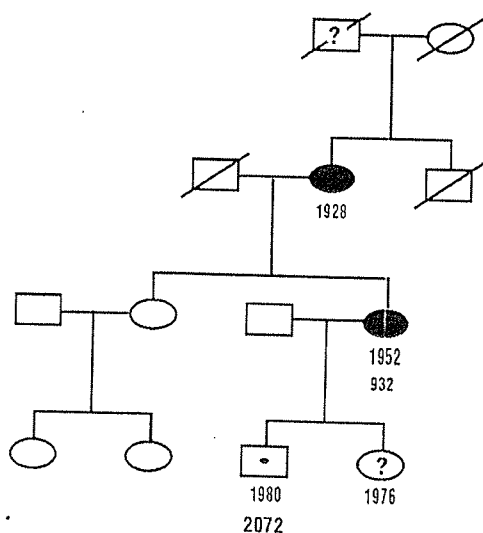
Pacient 1070: v době vyšetření 19 let, matka pacienta (pac. 1069) trpí stejnými obtížemi a byla u ní stanovena diagnóza HMSN III (obr. 3). U pacienta bylo od 1 roku věku též pozorováno opoždění motorického vývoje, chodil s oporou od 2 let. Ve 3 letech byla u pacienta na základě rodinné anamnézy, neurologického vyšetření a EMG stanovena diagnóza HMSN III. Normální samostatné chůze nikdy schopen nebyl, jako dítě se pohyboval na tříkolce, nyní používá mechanický vozík. Od 10 let věku je sledován pro výraznou a progredující kyfoskoliózu hrudní páteře. Dosud nebyl operován. Ve 14 letech se u něj po banálním respiračním infektu rozvinula respirační insuficience s nutností podpůrné ventilace. **Neurologické vyšetření v 19 letech:** lucidní spolupracující, sedí na vozíku, nápadné povšechné svalové hypotrofie, výrazná dextrokonvexní skolióza hrudní páteře. Na mozkových nervech je obleněná fotoreakce a mírná hypakuze oboustranně. Na HK jsou hypotrofie svalové, více distálně, svalová síla je povšechně snížena nejen distálně, ale i proximálně, areflexie C5–C8, taxie bilaterálně mírně nejistá před cílem, rukavicová hypestezie do úrovně zápěstí, ladičkovyhaslá až k loktům. Na DK – povšechné svalové hypotrofie a atrofie, jak distálně, tak proximálně (obr. 4C), tonus svalový je povšechně snížen, nemá deformitu nohou typu pes cavus, spíše pedes plani s výraznou valgozitou kotníků (obr. 4A a 4C). Areflexie L2–S2, taktilní hypestezie do 1/3 lýtek, ladička vyhaslá až ke kolenům. Samostatný stoj bez opory je krátce možný, se zavřenými očima nedokáže, chůze možná jen s oporou a jen po místnosti či krátkou vzdálenost, ze sedu se zvedne s dopomocí.

Pacientka 932: v době vyšetření 49 let, matka pacientky (74 let) ve stáří špatně chodí a má bolesti a brnění končetin, asi od 70 let trpí zhoršující se ztrátou sluchu, u syna i dcery pacientky je od dorostového věku známá abnormní fotoreakce (obr. 5), neurologicky však nikdo z příbuzných vyšetřen dosud nebyl.



Obr. 4A. Pacientka 1069 (vlevo) se svým synem (1070) v době vyšetření na našem pracovišti. Všimněte si povšechných svalových atrofií na dolních i na horních končetinách a nepřítomnosti deformit nohou. 4B. Nohy pacientky 1069 bez deformity pes cavus. 4C. Povšechné atrofie distálních i proximálních svalů DK u pacientky 1069 (vlevo) i u jejího syna 1070 vpravo a u obou překvapivě dobrá extenze nohy.





Obr. 5. Rodokmen rodiny pacientky 932 s dominantním přenosem choroby, kdy syn pacientky – č. 2072 je též heterozygotním nosičem mutace T124M, ale dosud nedosáhl věku manifestace choroby, je u něho přítomná pouze abnormní fotoreakce, stejně jako u jeho sestry, která však nebyla k dispozici k vyšetření. Matka pacientky námi vyšetřena nebyla, anamnesticky však trpí příznaky choroby CMT s pozdním začátkem.

Asi od 12 let věku si pacientka všimla anizokorie a velmi pomalé reakce zornic na osvit, do svých asi 38 let byla jinak fyzicky zcela zdravá. Ve 38 letech se po chřipce objevila slabost dolních končetin (DK) – nemohla chodit a následně se objevily i bodavé bolesti v končetinách, pro které byla pacientka poprvé vyšetřena a pak i hospitalizována na neurologii. Stav byl nakonec uzavírán jako polyradikuloneuritis, pacientka brala dlouhodobě kortikoterapii a měla přechodně invalidní důchod. Po 45. roce věku došlo k výraznému a rychlejšímu zhoršování obtíží a slabosti DK a obtíže se objevily i na rukou – zhoršení jemné motoriky, neobratnost. Došlo k nápadné atrofizaci distálních svalů na DK i malých svalů rukou. Zhoršení sluchu dosud nepozoruje. Při kontrolní hospitalizaci ve 49 letech bylo po

vyšetření EMG vysloveno podezření na axonální formu HMSN. V posledním roce používá při chůzi lůl, bodavé bolesti na DK se objevují obvykle v souvislosti s virosou a začaly se objevovat i na horních končetinách (HK).

Neurologické vyšetření ve 49 letech věku. Lucidní, normálně slyšící žena, na mozkových nervech je nápadná pouze nevýbavná fotoreakce na osvit bilaterálně, na HK jsou atrofie distálních svalů předloktí a malých svalů rukou – hlavně interoseálních – bez nápadnější atrofie thenaru či hypothenaru, hyporeflexie C5–C8, rukavicovitá hypestezie do poloviny předloktí. Na DK jsou výrazné distální atrofie lýtek, není deformita nohou (obr. 6), je oslabená extenze nohy bilaterálně, areflexie L2–S2, punčochovitá hypestezie a výrazná porucha vibračního citu nejméně do výše kolen. Stoj je nejistý, obvykle se snaží přidržovat okolí, chůze je nejistá s titubacemi s výrazným zhoršením při zavřených očích a při obrazech jako projevy spinální ataxie. Ze dřepu se zvedá šplháním.

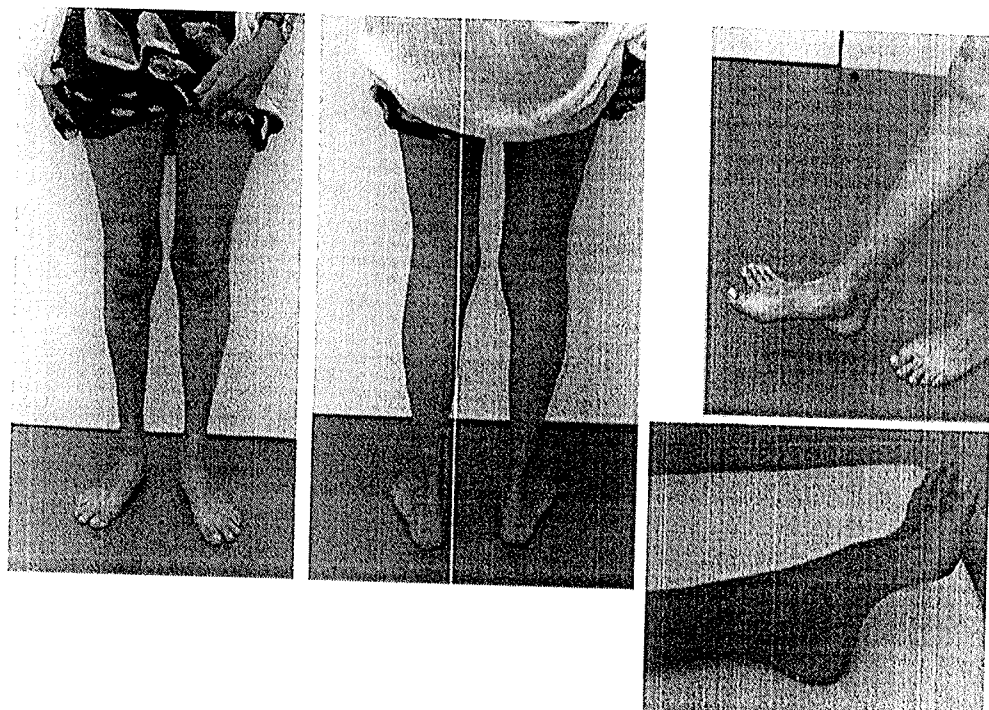
Metody

Elektrofyzilogická vyšetření (EMG, VEP, BAEP) a zobrazovací vyšetření (rtg) byla provedena běžnými technikami v rámci běžných rutinních vyšetření.

Molekulárně genetická vyšetření

DNA byla izolována z periferní krve.

U popisovaných pacientů s klinicky diagnostikovanou dědičnou periferní neuropatií CMT byla nejprve pomocí sady mikrosatelitových markerů (23) vyloučena nejčastější mutace, tedy CMT1A duplikace, resp. HNPP delece na chromozomu 17p11.2. U pacientky 1069 byly dále přímým sekvenováním vyloučeny mutace v kódující sekvenci PMP22 genu. Vzhledem k jedné velmi časněmu začátku a extrémně snížené rychlosti vedení u pacientů 1069 a 283 a k pozdnímu začátku axonální neuropatie s abnormní fotoreakcí u pacientky 932 bylo pokračováno analýzou P0 genu. Všechny 6 kódujících exonů P0 genu bylo nejprve amplifikováno v 5 PCR pomocí intronových primerů (exon 5 a 6 byly amplifikovány v jedné reakci vzhledem k malé velikosti intronu 5), dříve publikovaných (24). Získané PCR produkty byly následně purifikovány pomocí kolonek QIAquick (Qiagen-Německo) a použity jako templát při sekvenační reakci s využitím kitu Big Dye Terminator Ver. 3 (ABI – USA). Sekve-



Obr. 6. Pacientka 932 v věku 49 let, v době nálezů mutace Thr124Met v P0 genu. Všimněte si výrazných atrofií distálních svalů dolních končetin, oslabení extenze palce a nepřítomnost deformity nohy.

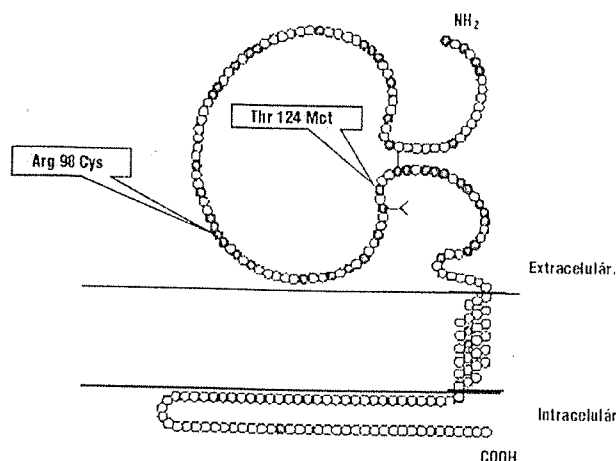
nační reakce byly následně precipitovány v kyselém alkoholu podle návodu výrobce sekvenačního kitu. Mutace byly prokázány sekvenováním obou vláken DNA a k jejich potvrzení nezávislou metodou bylo provedeno restrikční štěpení exonu 3 pomocí enzymu HhaI (MBI Fermentas – Litva) pro mutaci Arg98Cys a NlaIII (NEB – USA) pro mutaci Thr124Met. Bylo použito číslování kodonů P0 proteinu, které zahrnuje i 29 aminokyselinový signální peptid a začíná prvním kodonem methioninu tohoto peptidu v souladu s databází Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database (21).

Histopatologie

Biopsie nervu u pacientky 1069 byla odebrána z n. suralis vlevo. Tkáň byla fixována směsí paraformaldehydu/glutaraldehydu a kyselinou osmičelou, poté zalita do epoxypřyskyřice – Eponu. Poloténké řezy nervu byly barveny toluidinovou modří, ultratenké řezy po kontrastování uranylacetátem a citrátem olova byly vyšetřeny elektronovým mikroskopem Tesla BS 500.

Výsledky

U 4 pacientů s chorobami CMT ze 3 nepříbuzných rodin s dříve vyloučenou nejčastější mutací, tedy CMT1A duplikací resp. HNPP delecí byly pomocí přímého sekvenování prokázány 2 různé heterozygotní mutace v P0 genu (obr. 7). Obě mutace byly proká-

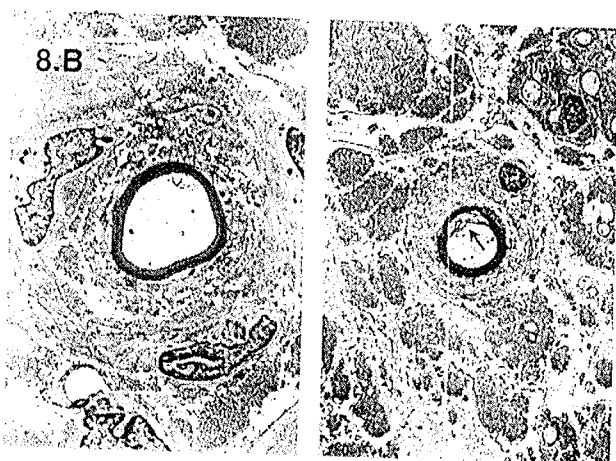
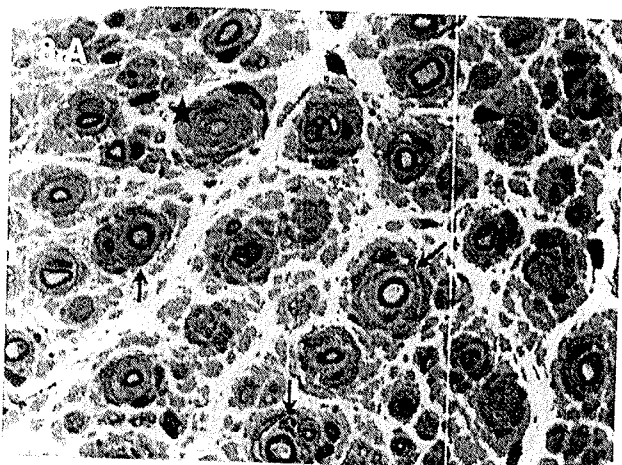


Obr. 7. Schéma P0 proteinu s označením míst aminokyselin-kodonů s nalezenými mutacemi u popisovaných rodin. Nahoře je extracelulární prostor, dole je intracelulární prostor.

zány na obou vláknech DNA a následně potvrzeny i pomocí restrikčního štěpení enzymem HhaI resp. NlaIII. Šlo o výměnu báze C na T v pozici 292 vedoucí k výměně 98. aminokyseliny arginin (Arg) na cystein

Tab. 1.

Pacient	Věk při vyšetření	Fenotyp	Nerv	Distální latence (ms)	Rychlost vedení (m/s)	Amplituda (mV)
283	7,5 roku	DSS	n. medianus	17,5	11,5	1,7
			n. peroneus	28,1	9,7	2,6
			n. suralis	nevýbavné		
			n. medianus- senzitivní	nevýbavné		
1 069	44 let	DSS	n. medianus	56	4	1,0
			n. ulnaris	26,1	9	4,3
			n. tibialis	53,8	9	0,1
			senzitivní nervy (medianus, ulnaris i suralis)	nevýbavné		
1 070	19 let	DSS	n. medianus	48,3	6	1,1
			n. ulnaris	30,9	9	2,3
			n. tibialis	76,5	6	0,2
			senzitivní nervy (medianus, ulnaris i suralis)	nevýbavné		
932	49 let	CMT2	n. ulnaris	4,3	51	6,3
			n. tibialis	12,9	31	0,3
			n. peroneus	11	34	0,15
			senzitivní nervy (medianus, suralis)	3,6	44	4,9
				2,7	44	8,2
932	51 let	CMT2	n. medianus	8,1	29	1,2
			n. ulnaris	3,6	51	4,8
			n. tibialis	nevýbavné		
			n. peroneus	nevýbavné		
			senzitivní nervy (medianus)	nevýbavné		



Obr. 8A. Biopsie nervu suralis ve světlené mikroskopii od pacientky 1069 v jejím věku 23 let. Všimněte si četných a výrazně rozvinutých cibulovitých formací (šípky) a přítomnosti demyelinizovaných a slabě myelinizovaných vláken (hvězdička). 8B. Elektronová mikroskopie stejné biopsie nervu od pacientky 1069 s cibulovitou hypertrofií Schwannovy buňky (vlevo) a porušená kompaktnost myelinu – šípka (vpravo).

(Cys) – mutace Arg98Cys ve dvou rodinách, u tří osob s těžkou demyelinizační dědičnou neuropatií HMSN III, resp. Dejerine-Sottas neuropatií (pacienti 1069, 1070 a 283). V obou rodinách byl dovyšetřením zdravých rodičů pacientek 1069 i 283 prokázán de-novo vznik této mutace. U všech tří nosičů mutace Arg98Cys byla od útlého dětství extrémně snižena rychlost vedení periferními nervy (tab. 1), a tyto hodnoty se již dále během života zásadněji neměnily. Nápadný byl rozvoj těžké skoliosy páteře (obr. 1A) u všech tří nosičů této mutace a naopak nepřítomnost deformit nohou typu pes cavus (obr. 4B, 4C). V biopsii nervu suralis byly u pacientky 1069 prokázány četné cibulovité formace myelinu a přítomnost demyelinizovaných a tence myelinizovaných vláken (obr. 8A). V elektronové mikroskopii byla nalezena místa nekompaktního myelinu (obr. 8B). Výsledek vyšetření biopsie nervu tehdy v roce 1983 výrazně podpořil, resp. potvrdil diagnózu HMSN III. V další rodině s familiárním výskytem axonálního typu choroby

CMT2 s pozdním začátkem ve 4. a 5. dekádě a s abnormální fotoreakcí byla přímým sekvenováním prokázána u dvou osob (pacientka 932 a její syn 2072) heterozygotní výměna báze C na T v pozici 371 vedoucí k výměně 124. aminokyseliny threoninu (Thr) na methionin (Met), mutace Thr124Met. Obě nalezené mutace byly již v minulosti popsány u pacientů s chorobami HMSN III resp. CMT2 v jiných zemích (8, 14). Přestože obě missense mutace zasahují stejný exon 3 P0 genu, a tím extracelulární doménu proteinu (obr. 7), jsou fenotypy pacientů, věk při začátku choroby, její průběh i elektrofyzilogické nálezy naprosto odlišné.

Elektrofyzilogie

Výsledky vyšetření periferních nervů u popisovaných pacientů jsou shrnuty v tabulce 1. V jehlové EMG byly u všech pacientů prokázány chronické denervační a regenerační změny.

Evokované potenciály u pacientky 1069, trpící od 25 let progresivní ztrátou sluchu a u jejího syna (1070).

BAEP

pacientka 1069 ve věku 44 let – sluchový práh zvýšen o 70 dB, na BAEP hrubě abnormální odpovědi s neměřitelnými latencemi, záznam svědčí pro těžkou periferní lézi,

pacient 1070 ve věku 19 let – sluchový práh zvýšen o 10 dB, ještě v mezích normy, na BAEP abnormální odpovědi s chyběním vlny I, latence vlny III a V jsou prodloužené, záznam svědčí pro periferní lézi.

VEP

u obou osob 1069 i 1070 byly latence vlny P100 v mezích normy.

Diskuse

Popsali jsme tři české CMT rodiny s prokázanou mutací v P0 genu. Obě mutace se sice vyskytují ve stejném exonu stejného genu, ale jak je vidět ze zcela odlišného začátku a průběhu choroby CMT u zde popsaných pacientek, mají tyto dvě nalezené mutace nejspíše zcela odlišný vliv na funkci P0 proteinu a na interakci axonu a Schwannovy buňky. Kodon 98Arg, kde byla u dvou z popsáných rodin prokázána výměna argininu za cystein je evidentně tzv. horkým místem (hot-spot) pro vznik mutací, protože byly opakovaně popsány mutace vedoucí k výměně na histidin, prolin nebo serin a mutace tohoto kodonu byla nalezena jako nejčastější například u pacientů ve Francii (25) a zřejmě i jinde v Evropě (8, 26). Není tedy zřejmě žádným překvapením, že se tato mutace objevila i mezi prvními prokázanými případy pacientů s mutacemi v P0

genu v České republice. Naše výsledky s nálezy dvou nepříbuzných rodin se stejnou mutací Arg98Cys vzniklou v obou případech de-novo tato pozorování z jiných zemí jasně podporují. Proč se kodon 98 P0 genu stává tak často místem mutací se nicméně blíže objasnit zatím nepodařilo.

Fenotypy dosud popsaných pacientů s jednotlivými mutacemi kodonu 98 jsou pro jednotlivé výměny aminokyselin poměrně shodné – fenotyp CMT1 při výměně na histidin, serin a prolin, ale fenotyp DSS/HMSN III při výměně na cystein (27). Efekt mutace na funkci proteinu a hlavně na fenotyp nosiče mutace není evidentně dán místem mutace, ale spíše charakterem výměny, resp. vyměněnou aminokyselinou (8, 21, 25, 26). Záměna za cystein, obsahující sirnou skupinu může vést ke vzniku disulfidových vazeb v extracelulárním prostoru a velmi negativně ovlivnit strukturu periferního myelinu, pro což svědčí i nález v biopsii nervu s porušenou kompaktností myelinu u pacientky 1069 (obr. 8B) a podobný nález v biopsii nervu i u pacienta se stejnou mutací a velmi podobným fenotypem popsaným v Japonsku (27).

Ztráta sluchu, která se začala projevovat u pacientky 1069 s HMSN III nejspíše souvisí s touto diagnózou a s nalezenou mutací Arg98Cys a je vysvětlitelná postižením sluchového nervu, protože P0 gen je exprimován pouze ve Schwannových buňkách, tedy pouze v PNS a případné centrální příznaky by tedy neměly souviset s poruchou tohoto genu. Ztráta sluchu nebyla u pacientů s touto mutací popisována, ale naše pacientka je starší než dosud popsaní pacienti a je v současné době zřejmě nejstarší popsanou osobou s touto mutací. Proto je možné ztrátu sluchu u nosičů mutace Arg98Cys v dospělosti očekávat i u dalších. Toto tvrzení je podporováno nálezem periferní léze na BAEP s absencí vlny I i u 19letého syna pacientky s toutéž mutací.

Výsledek DNA vyšetření v případě zde popisovaných dvou pacientek s mutací Arg98Cys určil, že nejde o recesivní typ poruchy s 25% rizikem postižení pro sourozence a jen nepatrně zvýšeným rizikem pro postižení potomků, jak by se mohlo ze sporadického případu zdát, ale že jde o de-novo mutaci s nezvýšeným rizikem pro sourozence, ale zato s 50% rizikem potomky pacienta! Tedy zcela zásadní rozdíl pro genetické poradenství.

Mutace Thr124Met byla v posledních 4 letech též opakovaně popsána v heterozygotním stavu u pacientů s CMT2 z jiných zemí (13, 20). Nedávno byl dokonce publikován první případ s homozygotním stavem pro tuto mutaci u pacienta, který měl klinicky, elektrofyziologicky i histopatologicky demyelinizační formu CMT a zemřel ve 44 letech v souvislosti se zhoršující se dechovou nedostatečností na pneumonii (28).

Vzhledem k dobře popsanému fenotypu i molekulárnímu podkladu této formy CMT bylo pro tento zvláštní CMT fenotyp s pozdním začátkem převážně

axonální polyneuropatie s abnormní fotoreakcí a poruchou sluchu zavedeno i klinické označení CMT2J a je uveden i v katalogu OMIM (OMIM 607736). Rozvoj polyneuropatie ve 4., 5. či 6. dekádě a s převážně senzitivními příznaky a progresivním průběhem vede samozřejmě většinou k pravděpodobnější diagnóze získané polyneuropatie, pečlivá rodinná anamnéza, dovyšetření nejbližších příbuzných neurologicky i elektrofyziologicky a vyšetřením fotoreakce může umožnit stanovení diagnózy CMT2. Naše pacientka, stejně tak, jak popisuje De Jonghe (13) měla jako jeden z prvních příznaků bodavé bolesti v dolních končetinách, které přetrvávají a i progres choroby je u naší pacientky obdobně nápadně rychlá, jak je to popsáno De Jonghem. Proč některé mutace P0 genu vedou k těžké demyelinizační neuropatii s infantilním začátkem a u jiných mutací v blízkém sousedství je nosič mutace až do starší dospělosti či dokonce někdy i důchodového věku zcela zdravý a pak se rozvine poměrně rychle progredující axonální neuropatie není dosud vůbec jasné. Funkční testování nalezených mutací v expresních systémech může v budoucnu přinést odpověď na tuto důležitou otázku.

Z uvedených případů vyplývá, že pacienti s demyelinizačním typem CMT, velmi časným začátkem choroby a extrémně sníženou rychlostí vedení periferním nervem ale i pacienti s pozdním začátkem axonální formy CMT by měli po vyloučení CMT1A duplikace, resp. HNPP delecí být vyšetřeni na mutace v P0 genu. Poučení ze zde publikovaných případů by mělo usnadnit včasné stanovení správné diagnózy u dalších pacientů, u kterých je pak možné klinickou diagnózu potvrdit i nálezy mutací na DNA úrovni.

Poděkování:

Podpořeno z grantu IGA MZ č. NF-6504/3 a z VZ č. 111300003 pro UK 2. LF. P. S. byl v roce 2003 podpořen stipendiem European Neurological Society (ENS). Děkujeme Doc. MUDr. M. Bojarovi CSc. a Doc. MUDr. V. Komárkovi CSc. za všeobecnou podporu a zájem pro tuto studii.

Literatura

1. Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF, editors. *Peripheral neuropathy*, 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1993. p. 1094–1136.
2. Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980; 103: 259–280.
3. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, et al. Demyelinating and axonal features Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 2003; 126: 134–151.
4. Harding AE, Thomas PK. Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J Med Genet* 1980; 17: 329–336.

5. Suter U, Scherer SS. disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 714–726.
6. Nelis E, Van Broeckhoven C. Estimation of mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type I and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 1996; 6: 25–33.
7. Seeman P, Mazanec R, Hrušáková Š, Čtvrtečková M, Rašková D, Paděrová K, et al. Charcot-Marie-Tooth gonosomálně dominantní typ (CMTX1) – první nálezy mutací v genu pro connexin 32 v České republice. *Čes a slov Neurol Neurochir* 2000; 4: 219–225.
8. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, Killian JM, Kolodry EH, Karpati G, et al. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas and congenital hypomyelination. *Neuron* 1996; 17: 451–460.
9. Seeman P, Cíbochová R, Beneš V Jr, Loeffgren A. Kongenitální hypomyelinizace v souvislosti s de-novo mutací v genu pro periferní myelin protein 22 – první prokázaný případ v České republice a přehled literatury. *Čes a slov Neurol Neurochir* 2002; 3: 206–212.
10. Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurology* 2002; 1: 110–118.
11. Nelis E, Hautes N, Van Broeckhoven C. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* 1999; 13: 11–28.
12. Marossu MG, Vaccargiu S, Marossu G, Vanelli A, Cianchetti C, Muntoni F. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 associated with mutation of the myelin protein zero gene. *Neurology* 1998; 50: 1397–1401.
13. De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Lofgren A, et al. The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999; 122: 281–290.
14. Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem* 1973; 20: 1207–1216.
15. Suter U, Scherer S. Disease mechanism in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 714–726.
16. Roa B, Warner L, Garcia C, Russo D, Lovelace R, Chance PE, et al. Myelin protein zero (MPZ) gene mutations in nonduplication type 1 Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mut* 1996; 7: 36–45.
17. Bort S, Nelis E, Timmerman V, Sevilla T, Cruz-Martinez A, Martinez F, et al. 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* 1997; 99: 746–754.
18. Mostacciuolo ML, Righetti E, Zortea M, Bosello V, Schiavon F, Vallo L, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type I and related demyelinating neuropathies: mutation analysis in a large cohort of Italian families. *Hum Mut* 2001; 18: 32–41.
19. Gabreels-Festen AA, Hoogendijk JE, Meijerink PH, Gabreels FJ, Bolhuis PA, van Beersum S, et al. Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 1996; 47: 761–765.
20. Chapon F, Latour P, Diraison P, Schaeffer S, Vandenberghe A. Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 779–782.
21. Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database. Available from: URL: <http://molgen-www.uia.ac.be/CMTMutations>
22. Leal A, Berghoff C, Berghoff M, Del Valle G, Contreras C, Montoya O, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: a novel Tyr145Ser mutation in the myelin protein zero (MPZ, P0) gene causes different phenotypes in homozygous and heterozygous carriers within family. *Neurogenetics* 2003; 4: 191–197.
23. Seeman P, Mazanec R, Zidar J, Hrusakova S, Ctvrtickova M, Rautenstrauss B. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): reliable detection of CMT1A duplication and HNPP deletion using 8 microsatellite markers in 2 multiplex PCRs. *Int J Mol Med* 2000; 6: 421–426.
24. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Vandenberghe A, Pham-Dinh D, Dautigny A, et al. Rapid screening of myelin genes in CMT1 patients by SSCP analysis: identification of new mutations and polymorphisms in the P0 gene. *Hum Genet* 1994; 94: 653–657.
25. Rouger H, LeGuern E, Goudier R, Tardieu S, Birouk N, Gugenheim M, et al. High frequency of mutations in codon 98 of the peripheral myelin protein P0 gene in 20 French CMT1 patients. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 638–641.
26. Lagueny A, Latour P, Vital A, Rajabally Y, Le Masson G, Ferrer X, et al. Peripheral myelin modification in CMT1B correlates with MPZ gene mutations. *Neuromuscul Disord* 1999; 9: 361–367.
27. Komiyama A, Ohnisi A, Izawa K, Yamamori S, Ohashi H, Hasegawa, O. De-novo mutation (Arg98Cys) of the myelin P0 gene and uncompactness of the major dense line of the myelin sheath in a severe variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *J Neurol Sci* 1997; 149: 103–109.
28. Kurihara S, Adachi Y, Wada K, Adachi A, Ohama E, Nashima K. Axonal and demyelinating forms of the MPZ Thr124Met mutation. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 157–160.

Nabídno 5. 1. 2004

Přijato v definiční verzi 26. 2. 2004

MUDr. P. Seeman
Klinika dětské neurologie, DNA laboratoř
UK 2. LF a FNM
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: pavel.seeman@lfmotol.cuni.cz