

## Charcot-Marie-Tooth 1 (CMT1) a tomakulózní neuropatie (HNPP) - průkaz specifických DNA duplikací a delecí v oblasti 17p11.2-12 pomocí sady dinukleotidových markerů

Seeman P.<sup>1,3</sup>, Mazanec R.<sup>2</sup>, Seemanová E.<sup>3</sup>, Bojar M.<sup>2</sup>, Komárek V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika dětské neurologie, <sup>2</sup>Neurologická klinika, <sup>3</sup>Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha

### Souhrn

Dědičné motoricko-senzorické neuropatie (HMSN) jsou klinicky i geneticky heterogenní skupinou nervosvalových onemocnění. V klinickém obraze dominuje distální svalová slabost, distální svalové atrofie, deformity nohou - hlavně pes cavus, areflexie, senzitivní poruchy a většinou autosomálně dominantní přenos poruchy. Pomocí elektrofyziologie lze dobře rozlišit typ I s výrazně sníženou rychlostí vedení (NCV) periferním nervem od typu II s normální či pouze lehce sníženou NCV. V posledních letech převládalo spíše dělení molekulárně genetické na typy I-IV s řadou podtypů. V současnosti je známo již nejméně 18 různých chromozomálních oblastí zodpovědných za různé typy HMSN. Přímá DNA diagnostika je sice zatím možná pouze u elektrofyziologicky potvrzeného typu I choroby Charcot-Marie-Tooth (CMT1), který ale mezi HMSN tvoří celých 70 %. Typ 1 CMT je rovněž geneticky heterogenní, ale 80 - 90 % pacientů tvoří typ 1A CMT. Ten je autosomálně dominantní, způsobený 1,5 Mb submikroskopickou duplikací v oblasti 17p11.2-12, ve které leží gen pro periferní myelin protein 22 (PMP 22). Delece téže oblasti je nacházena u pacientů s tzv. tomakulózní neuropatií (HNPP). Kvantitativní PCR (QT-PCR), pulzní gelová elektroforéza (PFGE), kvantitativní Southern blotting a fluorescenční in situ hybridizace (FISH) jsou nejčastěji užívanými metodami pro detekci těchto duplikací/delecí. Tyto metody jsou však značně náročné na čas, práci, finance i vybavení. Na našem pracovišti je k detekci těchto specifických přestaveb užívána sada osmi mikrosatelitových (CA)n markerů (AFM 191xh12, AFM 200yb12, AFM 317yg1, AFM 165, RM11-GT, 142E8, 103B11, 133C4) lokalizovaných uvnitř zmíněné 1,5 Mb CMT/HNPP oblasti. Specifické, primerem značené fluorescenční PCR produkty jsou délkově analyzovány na automatickém sekvenátoru. Duplikace, tedy výskyt celkem tří kopií úseku v oblasti 17p11.2-12 u postiženého CMT 1A, se s vysokou pravděpodobností projeví nálezem tří různě dlouhých PCR produktů v alespoň jednom z 8 používaných markerů. V případě delece v 17p11.2-12 je u postiženého nalezena ve všech 8 markrech pouze 1 alela. Při segregační analýze v rodině s HNPP není jediná detekovatelná (zdravá) alela předána z postiženého rodiče na postiženého potomka. Tato neradioaktivní metoda je jednoduchá, levná a spolehlivá a tím vhodná i pro menší klinickou laboratoř, nicméně má velkou kapacitu. Jistou nevýhodou je možné vidět v nemožnosti úplného vyloučení duplikace, tu je možné pouze spolehlivě prokázat. Pro zcela jistý průkaz delece je dále potřeba vyšetření ve dvou generacích postižených. Jedna metoda však umožňuje průkaz dvou různých mutací u dvou částých onemocnění periferního nervstva.

**Klíčová slova:** Charcot-Marie-Tooth, HNPP, HMSN, PMP 22, mikrosatelitové markery

### Summary

Seeman P., Mazanec R., Seemanová E., Bojar M., Komárek V.: Charcot-Marie-Tooth 1 (CMT1) and Tomaculous Neuropathy (HNPP) - Evidence of Specific DNA Duplications and Deletions in the Area of 17p11.2-12 by Means of a Set of Dinucleotide Markers

Hereditary motor-sensory neuropathies (HMSN) are clinically and genetically a heterogeneous group of neuromuscular diseases. In the clinical picture dominate distal muscular weakness, distal muscular atrophy, deformities of the feet - in particular pes cavus, areflexia, sensory disorders and in the majority an autosomal dominant heredity of the disorder. By electrophysiology type I, with a markedly reduced conduction velocity (NCV) through the peripheral nerve can be readily differentiated from type II with a normal or only slightly reduced NCV. In recent years classification into molecular genetic types I-IV

with several sub-types predominated. At present at least 18 different chromosomal areas responsible for different types of HMSN are known. Direct DNA diagnosis is so far possible only in electrophysiologically confirmed type I Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1) which accounts for 70% of HMSN. Type I CMT is however also genetically heterogeneous but 80-90% of the patients are formed by type 1A CMT. The latter is autosomally dominant caused by 1,5 Mb submicroscopic duplication in the area 17p11.2-12 in which the gene for the peripheral myelin protein 22 (PMP 22) is situated. Deletion in the same area is found in patients with so-called tomaculous neuropathy (HNPP). Quantitative PCR (QT-PCR), pulsed gel electrophoresis (PFGE), quantitative Southern blotting and fluorescent in situ hybridization (FISH) are the most frequently used methods for the detection of these duplications/deletions. These methods are however, very pretentious as regards time, labour, costs and equipment. In our department for detection of these specific reconstructions a set of eight microsatellite (CA)<sub>n</sub> markers is used (AFM 191xh12, AFM 200yb12, AFM 317yg1, AFM 165, RM11-GT, 142E8, 103B11, 133C4), located inside the mentioned 1,5 Mb CMT/HNPP area. Specific primer labelled fluorescent PCR products are longitudinally analyzed on an automatic sequantor. Duplication, i.e. the incidence of a total of three copies of the section in the area 17p11.2-12 in affected CMT 1A will be most probably manifested by the finding of three PCR products of different length in at least one of eight markers used. In case of deletion in 17p11.2-12 in the affected subject in all 8 markers only 1 allele is found. In segregation analysis in the family with HNPP the only detectable (sound) allele is not transmitted from the affected parent to the affected offspring. This non-radioactive method is simple, cheap and reliable and thus suitable also for small clinical laboratories and has a great capacity. A certain disadvantage is that it is not possible to rule out duplication completely. The latter can be only reliably detected. For quite definite evidence of deletion it is necessary to examine two generations of affected subjects. However one method makes it possible to detect two different mutations in two frequent diseases of the peripheral nervous system. Key words: Charcot-Marie-Tooth, HNPP, HMSN, PMP 22, microsatellite markers

O.

## Úvod

Dědičné motoricko-senzorické neuropatie (HMSN) jsou již dlouho známou, klinicky i geneticky heterogenní skupinou progresivního onemocnění periferního nervstva (1). Jde o onemocnění relativně častá s udávanou incidencí kolem 1:2500 (2), tedy častější než například Duchennova svalová dystrofie. Klinické dělení je dosti nejednotné, ale v současnosti převládá klasifikace podle Dycka na celkem 7 typů (tab. 1). V současnosti je známo již 18 různých chromozomálních lokalizací (3), zodpovědných za jednotlivé typy a podtypy HMSN (tab. 2). Zodpovědné geny a z nich vyplývající možnost přímé molekulárně genetické diagnostiky jsou však dosud známé pouze u 4 podtypů HMSN (4) (tab. 2).

V diagnostice a klasifikaci HMSN hraje nezastupitelnou roli elektrofyzilogické vyšetření, které relativně

spolehlivě odliší mnohem častější typ I HMSN (CMT1) - demyelinizační, s výrazně sníženou rychlostí vedení periferním nervem (pod 38 m/s), od vzácnějšího typu II HMSN (CMT2) - axonálního, u něhož je rychlost vedení obvykle normální či jen lehce snížená (> 38 m/s) (1). Choroba Charcot-Marie-Tooth 1 (CMT1) je charakterizována distální svalovou slabostí a atrofiemi, sníženou rychlostí vedení vzruchu periferním nervem (NCV), známkami demyelinizace a remyelinizace s cibulovitými formacemi v biopsii n. suralis a ve většině případů autosomálně dominantním způsobem dědičnosti (5, 1) (tab. 3).

U 70 % všech případů CMT1 a mezi autosomálně dominantní CMT1 dokonce u 85 % je nacházena tandemová submikroskopická 1,5 Mb duplikace v chromozomální oblasti 17p11.2-12, zahrnující mj. gen pro periferní myelin protein 22 (PMP22) (6). Delece téhož úseku je pak nacházena u 84 % pacientů s tomakulózou

Tab. 1. Klinické dělení HMSN podle Dycka, 1993.

| Typ   | Synonymum                                    | Manif. věk | Symptomy  |
|-------|--|------------|---|
| HMSN1 | hypertrofní forma peron. sval. atrofie C-M-T | 10 - 30    | demyeliniz. polyneuropatie, pomalu progredientní distální parézy, obv. AD         |
| HMSN2 | neurální forma C-M-T                         | 20 - 40    | axonální neuropatie, klinicky jako HMSN1, obv. AD, vzácně AR                      |
| HMSN3 | hypertrofická neuritis Dejerine-Sottas       | do 15 let  | demyelinizační neuropatie, progredientní parézy, obv. AR                          |
| HMSN4 | m. Refsum                                    | 5 - 40     | polyneuropatie s ataxií, porucha metab. mast. kyselin - zvýš. kys. fytanové       |
| HMSN5 | dědičná spastická paraplegie                 | do 15 let  | axonální polyneuropatie, atrof. parézy, obv. AD                                   |
| HMSN6 | HMSN s atrofií optiku                        | různé      | obv. axonální neuropatie, atrofické parézy s atrofií optiku, růz. dědičnost       |
| HMSN7 | HMSN s retinitis pigmentosa                  | ??         | neuropatie s retinitis pigmentosa, vzácně ataxie a poruchy sluchu, růz. dědičnost |

| Tab. 2. Dělení HMSN podle molekulární genetiky. |           |                     |                                |             |
|---|-----------|---------------------|--------------------------------|-------------|
| Typ HMSN  | dědičnost | chromoz. lokalizace | mutace                         | gen         |
| HMSN1A  | AD        | 17p11.2 - 12        | dupl./bod. m.                  | PMP22       |
| HMSN1B  | AD        | 1q22 - 23           | bod. mutace                    | Protein 0   |
| HMSN1C  | AD        | 10                  | bod. mutace                    | EGR 2       |
| CMT4A   | AR        | 8q                  | ?                              | ?           |
| CMT4B   | AR        | 11q23               | ?                              | ?           |
| HMSN2A  | AD        | 1p35 - p36          | ?                              | ?           |
| HMSN2B  | AD        | ?                   | ?                              | ?           |
| HMSN2C  | AR        | ?                   | ?                              | ?           |
| HMSN2D  | AD        | 7p14                | ?                              | ?           |
| HMSN3   | AD        | 1q22 - 23           | bod. mutace                    | Protein 0   |
| HMSN3   | AD        | 17p11.2 - 12        | homoz. duplik./<br>bod. mutace | PMP22       |
| HMSN3   | AR        | ?                   | ?                              | ?           |
| HNPP  | AD        | 17p11.2 - 12        | delece/bod. mutace             | PMP22       |
| HNPP  | AD        | ?                   | ?                              | ?           |
| HMSNX   | XD/XR ?   | Xq13.1              | bod. mutace                    | Connexin 32 |
| HMSNX2  | XR        | Xp22.2              | ?                              | ?           |
| HMSNX3  | XR        | Xq26                | ?                              | ?           |

ní neuropatií (HNPP) (7, 6). HNPP je obvykle lehkou formou HMSN poprvé popsanou De Jongem (8) a Daviesem (9), charakterizovanou rekurentními parézami na různých místech těla, typickým nálezem zpomalení NCV v úžinách, autosomálně dominantním způsobem dědičnosti a v biopsii nervu obvykle nacházenými buňkovitými ztlustěními myelinu tzv. tomakuly. U malé části pacientů jak s CMT1, tak s HNPP jsou výjimečně nacházeny i bodové mutace v PMP22 (10). CMT1 může být dále způsoben mutacemi v genech pro connexin 32 (Cx32) (11), protein 0 (P0) (12, 13) či EGR2 (14). Asi 10 % případů CMT1A je důsledkem mutací de novo, až na výjimky vždy paternálního

původu, tedy vzniklých náhodně a to nerovnoměrným crossing-over při spermatogenezi (15).

Jak CMT1, tak i HNPP mívají nezřídka velkou variabilitu postižení i v rámci jedné rodiny (16) a dokonce i mezi jednovaječnými dvojčaty (17). Spolehlivá predikce fenotypu a tedy klinické prognózy na základě genotypu dosud možná není. Přítomnost duplikace však vždy koreluje se zpomalením NCV a nebyl dosud popsán případ s duplikací a normální NCV.

K průkazu uvedených duplikací, resp. delecí jsou obecně užívány různé metody jako např. pulzní gelová elektroforéza (PFGE), Southern blotting po restričním štěpení, kvantitativní PCR, kvantitativní Sout-

Tab. 3. Diagnostická kritéria pro chorobu Charcot Marie Tooth typ I.

|  |
|--|
| 1. Začátek obtíží koncem 1. či začátkem 2. dekády (někdy až 3.) věku (obv. ne v předškolním věku). Pomalu progredientní průběh obtíží.   |
| 2. <b>Pes cavus</b> - "Friedreichova noha" bilaterálně, deformity nohou, později obv. i rukou  |
| 3. Výrazně snížené či vymizelé šlachosvalové reflexy dříve a více na DK  |
| 4. Atrofie peroneálních svalů - bérce - distální svalové atrofie   |
| 5. Poruchy citlivosti na DK (dříve a více), ale i na HK - parestézie, snížená ladička  |
| 6. Psychomotorický vývoj obv. normální, normální mentální úroveň   |
| 7. Obv. normální základní biochemie CK a LDH nezvýšeno   |
| 8. Autosomálně dominantní dědičnost (v 10 % možné i de novo mutace, obv. paternální)   |
| 9. Vyšetření EMG - rychlost vedení vzruchu periferním nervem (NCV) - motorickým i senzoričným je výrazně snížená. Mezinárodně je určená hranice pod 38 m/s, ale obv. je NCV pod 25 m/s (norma nad 50 m/s). Motorická rychlost vedení na n. medianus pod 30 m/s. Rychlost vedení na DK často neměřitelná. Senzorická rychlost vedení na n. medianus pod 30 m/s. Chybění SNAP - senzoričným nervový akční potenciál. Neurogenní nález EMG (axonální postižení) není typický pro typ I, ale pro typ II. |
| 10. V event. biopsii nervu (n. suralis) - cibulovité hypertrofické formace Schwannových buněk, snížení počtu myelinovaných nervových vláken, známky hypomyelinace a hypermyelinace.  |

Body 3 a 9 + jeden z dalších bodů jsou podmínkou pro DNA vyšetření.

hern blotting, fluorescenční in situ hybridizace (FISH) či mikrosatelitové markery (18). Prvně jmenované metody jsou však značně pracné a náročné na čas, finance i vybavení a vyžadují složité zpracování vzorků od pacientů.

Na našem pracovišti užíváme u pacientů s klinickým podezřením na CMT1, resp. HNPP k detekci submikroskopických duplikací, resp. delecí v uvedené oblasti pro jednoduchost, rychlost, velkou kapacitu a nízkou cenu posledně uvedenou metodu. Tedy sadu osmi mikrosatelitových dinukleotidových markerů z oblasti 17p11.2-12 (19, 20).

Cílem tohoto příspěvku je především upozornit nejširší neurologickou veřejnost na dostupnost, význam a možnosti přímého molekulárně genetického vyšetření u CMT1 a HNPP v naší zemi a současně informovat o nových poznatcích v problematice HMSN.

## Metodika

**Pacienti:** Výběr pacientů pro molekulárně genetické vyšetření je prováděn podle diagnostických kritérií pro CMT1 uvedených v tabulce 3. Důraz je kladen především na nález snížené rychlosti vedení na EMG, snížené či vymizelé reflexy a autosomálně dominantní - vertikální - typ přenosu v rodině. V případě HNPP je klinická diagnóza opřena především o anamnestické údaje o rekurentních parézách střídajících lokalizaci.

### Elektrofyzilogická vyšetření

1.1 *Konduktivní studie* - jsou klíčovými testy k rozlišení hypertrofické a neurální formy CMT

1.1.1 Rychlost vedení motorickými vlákny

*N. peroneus oboustranně*

- výbavnost nebo chybění M odpovědi z m. extensor digitorum brevis
- distální motorická latence - bývá 2-3krát prodloužená proti normě
- motorická rychlost vedení - bývá přibližně poloviční proti normě
- amplituda M odpovědi - bývá výrazně snížená a její pokles koreluje výrazněji s klinickým nálezem nežli motorická rychlost vedení.

*N. medianus a n. ulnaris oboustranně*

- distální motorická latence
- motorická rychlost vedení na předloktí - bývá v rozmezí 15 - 35 m/s
- amplituda M odpovědi z tenaru, resp. hypotenaru
- vlna F - bývá hůře výbavná s prodlouženou minimální latencí.

1.1.2 Rychlost vedení senzitivními vlákny

*N. suralis a n. medianus oboustranně*

- senzitivní nervový akční potenciál (SNAP) - bývá většinou nevýbavný

Při registraci jehlovou elektrodou bývá rychlost vedení zpomalena asi na polovinu normy (13 - 32 m/s) a amplituda SNAP bývá nižší než 10 % normy.

### 1.2 *Jehlová elektromyografie*

M. tibialis anterior a m. vastus lateralis oboustranně na dolních končetinách. Svaly thenaru a m. interossei dorsalis primus na horních končetinách.

- abnormální spontánní aktivita - fibrilace a pozitivní ostré vlny - bývá řídká a více průkazná v distálních svalech dolních končetin.
- analýza akčních potenciálů motorických jednotek (MUAP) - časté polyfázie, prodloužené trvání a vzestup amplitudy MUAP.
- interferenční vzorec - bývá výrazně redukován, zejména v distálních svalech.

U starších pacientů analýza MUAP prokazuje v proximálních svalech akční potenciály krátkého trvání, nízké amplitudy a polyfázické. Tento nález odpovídá sekundárním myopatickým změnám, které nacházíme ve svalové biopsii u těchto pacientů.

### 1.3 *Blink reflex*

- bývá dobře výbavný a často nacházíme prodloužení latencí komponenty R1 a R2 oboustranně.

Rychlosti vedení se zpomalují zejména mezi 3. až 5. rokem života a již se dále nemění - porovnání rychlosti vedení u symptomatických dětí s dospělými pacienty nad 70 let prokazuje obdobné zpomalení rychlosti vedení.

### Molekulárně genetická vyšetření

DNA je izolována z lymfocytů periferní krve dvou-  
stupňovou lýzou buněk a následným natrávením proteínázou K (f. Promega - USA).

Úseky variabilních dinukleotidových (CA)<sub>n</sub> sekvencí jsou amplifikovány v polymerázové řetězové reakci (PCR) pomocí dvojic primerů, kde vždy jeden z páru je označen fluoresceinem. Výčet používaných markerů, jejich heterozygotní frekvence a počet alel jsou uvedeny v tabulce 4. Vzniklé PCR produkty jsou po kontrolní agaróze elektroforéze následně analyzovány ve vysoce rozlišujícím sekvenčním gelu na automatickém sekvenátoru ABI 310 (f. Perkin Elmer - Foster City, USA) nebo A.L.F. (f. Pharmacia - Švédsko) za pomoci software Gene Scan (f. Perkin Elmer - Foster City, USA) nebo Fragment Manager (f. Pharmacia - Uppsala, Švédsko). Cílem této fragmentové analýzy je určení počtu a přesné velikosti vzniklých PCR produktů, které se mohou lišit i jen o pouhé dvě báze. V případě duplikace nese postižený celkem tři kopie kritického úseku a je tedy při kombinaci všech 8 polymorfních markerů vysoce pravděpodobná přítomnost repetitivních sekvencí 3 různých délek u alespoň jednoho z vyšetřovaných markerů, které dají vznik třem různě velkým PCR produktům (obr. 1 a 2). Teoreticky však přesto existuje minimální pravděpodobnost výskytu vždy pouze nejvýše dvou různých délek u však třech přítomných kopií úseků (obr.

Tab. 4. Seznam používaných markerů, počty alel a heterozygotní frekvence markerů (podle Genome Database – <http://gdbwww.gdb.org>).

| Název markeru         | Počet alel | Heterozygotní frekvence [%] | Velikost PCR produktů |
|-----------------------|------------|-----------------------------|-----------------------|
| AFM 191xh12 (D17S921) | 10         | 74                          | 169 bp – 185 bp       |
| AFM 200yb12 (D17S839) | 5          | 55                          | 155 bp – 175 bp       |
| RM 11 GT (D17S122)    | 7          | 74                          | 153 bp – 165 bp       |
| 103B11ac1R (D17S1357) | 7          | 57                          | 194 bp – 210 bp       |
| 133C4ac1 (D17S1356)   | 6          | 74                          | 182 bp – 194 bp       |
| AFM 165zd4 (D17S793)  | 7          | 70                          | 95 bp – 109 bp        |
| 142E8ac1 (D17S1356)   | 7          | 48                          | 145 bp – 157 bp       |
| AFM 317 (D17S955)     | 4          | 45                          | 181 bp – 189 bp       |

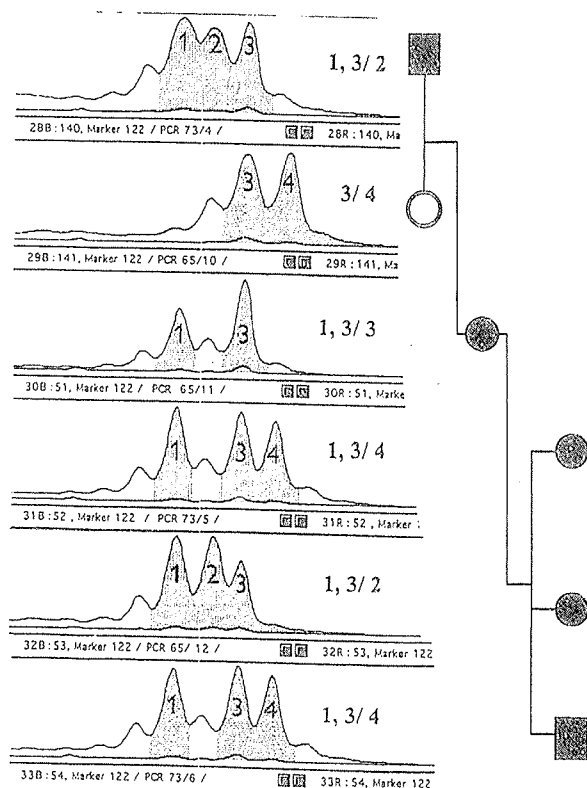
1 - osoba třetí shora). Proto popisovaná metoda není schopna duplikaci ve vyšetřovaném úseku vyloučit stoprocentně, je pouze schopna ji spolehlivě prokázat.

V případě delece je situace opačná, nález 2 alel v některém z markerů vylučuje delecii a k jejímu průkazu je nutná segreganční analýza v rodině, kde chybí přenos jediné alely postiženého rodiče na jeho postiženého potomka (obr. 3 a 4). Je-li k vyšetření k dispo-

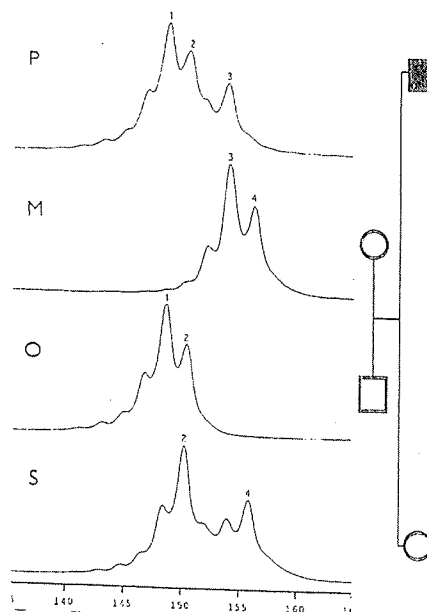
zici pouze jeden postižený či jen jedna generace, je při nálezů pouze jedné alely ve všech markerech, je při výpočet pravděpodobnosti na základě kombinace známých heterozygotních frekvencí jednotlivých markerů podle vzorce:  $1 - (0,26 \times 0,26 \times 0,52 \times 0,43 \times 0,55 \times 0,45 \times 0,26) = 0,9990273$ . Tedy 0,00727% pravděpodobnost náhody, že při přítomnosti 2 úseků repetitivních sekvencí byla nalezena vždy jen jedna délka alely ve všech 8 použitých markerech.

Menší, neoznačené vedlejší peaky jsou typickým vedlejším nálezem při amplifikaci (CA)n repetice a vznikají chybami polymerázy na opakující se sekvenci.

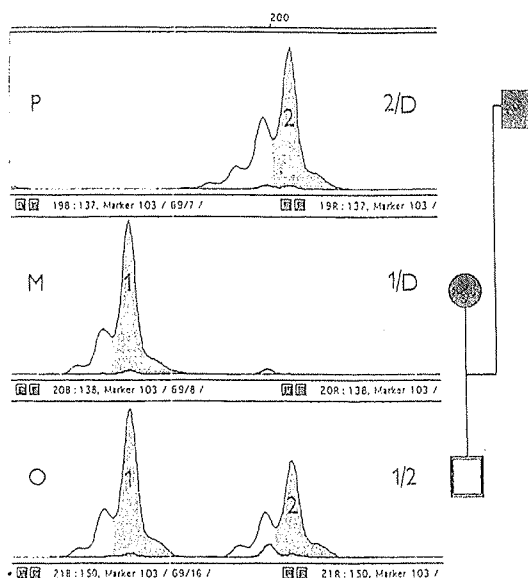
PCR reakce jsou prováděny v celkovém reakčním objemu 25  $\mu$ l ve složení 1  $\mu$ l 10  $\mu$ M každého primeru, 2,5  $\mu$ l 10krát reakčního PCR pufru (f. MBI Fermantas



Obr. 1. Příklad výsledků rodiny s duplikací a její přenos ve třech generacích - 3 alely u postižených jsou známkou duplikace, postižení je v rodině vázáno na přenos vždy dvou alel současně (č. 1 a č. 3) - z dědečka na matku a z matky na všechny tři děti. Matka třech postižených dětí sice nese pouze alely dvě, ale všimněte si dvojnásobné intenzity alely č. 3 oproti alele č. 1, která je dána překryvem dvou alel stejné délky. Černé vyplněné symboly označují postižené jedince, 1, 2, 3, 4 - označení alel. Vpravo jsou uvedeny genotypy a lokalizace alel na jednotlivých chromozomech oddělené lomítkem.



Obr. 2. Ukázka výsledků rodiny s de novo duplikací paternálního původu v markeru RM11GT-P-pacient klinicky CMT1, NCV 15 m/s, M - matka pacienta zdravá - EMG norm., O - otec pacienta, klinicky zdravý, EMG norm., S - sestra pacienta, klinicky zdravá, EMG norm. Vlivem plné informativnosti markeru v rodině je patrný přenos obou otcovských alel (č. 1 a č. 2) na pacienta plus jedné mateřské (č. 3) alely.



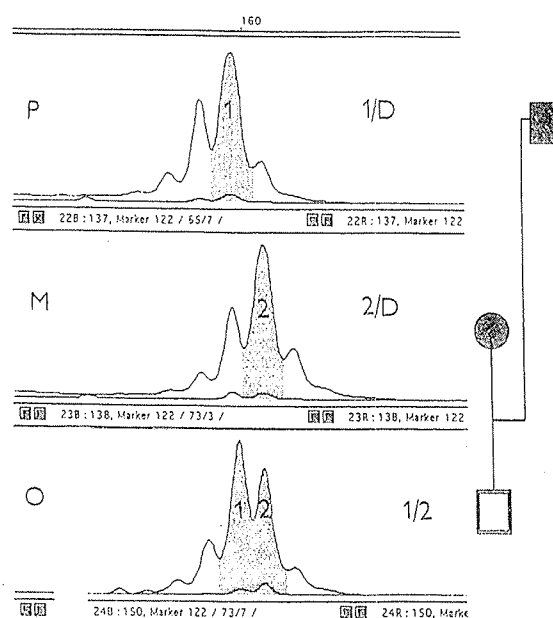
Obr. 3. Příklad výsledků rodiny s HNPP a delecí ve vyšetřované oblasti. Chybění alelického přenosu z matky na syna - pacienta. P - pacient, M - matka, O - otec. Matka i syn nesou pouze jednu alelu, a to různou (č. 1 nebo 2) (druhá je deletovaná - D) a jediná přítomná alela u pacienta pochází od zdravého otce, který nese alely dvě č. 1 a 2). Menší, neoznačené vedlejší peaky jsou typickým nálezem při amplifikaci (CA)n repetice a vznikají chybami polymerázy na opakující se sekvenci.

- Litva), 1  $\mu$ l 10 mM dNTP mix (f. Promega - USA), 1  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub> (f. MBI Fermentas - Litva), 1  $\mu$ l DNA (200 - 600 ng/ $\mu$ l) a 0,5 U Taq polymerázy (f. MBI Fermentas - Litva). Termoprofil pro PCR je následující 95 °C 5 min., pak 25 cyklů 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1,5 min, u markerů AFM 191, AFM 200 a RM 11 GT je annealingová teplota 58 °C.

1  $\mu$ l vzniklého PCR produktu je smíchán s 10  $\mu$ l deionizovaného formamidu (Serva - Německo) a 2 - 3  $\mu$ l z této směsi jsou nanášeny na sekvenční gel automatického sekvenátoru ABI 310 nebo A.L.F. Vyhodnocení probíhá pomocí softwaru Gene Scan nebo Fragment Manager.

## Výsledky a diskuse

Diagnostika choroby Charcot-Marie-Tooth I stejně jako lehčí formy HMSN - HNPP probíhala dosud na našem území na základě klinického nálezu, genealogie, EMG a biopsie nervu eventuálně i svalu. Vlivem relativně velké variability fenotypu resp. tíže postižení v rámci rodiny, výskytu sporadických případů a překrývání fenotypů nebylo dosud možné přesnější zařazení do jednotlivých molekulárně definovaných jednotek. Molekulárně genetické vyšetření u těchto chorob nebylo dosud v České ani Slovenské republice k dispozici. Výjimečně se podařilo zajistit vyšetření na zahraničním pracovišti. Na naší klinice jsme zavedli jednoduchou a rychlou metodu na základě PCR, která je schopná prokázat specifické DNA přestavby u výše



Obr. 4. Příklad stejné rodiny jako na obr. 3, ale za použití jiného markeru - P - pacient, M - matka, O - otec, D - delecce, 1, 2 označení alel.

zmíněných dědičných polyneuropatií. Zde popisovaná metoda, na rozdíl od ostatních užívaných metod detekce CMT1A/HNPP přestaveb, vystačí i s minimem DNA, obchází použití radioaktivního materiálu, není zatížena nebezpečím kvantitativního hodnocení signálu a má velkou kapacitu vyšetřovaných vzorků. Pacient, u kterého byly nalezeny tři alely v alespoň jednom z vyšetřených markerů, je považován za nosiče duplikace ve vyšetřované oblasti (obr. 1 a 2). Dosud jsme vyšetřili 42 rodin, které odpovídaly našim diagnostickým kritériím (tab. 3). V současnosti, na počátku projektu byla touto metodou na našem pracovišti duplikace prokázána ve 14 rodinách (celkem 30 osob) s klinickým podezřením na CMT1 a delecce ve 4 rodinách s klinikou HNPP (celkem 6 osob). Smyslem tohoto příspěvku však není výčet výsledků, ale chceme hlavně upozornit nejširší neurologickou veřejnost na možnost molekulárně genetického vyšetření u CMT1 a HNPP a informovat o principu a možnostech detekční metody.

Kombinací 8 polymorfních dinukleotidových markerů má tato metoda více než 99 % výpovědnost v případě delecce a vysoké procento (nad 90 %) záchytu duplikací. Tato úspěšnost záchytu je vyšší než u většiny radioaktivních hybridizačních metod používaných na řadě pracovištích ve světě. V případě duplikace však metoda záchyt všech případů neumožňuje. Proto v případě nálezu vždy nejvýše dvou alel ve všech markerech u pacienta s typickými klinickými a elektrofyziologickými příznaky CMT1 doporučujeme vyšetření náročnější metodou jako pulzní gelová elektroforéza (PFGE) nebo fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Rozhodující význam pro výtěžnost záchytu specifických mutací má však stále exaktní klinická

diagnóza a tedy správná indikace k DNA vyšetření. Průkaz delece či duplikace v rodině umožňuje přímou prenatalní diagnostiku. Menší závažnost postižení u CMT1A či u HNPP a dosavadní nemožnost přesné predikce fenotypu na základě zjištěného genotypu však nejsou považovány za dostatečné pro přerušení těhotenství z medicínské indikace.

Zavedením tohoto vyšetření chceme zajistit a rozšířit servis pro neurologická pracoviště i praktické neurology a pacientům umožnit vyšší diagnostickou spolehlivost, přesné poradenství a ušetření invazivních vyšetřovacích zákroků jako je biopsie nervu či svalu.

Nezjištění či dokonce vyloučení duplikace resp. delece v oblasti 17p11.2-12 by mělo být na základě známé četnosti a četnosti mutací dalších involvovaných genů následováno hledáním v následujících genech v uvedeném pořadí Cx 32 → P0 → PMP22 → (EGR2). Průkaz bodových mutací v těchto genech vyžaduje jejich sekvenování, které pro náročnost a nákladnost vyžaduje exaktní a racionální indikaci.

Je velmi pravděpodobné, že budou objeveny a popsány další markery v duplikové oblasti, které dále rozšíří úspěšnost zachytu duplikací. Optimalizace multiplex metody s následnou analýzou na sekvenátoru ABI 310 (firmy Perkin-Elmer) pro více markerů v jedné PCR reakci urychlí, zracionalizuje a zlevní popsané vyšetření pacientů s CMT1A a HNPP.

*Projekt je podporován z grantu reg. č. IGA MZ ČR č. M 3/3 a od DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft).*

*Poděkování:*

*Tato práce by nebyla možná bez spolupráce a pochopení pacientů. Děkujeme Nadaci Dětský mozek za finanční podporu pro zahájení projektu. Děkujeme Laboratoři molekulární genetiky II. dětské kliniky 2. LF UK a FNM za pomoc při začátcích projektu a Centru dědičných metabolických poruch 1. LF UK a Ústavu molekulární genetiky ČAV za umožnění používání automatického sekvenátoru ALF v počátcích projektu.*

## Literatura

1. Dyck PJ, Chance P, Lebo R, Carney JA. Hereditary motor and sensory neuropathies, In: Dyck PJ, ed. Peripheral neuropathy, vol. 2, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993; 1094-1132.
2. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. Clin Genet 1974; 6: 98-118.
3. Rautenstrauss B, Liehr T, et al. Molekulargenetische Diagnostik der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung. Med Genetik 1997; 9: 501-504.
4. Chance P, Fischbeck K. Molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth disease and related disorders. Hum Mol Genet 1994; 3: 1503-1507.
5. Ionasescu I. Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. Muscle Nerve 1995; 18: 267-275.
6. Nelis E, Van Broeckhoven C, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. Eur J Hum Genet 1996; 4: 25-33.
7. Chance PF, Abbas N, Lensch MW, et al. Two autosomal dominant neuropathies result from reciprocal DNA duplication/deletion of a region on chromosome 17. Hum Mol Genet 1993; 2: 2031-2035.
8. De Jong JG. About families with a hereditary disposition to compression of the nerves correlated with migraine. Psychiatr Neurol B1 1947; 50: 60-76.
9. Davies DM. Recurrent peripheral nerve palsies in a family. Lancet 1954; 7: 266-268.
10. Marossu MG, Vacargiu S, Marrosu G, Vanneli, Cianchetti C, Muntoni F. A novel point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Neurology 1997; 48: 489-493.
11. Ionescu VV, Searby BS, Ionescu R, Neuhaus MS, Werner R. Mutations of noncoding region of the connexin32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Neurology 1996; 47: 541-544.
12. Warner LE, Hilz MJ, Appel SH, 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.
13. Roa BB, Lupski JR. Molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Adv Hum Genet 1994; 22: 117-152.
14. Warner L, Mancias P, Butler IJ, et al. Mutations in early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. Nat Genet 1998; 18: 382-384.
15. Blair PI, Nash J, Gordon M, Nicholson GA. Prevalence and origin of de novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: first report of a de novo duplication with a maternal origin. Am J Hum Genet 1996; 58: 472-476.
16. Lütsch J, Müller HJ, Malik N. The value of family investigations in newly detected Charcot-Marie-Tooth disease in children. J Eur J Pediatr 1995; 154 (3): S40-3.
17. Garcia CA, Malamut RE, England JD, Parry GS, Liu P, Lupski JR. Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. Neurology 1995; 45: 2090-2093.
18. Lupski JR. DNA diagnostics for Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited neuropathies. Clin Chem 1996; 42 (7): 995-998.
19. Le Guern E, Ravise N, Gouider R, et al. Microsatellite mapping of the deletion in patients with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP): new molecular tools for the study of the region 17p12-p11 and for diagnosis. Cytogenet Cell Genet 1996; 72: 20-25.
20. Blair IP, Kennerson ML, Nicholson GA. Detection of Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication by polymerase chain reaction. Clin Chem 1995; 41(8): 1105-1108.

*Nabídnuo 31. 8. 1998.*

*Přijato v definitivní verzi 8. 12. 1998.*

MUDr. P. Seeman  
Klinika dětské neurologie 2. LF UK a FNM  
V úvalu 84  
150 06 Praha 5